

Fotografía de la portada:

cardiomiocitos de rata neonatal dispersos, tras tres días de cultivo.



**HIPOXIA EN CARDIOMIOCITOS; REGULACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD  $\beta_1$  DEL CANAL MAXI-K  
Y PARTICIPACIÓN EN EL PRECONDICIONAMIENTO  
CARDÍACO**

TESIS DOCTORAL  
Lucía Bautista Borrego  
2009





Prof. Dr. Antonio Castellano Orozco, Profesor Titular de Universidad y Prof. Dr. José López Barneo, Catedrático de Fisiología, ambos adscritos al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN:

que Lucía Bautista Borrego ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Hipoxia en cardiomiocitos; regulación de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K y participación en el preconditionamiento cardíaco“, que presenta para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Antonio Castellano Orozco

Fdo.: José López Barneo



*Dedicada a Antonio,  
a la memoria de mi padre  
y a mi madre.*



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar agradeciendo a los directores de esta tesis, los Drs. Antonio Castellano y José López-Barneo, el haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera científica en este laboratorio. Me siento afortunada por haber trabajado y aún trabajar en un grupo dinámico y en continuo crecimiento, donde he podido aprender de cada uno de sus miembros y madurar no sólo científicamente, sino también a nivel personal. Gracias a ambos por enseñarme a apostar por la ciencia de calidad, y por mostrarme que el desánimo en este trabajo no tiene cabida.

Mi más sincero agradecimiento al resto de las personas que desde mi entrada hasta ahora han formado o forman parte de este grupo. Nombrarlos a todos sería muy largo, pero gracias por vuestra ayuda continua, por vuestras críticas siempre constructivas, por vuestras risas. De entre los que ya no están no me puedo olvidar de Pablo Vime. Tampoco de los que eran becarios a mi llegada, ahora doctores y grandes científicos. Simón Méndez, Alberto del Valle, Javier Villadiego, y mis niñas: Rebeca Mejías, María García, Raquel del Toro y Ana Muñoz. Gracias a todos sobre todo por vuestra amistad sincera y perenne.

Ha sido una gran suerte poder contar con la ayuda de los Drs. Alberto Pascual y Jose Ignacio Piruat durante todo este tiempo. Gracias a ambos por escucharme siempre, por enseñarme tantas y tantas cosas, por aportar a este proyecto muchas y buenas ideas. No tengo palabras para agradeceros todas las horas que me habéis dedicado, aunque de vez en cuando me hayáis recordado que soy un castigo...gracias también por eso.

Un GRACIAS con mayúsculas a mis niñas chicas, Irene Abreu y Maria José Castro. Tan chicas y tan grandes, tan importantes en los últimos tiempos para mí. Gracias a las dos por recordarme quien soy, por confiar ciegamente en mí, por esa energía que despedís que no ha dejado nunca de recargarme. Quién me lo iba a decir a mí...que no os apaguen nunca esa luz, por favor.

Sé que me llevaré sólo lo bueno de lo que he aprendido de este gran grupo humano; por mi parte sólo espero haberos arrancado alguna risa. Y si no, alguna sonrisa.

Durante todo este tiempo me han pasado muchas cosas, buenas y malas. Un saco de gracias a mis amigos de siempre, por estar en todos esos momentos, y por tirar de mi tobillo de vez en cuando y traerme al suelo firme de la vida real, la de fuera del laboratorio. A Ana Montes, a Jordi, a Juan, a Rosalía y a Nicolás, a Alfonso, a Patricia, a Agu, a Laura, a Angela, a Noelia, a Inés y a Raquel, a Chari y a Carlos. Y ésto es sólo una representación...

Agradezco enormemente el cariño y la comprensión de mi familia política. Gracias, Natividad, por ser una suegra ejemplar, por el respeto hacia lo que hago, por su cariño. También a Manuela y a Volker, y a mis sobrinos Lucas, Paula y Álvaro. Gracias porque aunque vivís lejos siempre os sentimos cerca, el tito y yo.

Millones de gracias a mi familia. En especial a mis padres, por hacer de mí lo que soy hoy, por ayudarme siempre a emprender mis sueños, por separarse de mí apenas por segundos en mi camino. A mi padre, al que le hubiera llenado de orgullo leer estas letras, y a mi madre, por transmitirme no sólo en los genes su afán de lucha y superación. GRACIAS a los dos. A mi tía Marisabel, por pensar (aunque no sea verdad) que soy el vivo retrato del abuelo Juan, gracias por creer en mí siempre de manera incondicional. También a mi hermana, que me ha dado dos buenas razones para estar siempre feliz: Carmen y Manuel. Gracias a los dos por abrir huecos nuevos en mi corazón, reservados al lado de un hueco muy viejo que nunca nadie podrá rellenar otra vez.

Y sobre todo GRACIAS a Antonio Salatti, mi “marío”, a quien principalmente dedico esta tesis. Gracias por aguantarme, que no es poco. Por querer caminar conmigo, allá donde nos lleve la marea, por hacerme reír siempre, por tu apoyo. Por enseñarme lo que es el amor verdadero, simple y sin excusas.

*Ya estoy en la mitad de esta carretera,  
tantas encrucijadas quedan detrás.  
Ya está en el aire girando mi moneda  
y que sea lo que sea...*

(De la canción "Sea", de Jorge Drexler)



# ÍNDICES



ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	11
ABREVIATURAS .....	13
INTRODUCCIÓN .....	15
I. RESPUESTAS CELULARES A LA DISMINUCIÓN DE OXÍGENO. ....	15
<i>I.1. Tipos de respuestas frente a la hipoxia.</i> .....	15
I.1.1. Respuestas agudas a la hipoxia. ....	15
I.1.2. Respuestas crónicas a la hipoxia. ....	17
<i>I.2. Factores de transcripción HIF.</i> .....	18
I.2.1. Composición molecular y función de los factores HIF. ....	18
I.2.2. Regulación de HIF- $\alpha$ dependiente de oxígeno. ....	19
<i>I.3. Efectos de la hipoxia crónica sobre la regulación génica de los canales iónicos.</i> .....	22
I.3.1. Canales maxi-K dependientes de calcio y de voltaje.....	22
I.3.2. Subunidad $\beta_1$ del canal maxiK.....	24
I.3.3. El canal maxi-K en el músculo cardíaco.....	26
II. RESPUESTAS DEL MÚSCULO CARDÍACO A LA DISMINUCIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE OXÍGENO. ....	30
<i>II.1. Efectos de la hipoxia sobre el corazón.</i> .....	30
II.1.1. Efectos agudos de la hipoxia. ....	31
II.1.1.1. Efectos en la actividad metabólica. ....	31
II.1.1.2. Efectos en la actividad eléctrica. ....	31
II.1.1.3. Efectos en la actividad mecánica. ....	32
II.1.2. Efectos crónicos de la hipoxia. ....	33
<i>II.2. Daño por reperfusión.</i> .....	34
<i>II.3. Adaptación a la hipoxia. Precondicionamiento cardíaco.</i> .....	35
II.3.1. Mecanismos de adaptación a la hipoxia crónica. ....	36
II.3.2. Precondicionamiento cardíaco. ....	37
OBJETIVOS .....	41
RESULTADOS .....	43
I. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE CARDIOMIOCITOS NEONATALES. ....	43

II. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL CANAL MAXI-K EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES DE RATA NEONATAL.....	44
III. REGULACIÓN POR LA HIPOXIA DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ DEL CANAL MAXI-K EN MÚSCULO CARDÍACO.....	46
<i>III.1. Estudio de la expresión de la subunidad <math>\beta_1</math> de los canales maxi-K en respuesta a la hipoxia crónica en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal. ...</i>	46
III.1.1. PCR semicuantitativa.....	46
III.1.2. Northern blot. ....	47
III.1.3. PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR). ....	48
<i>III.2. Estudio de la expresión de la subunidad <math>\beta_1</math> de los canales maxi-K en respuesta a hipoxia crónica en cardiomiocitos ventriculares dispersos de ratón neonatal.....</i>	49
<i>III.3. Estudio del efecto de la hipoxia crónica en el músculo cardíaco adulto. ....</i>	50
<i>III.4. La represión de la subunidad <math>\beta_1</math> por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal es dependiente del tiempo de exposición al estímulo..</i>	51
<i>III.5. La represión de la subunidad <math>\beta_1</math> por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal es dependiente de la concentración de oxígeno. ....</i>	52
<i>III.6. Estudio del efecto de la hipoxia en ratas expuestas a hipoxia crónica. ....</i>	54
IV. MECANISMO MOLECULAR RESPONSABLE DE LA REPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN POR LA HIPOXIA DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ EN MÚSCULO CARDÍACO. ....	55
<i>IV.1. La regulación de la expresión de la subunidad <math>\beta_1</math> por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal se ejerce a nivel transcripcional. ....</i>	55
<i>IV.2. La regulación de la expresión de la subunidad <math>\beta_1</math> por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal requiere síntesis “de novo” de proteínas. ....</i>	57
<i>IV.3. La regulación de la expresión de la subunidad <math>\beta_1</math> por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal no depende de calcio extracelular. ....</i>	58
<i>IV.4. Las especies reactivas del oxígeno participan en el mecanismo de represión de la subunidad <math>\beta_1</math> por la hipoxia en cardiomiocitos de rata neonatal dispersos. ...</i>	61
<i>IV.5. La regulación de la expresión de la subunidad <math>\beta_1</math> por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal depende de la familia de factores HIF-<math>\alpha</math>.....</i>	63
IV.5.1. Estudio de la expresión de la familia de factores de transcripción HIF- $\alpha$ en cardiomiocitos de rata neonatal dispersos. ....	63

IV.5.2. Estabilización de las proteínas HIF- $\alpha$ durante la hipoxia en cardiomiocitos de rata neonatal dispersos.....	64
IV.5.3. Estudio del efecto de los compuestos miméticos de la hipoxia sobre el músculo cardíaco.....	66
IV.5.3.1. La dimetiloxalilglicina (DMOG) induce la estabilización de las proteínas HIF- $\alpha$ en normoxia en cardiomiocitos dispersos de rata neonatal. .	66
IV.5.3.2. Estudio del efecto de los compuestos miméticos de la hipoxia sobre la regulación de la expresión de la subunidad $\beta_1$ en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal.....	67
IV.5.3.3. Estudio del efecto de los compuestos miméticos de la hipoxia sobre la regulación de la expresión de la subunidad $\beta_1$ en el músculo cardíaco adulto. ....	68
IV.5.4. La regulación de la expresión de la subunidad $\beta_1$ por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal depende de HIF-2 $\alpha$ , no de HIF-1 $\alpha$ . ....	69
V. REGULACIÓN POR LA GLUCOSA DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES DISPERSOS DE RATA NEONATAL.....	74
VI. IMPORTANCIA FISIOPATOLÓGICA DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ POR LA HIPOXIA EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES DISPERSOS DE RATA NEONATAL: ENSAYOS FUNCIONALES.....	76
<i>VI.1. Precondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal.....</i>	<i>77</i>
VI.1.1. La hipoxia crónica y severa aumenta la viabilidad de los cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal durante la isquemia simulada.....	77
VI.1.2. Precondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos ventriculares dispersos de ratón neonatal.....	79
<i>VI.2. Caracterización del precondicionamiento hipóxico. ....</i>	<i>80</i>
VI.2.1. Dependencia del precondicionamiento hipóxico del tiempo de exposición al estímulo hipóxico. ....	80
VI.2.2. Dependencia del precondicionamiento hipóxico de la estabilización de la familia de factores de transcripción HIF- $\alpha$ .....	81
VI.2.3. Dependencia del precondicionamiento hipóxico de la estabilización de HIF-2 $\alpha$ . ....	82
<i>VI.3. Contribución de la represión por la hipoxia de la subunidad <math>\beta_1</math> del canal maxi-K al precondicionamiento hipóxico. ....</i>	<i>83</i>

VI.3.1. El preconditionamiento hipóxico en cardiomiocitos dispersos de ratón neonatal knock-out para la subunidad $\beta_1$ . .....	84
VI.3.2. Efecto del siRNA específico para la subunidad $\beta_1$ sobre el preconditionamiento hipóxico en cardiomiocitos dispersos de rata neonatal. ....	86
VII. ESTUDIO DE LAS POSIBLES INTERACCIONES DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ DEL CANAL MAXI-K CON OTRAS PROTEÍNAS EN MÚSCULO CARDÍACO. ....	88
DISCUSIÓN. ....	91
I. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL CANAL MAXI-K EN EL MÚSCULO CARDÍACO. ....	91
II. REGULACIÓN POR LA HIPOXIA DE LA SUBUNIDAD $B_1$ DEL CANAL MAXI-K EN EL MÚSCULO CARDÍACO. ....	92
III. EFECTO DE LA HIPOXIA CRÓNICA SOBRE LA REGULACIÓN DE LA SUBUNIDAD $B_1$ EN EL ANIMAL COMPLETO. ....	93
IV. MECANISMO MOLECULAR SUBYACENTE A LA REPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $B_1$ POR LA HIPOXIA. ....	93
V. REGULACIÓN POR LA GLUCOSA DE LA SUBUNIDAD $B_1$ DEL CANAL MAXI-K EN EL MÚSCULO CARDÍACO. ....	96
VI. EFECTO DE LA HIPOXIA CRÓNICA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DEL MÚSCULO CARDÍACO DURANTE LA ISQUEMIA. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO. ....	97
VII. CONTRIBUCIÓN DE LA REPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ POR LA HIPOXIA AL PRECONDICIONAMIENTO HIPÓXICO. ....	98
VIII. PAPEL CARDIOPROTECTOR DEL CANAL MAXI-K. IMPORTANCIA FUNCIONAL DE LA REPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ POR LA HIPOXIA CRÓNICA. ....	99
CONCLUSIONES .....	105
MATERIALES Y MÉTODOS .....	107
I. PREPARACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CARDIOMIOCITOS DE RATA NEONATAL. ....	107
II. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR. ....	108
II.1. Hibridación "in situ" no radiactiva. ....	108
II.1.1. Síntesis de la sonda. ....	108
II.1.2. Procedimiento. ....	109
II.2. Extracción de RNA total. ....	110
II.3. Northern blot. ....	111
II.3.1. Generación de las sondas. ....	111
II.3.2. Procedimiento. ....	112
II.4. Retrotranscripción. ....	113
II.5. PCR convencional. ....	113

II.6. PCR cuantitativa (qPCR). .....	114
II.7. Genotipado de los ratones knock-out para la subunidad $\beta_1$ . .....	116
II.7.1. Extracción de DNA genómico. ....	116
II.7.2. PCR convencional. ....	117
II.8. Western blot. ....	117
II.9. Interferencia por RNA. ....	119
II.9.1. Procedimiento. ....	120
II.10. Doble híbrido. ....	121
III. TRATAMIENTOS CELULARES Y ADITIVOS UTILIZADOS. ....	122
III.1. Exposición a hipoxia. ....	122
III.2. Condición alto potasio extracelular. ....	122
III.3. Condición cero calcio nominal. ....	122
III.4. Compuestos que mimetizan la hipoxia. ....	123
III.5. Compuestos que inhiben la transcripción y la traducción celular. ....	123
III.6. Condición cero glucosa. ....	123
IV. ENSAYOS FUNCIONALES. ....	124
IV.1. Isquemia simulada. ....	124
IV.2. Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul tripán y cuantificación del número de células. ....	124
V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	124
BIBLIOGRAFÍA .....	127



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema del modelo de quimiotransducción en respuesta a la hipoxia en células neurosecretoras.....	16
<b>Figura 2:</b> Regulación de HIF- $\alpha$ dependiente de oxígeno.....	20
<b>Figura 3:</b> Esquema de la posible implicación de la mitocondria en los mecanismos sensores de la hipoxia crónica.....	21
<b>Figura 4:</b> Topología del canal maxi-K y mecanismo de activación del canal por calcio en el músculo liso vascular.....	24
<b>Figura 5:</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las diferentes subunidades $\beta_1$ clonadas en diferentes especies.....	25
<b>Figura 6:</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las tres variantes de splicing de la subunidad $\beta_1$ de rata. ....	27
<b>Figura 7:</b> Esquema del mecanismo de protección mediado por los canales mitoK <sub>Ca</sub> y mitoK <sub>ATP</sub> .....	28
<b>Figura 8:</b> Esquema del balance existente entre suministro y demanda de oxígeno en el corazón.....	34
<b>Figura 9:</b> Caracterización del cultivo de cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal. ....	43
<b>Figura 10:</b> Análisis por PCR convencional de la expresión de las distintas subunidades $\beta$ del canal maxi-K. ....	45
<b>Figura 11:</b> Análisis por PCR convencional de la composición molecular del canal maxi-K en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal y aorta de rata adulta.....	46
<b>Figura 12:</b> Análisis por PCR convencional semicuantitativa de la expresión de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K en normoxia e hipoxia. ....	47
<b>Figura 13:</b> Estudio por <i>Northern blot</i> de la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K. ....	48
<b>Figura 14:</b> Cuantificación por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K (A) y la HO-1 (B).....	49
<b>Figura 15:</b> Cuantificación por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K en cardiomiocitos dispersos de ratón neonatal. ....	50
<b>Figura 16:</b> Cuantificación por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K (A) y VEGF (B) en músculo cardíaco adulto. ....	51
<b>Figura 17:</b> Curso temporal de la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K (A) y la HO-1 (B) en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal. ....	52

<b>Figura 18:</b> Curso temporal de la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K (A) y la HO-1 (B) en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal a distintos porcentajes de $O_2$ .	53
<b>Figura 19:</b> Cuantificación por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K (negro) y la HO-1 (gris) en animal completo.	55
<b>Figura 20:</b> Análisis por RT-qPCR del efecto de la inhibición de la transcripción en la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ .	56
<b>Figura 21:</b> Cinética de descenso de los niveles de mensajero de la subunidad $\beta_1$ tras el bloqueo de la transcripción, en normoxia y en hipoxia.	57
<b>Figura 22:</b> Efecto del bloqueo de la traducción sobre la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ .	58
<b>Figura 23:</b> Efecto del alto potasio extracelular sobre la expresión de la subunidad $\beta_1$ (A) y de la HO-1 (B).	60
<b>Figura 24:</b> Regulación por la hipoxia de la expresión de la subunidad $\beta_1$ (A) y la HO-1 (B) en ausencia de calcio extracelular.	61
<b>Figura 25:</b> Efecto de las ROS sobre la expresión de la subunidad $\beta_1$ (A) y la HO-1 (B).	62
<b>Figura 26:</b> Análisis por PCR convencional de la expresión de las distintas isoformas de la familia de factores HIF- $\alpha$ .	64
<b>Figura 27:</b> Curso temporal de la estabilización de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y HIF-2 $\alpha$ inducida por la hipoxia.	65
<b>Figura 28:</b> Estabilización de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y HIF-2 $\alpha$ inducida por DMOG.	67
<b>Figura 29:</b> Efecto de los miméticos de la hipoxia sobre expresión de la subunidad $\beta_1$ (A) y la HO-1 (B) en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal.	68
<b>Figura 30:</b> Efecto del DMOG sobre la expresión de la subunidad $\beta_1$ (A) y VEGF (B) en músculo cardíaco adulto.	69
<b>Figura 31:</b> Protocolo seguido en los experimentos de RNA de interferencia para HIF-1 $\alpha$ y HIF-2 $\alpha$ .	70
<b>Figura 32:</b> Análisis por RT-qPCR de la especificidad de los siRNA para HIF-1 $\alpha$ y HIF-2 $\alpha$ tras 24 h de tratamiento.	71
<b>Figura 33:</b> Estabilización de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y HIF-2 $\alpha$ inducida por la hipoxia tras el tratamiento de siRNA para HIF-1 $\alpha$ y HIF-2 $\alpha$ .	72
<b>Figura 34:</b> Análisis por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ (A) y VEGF (B) tras el tratamiento de siRNA para HIF-1 $\alpha$ y HIF-2 $\alpha$ .	74
<b>Figura 35:</b> Efecto de la ausencia de glucosa sobre la regulación de la subunidad $\beta_1$ (A) y HO-1 (B).	75

<b>Figura 36:</b> Protocolo seguido en los experimentos funcionales de preconditionamiento hipóxico en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal. ....	77
<b>Figura 37:</b> Perfil de decaimiento de la viabilidad celular durante la isquemia simulada en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal. ....	78
<b>Figura 38:</b> Perfil de decaimiento de la viabilidad celular durante la isquemia simulada en cardiomiocitos ventriculares de ratón neonatal. ....	79
<b>Figura 39:</b> Dependencia del preconditionamiento hipóxico del tiempo de exposición al estímulo hipóxico. ....	81
<b>Figura 40:</b> Dependencia del preconditionamiento hipóxico de la estabilización de la familia de factores HIF- $\alpha$ . ....	82
<b>Figura 41:</b> Dependencia del preconditionamiento hipóxico de la estabilización de HIF- $2\alpha$ . ....	83
<b>Figura 42:</b> Genotipado de los ratones knock-out para la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K. ....	84
<b>Figura 43:</b> Preconditionamiento hipóxico en cardiomiocitos procedentes de ratón knock-out para la subunidad $\beta_1$ . ....	85
<b>Figura 44:</b> Análisis por RT-qPCR de la especificidad del tratamiento de siRNA para la subunidad $\beta_1$ . ....	86
<b>Figura 45:</b> Contribución de la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K al preconditionamiento hipóxico. ....	87
<b>Figura 46:</b> Modelo de cardioprotección inducida por la represión de la subunidad $\beta_1$ . .	102



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Principales agonistas y antagonistas de los canales de potasio efectores del PF en el corazón .....	40
<b>Tabla 2:</b> Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR convencional. ....	114
<b>Tabla 3:</b> Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR cuantitativa. ....	116
<b>Tabla 4:</b> Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones knock-out para la subunidad $\beta_1$ .....	117
<b>Tabla 5:</b> Anticuerpos utilizados para el análisis de proteínas mediante <i>Western-blot</i> ...	119
<b>Tabla 6:</b> Oligonucleótidos de RNA utilizados para el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ y la subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K. ....	121



## ABREVIATURAS

- ARNT:** translocador al núcleo del receptor de hidrocarburos aromáticos (“*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*”).
- bHLH:** proteínas básicas de hélice-lazo-hélice.
- CaMK:** proteína quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina.
- ChTX:** caribdotoxina.
- EPO:** eritropoyetina.
- Células ES:** células madre embrionarias (“*Embryonic Stem*”).
- CF:** ciclofilina.
- CHX:** cicloheximida.
- COX-2:** ciclo-oxigenasa-2.
- DEPC:** dietilpirocarbonato.
- DMOG:** dimetiloxalilglicina.
- DRB:** 5´6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosil benzamidazol.
- dNTPs:** desoxiribonucleótidos.
- FIH:** Factor Inhibidor de HIF, o asparragil-hidroxilasa.
- GlcRE:** elemento de respuesta a glucosa (“*Glucose Response Element*”).
- HBS:** secuencias de unión a HIF (“*HIF Binding Site*”).
- HIF:** factor inducible por hipoxia (“*Hypoxia Inducible Factor*”).
- HO-1:** hemo-oxigenasa-1.
- HRE:** elemento de respuesta a hipoxia (“*Hypoxia Response Element*”).
- iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible.
- K<sub>ATP</sub>:** canal de potasio regulado por ATP.
- KCNMA1 (Sl $\alpha$ 1):** gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  del canal maxi-K.
- KCNMB1-4:** genes que codifican para las subunidades  $\beta$  (1-4) del canal maxi-K.
- maxi-K:** canal de potasio de gran conductancia activado por calcio y por voltaje.
- mitoK<sub>ATP</sub>:** canal de potasio mitocondrial regulado por ATP.
- mitoK<sub>Ca</sub>:** canal maxi-K mitocondrial.
- mPTP:** poro de transición mitocondrial.
- NO:** óxido nítrico.
- PF:** acondicionamiento farmacológico.
- PGC-1 $\alpha$ :** coactivador 1 $\alpha$  del receptor  $\gamma$  de la proliferación del peroxisoma (“*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator -1 $\alpha$* ”).
- PHDs:** prolil hidroxilasas.
- PH:** acondicionamiento hipóxico.
- PI:** acondicionamiento isquémico.
- PKA:** proteína quinasa A.
- PKC:** proteína quinasa C.
- PPAR $\alpha$ :** receptor  $\alpha$  de la proliferación del peroxisoma (“*peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ”).
- pVHL:** proteína supresora de tumores (“*Von Hippel Lindau*”).
- ROS:** especies reactivas de oxígeno.
- RT-PCR:** retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa.
- RT-qPCR:** retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
- siRNA:** RNA interferente (“*small-interfering RNA*”).
- SOD:** superóxido dismutasa.
- TTX:** tetrodotoxina.
- VDCC:** canal de calcio dependiente de voltaje.
- VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular.



# INTRODUCCIÓN



## **I. RESPUESTAS CELULARES A LA DISMINUCIÓN DE OXÍGENO.**

### ***I.1. Tipos de respuestas frente a la hipoxia.***

La hipoxia tisular (disminución local del oxígeno en los tejidos) constituye la base fisiopatológica de enfermedades con elevado índice de mortalidad en el mundo desarrollado, como son el infarto de miocardio, los accidentes cerebrovasculares, la hipertensión pulmonar crónica, y las patologías asociadas a la reperfusión de órganos trasplantados. Todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos han desarrollado respuestas fisiológicas adaptativas a la falta de esta molécula esencial para la vida. Las respuestas a la hipoxia pueden ser de dos tipos; respuestas agudas, que se producen inmediatamente después del estímulo hipóxico (en el transcurso de segundos o minutos), y respuestas crónicas, que se producen cuando la hipoxia persiste durante periodos más prolongados de tiempo (horas o días). Las respuestas agudas o rápidas están principalmente mediadas por canales iónicos y constituyen la primera línea de defensa del organismo frente al descenso de oxígeno en los tejidos. Estas generan cambios respiratorios y cardiovasculares rápidos para asegurar el aporte de oxígeno a órganos vitales como el corazón o el cerebro (Bunn and Poyton, 1996; Lopez-Barneo et al., 2004; Semenza, 1999a; Wenger, 2002). Las respuestas crónicas, por otra parte, conllevan cambios en los patrones de expresión génica que se traducen en cambios bioquímicos encaminados a incrementar el suministro de oxígeno a los tejidos hipóxicos, permitiendo, en último término, reducir las necesidades celulares de oxígeno. Los mediadores de este tipo de respuestas son factores de transcripción.

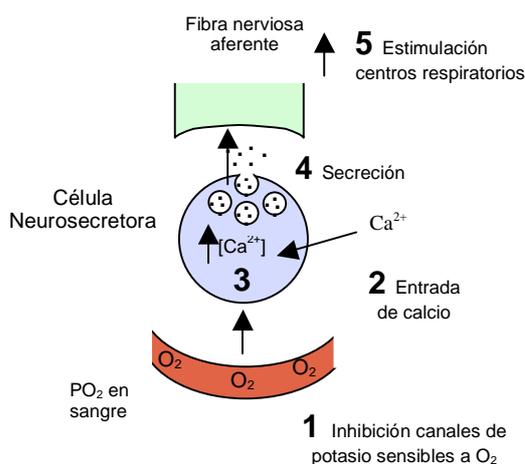
#### **I.1.1. Respuestas agudas a la hipoxia.**

Los principales responsables de las respuestas agudas a la hipoxia son células excitables especializadas, tales como las células neurosecretoras localizadas en órganos quimiorreceptores, las células de la musculatura lisa vascular y algunas neuronas.

Las células neurosecretoras sensibles a oxígeno median las respuestas cardiorrespiratorias rápidas en respuesta a la hipoxia (Bunn and Poyton, 1996; Lopez-Barneo et al., 2001; Lopez-Barneo et al., 2004; Wenger, 2002). Se trata de células excitables que poseen en su membrana plasmática canales de potasio sensibles a oxígeno y que se localizan en los principales órganos quimiorreceptores del organismo, como son el cuerpo carotídeo, los cuerpos aórticos y los cuerpos neuroepiteliales pulmonares. Ante una disminución en la presión parcial de oxígeno en la sangre

(hipoxemia) y en el aire inspirado estas células responden activando la liberación de neurotransmisores e induciendo un aumento de la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las fibras nerviosas aferentes (Fu et al., 1999; Montoro et al., 1996; Youngson et al., 1993). De esta forma, se estimulan los centros respiratorios del tronco del encéfalo para producir hiperventilación, así como una descarga simpática cuyo signo más aparente es la taquicardia.

El modelo de quimiotransducción propuesto para las células neurosecretoras comienza con el cierre de canales de potasio en respuesta a la hipoxia, lo que conduce a la despolarización de la membrana celular, la entrada de calcio en la célula y la liberación de neurotransmisores que activan fibras sensoriales aferentes (Delpiano and Hescheler, 1989; Ganfornina y Lopez-Barneo, 1991; Lopez-Barneo et al., 1988). (Figura 1). Numerosas evidencias experimentales apuntan a que los canales de potasio dependientes de voltaje y de calcio intracelular (canales de potasio maxi-K) participan en este tipo de respuesta en células glómicas de rata (Pardal et al., 2000).



**Figura 1: Esquema del modelo de quimiotransducción en respuesta a la hipoxia en células neurosecretoras.**

Comienza con una inhibición de canales de potasio (1) en la membrana de estas células. Esto conlleva la entrada de calcio extracelular (2) y aumento del calcio intracelular (3), que produce el incremento de la secreción de neurotransmisores (4) y activación de las fibras aferentes. Finalmente se produce la estimulación de los centros respiratorios del tronco del encéfalo (5). Modificada de Lopez-Barneo et al., 2001.

Además de las células neurosecretoras, también son sensibles a oxígeno algunas células de la musculatura lisa vascular. La hipoxia aguda produce principalmente vasodilatación de la mayoría de las arterias sistémicas y vasoconstricción de las arterias de resistencia del árbol vascular pulmonar. Esta estrategia permite por un lado incrementar el suministro de oxígeno a los tejidos hipóxicos, y por otro redistribuir el flujo sanguíneo pulmonar desde las zonas más hipóxicas hacia las más ventiladas. Además, la hipoxia produce liberación de sustancias vasoactivas del endotelio y tejidos vecinos que contribuyen a los cambios en el tono vascular.

Los canales iónicos responsables de los efectos agudos de la hipoxia sobre la musculatura vascular son los canales calcio dependientes de voltaje (Franco-Obregon y

Lopez-Barneo, 1996; Franco-Obregon et al., 1995; Urena et al., 1996) y los canales de potasio dependientes de potencial (Weir y Archer, 1995) y maxi-K (Gebremedhin et al., 1994).

Por último, en el sistema nervioso central, existen neuronas localizadas en la corteza cerebral y en el hipocampo que, en respuesta a la hipoxia aguda, se hiperpolarizan por la activación de los canales de potasio regulados por ATP (Haddad y Jiang, 1993).

### **I.1.2. Respuestas crónicas a la hipoxia.**

Los organismos reaccionan ante la hipoxia mantenida con respuestas adaptativas mediadas por cambios de expresión de determinados grupos de genes. Algunos de los efectos principales de esta reprogramación génica se conocen con detalle, como son el incremento de la producción de glóbulos rojos, la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y el aumento de la actividad glucolítica de las células. Muchos de estos genes se inducen por la hipoxia, como el gen de la eritropoyetina (EPO) (Iyer et al., 1998; Semenza et al., 1991; Wang y Semenza, 1993), responsable del aumento del número de glóbulos rojos en sangre, el gen que codifica el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Forsythe et al., 1996; Goldberg y Schneider, 1994; Kimura et al., 2000), que participa en la angiogénesis, y los genes que codifican las enzimas implicadas en la glucólisis (Hu et al., 2003).

La expresión de los genes sensibles a hipoxia depende de factores de transcripción regulados por oxígeno. El más estudiado es el factor inducible por hipoxia (*Hypoxia Inducible Factor*, HIF), identificado en 1995 por Semenza y colaboradores (Wang y Semenza, 1995), aunque también son sensibles a oxígeno otros factores de transcripción como AP-1, NF- $\kappa$ B (Laderoute et al., 2002; Salnikow et al., 2002) y Egr-1 (Yan et al., 1998; Yan et al., 1999).

## **I.2. Factores de transcripción HIF.**

### **I.2.1. Composición molecular y función de los factores HIF.**

HIF es un factor heterodimérico formado por dos proteínas, HIF- $\alpha$  y HIF- $\beta$  que pertenecen a la familia de proteínas básicas de hélice-lazo-hélice (bHLH) y dominios PAS. HIF- $\beta$  también es conocida como ARNT (*Aryl Receptor Nuclear Translocator*) o componente del receptor de hidrocarburos aromáticos, y se expresa constitutivamente. HIF- $\beta$  dimeriza con otras proteínas e interviene en otros procesos celulares como en la detoxificación de agentes xenobióticos (Hoffman et al., 1991; Johnson et al., 1992). HIF- $\alpha$  es la subunidad reguladora y su expresión se modifica por cambios en los niveles de oxígeno.

Se han descrito tres isoformas de HIF- $\alpha$ : HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ . Las dos primeras, HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  son proteínas análogas en organización genómica y estructura terciaria. Su regulación también es similar (Ema et al., 1999; O'Rourke et al., 1999; Wiesener et al., 1998). HIF-1 $\alpha$  se expresa ubicuamente y es considerado el regulador principal de la respuesta crónica a la hipoxia (Semenza, 2004). En cambio, la expresión de HIF-2 $\alpha$  está restringida a determinados tejidos y órganos, como el endotelio vascular, pulmón, corazón, hígado y sistema nervioso periférico (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Jain et al., 1998; Tian et al., 1997). Además, en casi todas las líneas celulares transformadas existe expresión de HIF-2 $\alpha$  (Talks et al., 2000; Wiesener et al., 1998). Estos datos han sugerido por lo tanto que HIF-2 $\alpha$  podría desempeñar funciones específicas en diversos tipos celulares, además de participar en tumorigénesis. HIF-3 $\alpha$  presenta un menor grado de homología con HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  y su regulación es menos conocida (Maynard et al., 2003). HIF-3 $\alpha$  posiblemente actúa como un represor del sistema de HIF (Makino et al., 2001).

Los heterodímeros HIF- $\alpha$ /HIF- $\beta$  se unen a secuencias específicas denominadas HRE (*Hypoxia Response Element*) localizadas en los promotores de los genes sensibles a oxígeno. Estas secuencias se han identificado en prácticamente todos los genes regulados por hipoxia y constan de dos o más secuencias de unión a HIF, llamadas HBS (*HIF Binding Site*), cuya secuencia es 5`-RCGTG-3`.

La generación de animales que carecen o sobreexpresan HIF-1 $\alpha$  o HIF-2 $\alpha$  han proporcionado gran cantidad de datos sobre la función fisiológica de estas moléculas en el organismo. Gracias a estas técnicas se ha podido conocer que HIF-1 $\alpha$  es una molécula clave en el desarrollo, pues los ratones knock-out para HIF-1 $\alpha$  (-/-) mueren en el periodo prenatal, como consecuencia de malformaciones cardiovasculares y del tubo

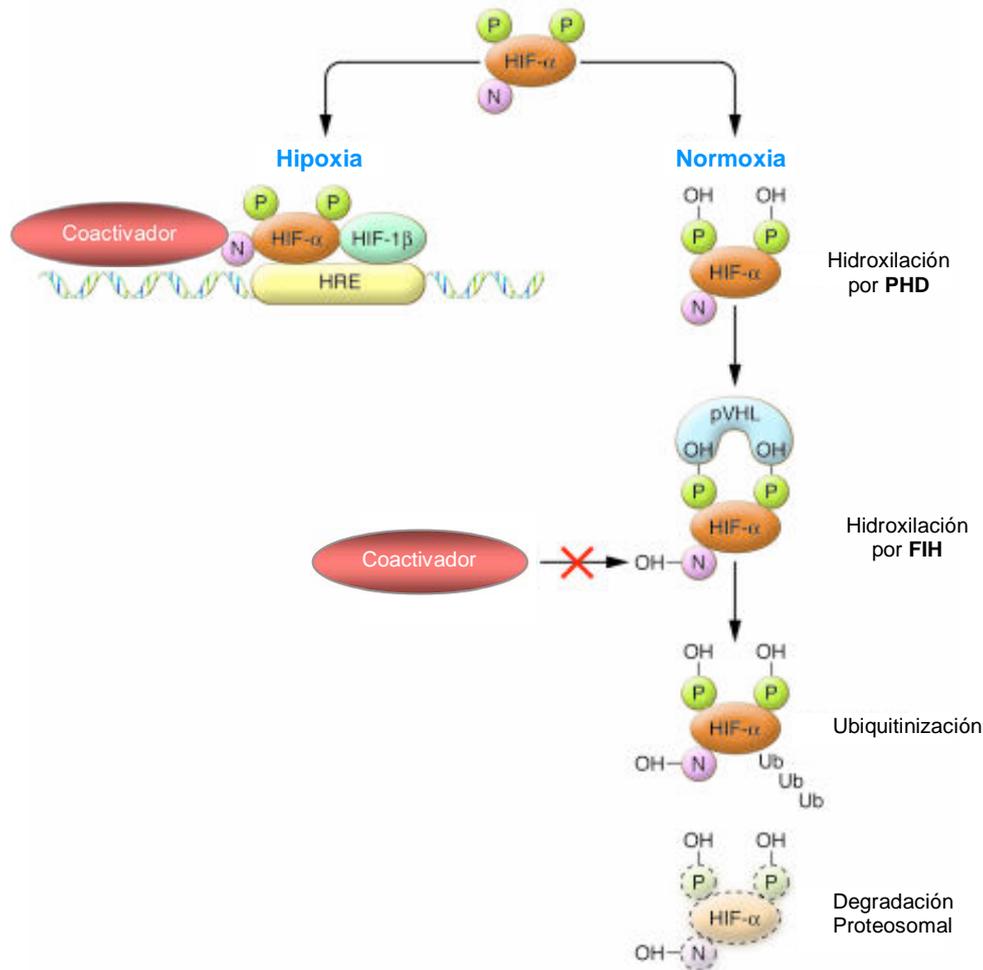
neural, y de la muerte celular en el mesénquima cefálico (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). En cambio, los ratones heterocigotos (+/-) son viables, pero presentan alteraciones en las respuestas a la hipoxia crónica respecto a los ratones silvestres. Algunas de estas alteraciones son la disminución de la hipertrofia ventricular, de la hipertensión pulmonar, y del desarrollo de policitemia tras la exposición de estos animales a hipoxia crónica. Por otro lado, los primeros ratones knock-out para HIF-2 $\alpha$  (-/-) generados también mueren durante el desarrollo embrionario, al presentar una maduración deficiente de los pulmones y los vasos sanguíneos (Compernelle et al., 2002; Peng et al., 2000), fallo cardíaco y una homeostasis alterada de catecolaminas (Tian et al., 1998). Posteriormente, y gracias a la modificación del fondo genético de estos ratones se consiguieron animales HIF-2 $\alpha$  (-/-) viables. No obstante estos animales presentan defectos en el desarrollo postnatal; son más pequeños que los silvestres y tienen hipertrofia cardíaca y hepática (Scortegagna et al., 2003a; Scortegagna et al., 2005; Scortegagna et al., 2003b). Diversos estudios sobre células madre embrionarias (*Embryonic Stem*, ES) que carecen de los factores HIF han revelado además que HIF-1 $\alpha$ , y no HIF-2 $\alpha$ , tiene un papel crítico en las respuestas generales frente a la hipoxia (Brusselmans et al., 2001; Carmeliet et al., 1998; Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). No obstante, HIF-2 $\alpha$  regula la expresión de la tirosina hidroxilasa en el órgano de ZuckerKandl (Peng et al., 2000; Tian et al., 1998) y de VEGF en pneumocitos (Compernelle et al., 2002) en el periodo embrionario. Todos estos estudios han revelado por tanto que HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  son proteínas con funciones *in-vivo* no redundantes (Hu et al., 2003; Wiesener et al., 1998).

### **1.2.2. Regulación de HIF- $\alpha$ dependiente de oxígeno.**

El principal mecanismo de regulación de HIF es postraduccional y depende de los niveles de oxígeno disponible. En condiciones de normoxia, HIF- $\alpha$  se transcribe y traduce constitutivamente, pero es degradado por el proteosoma. Dicha degradación está dirigida por la hidroxilación de dos prolinas específicas (las prolinas 402 y 564 en HIF-1 $\alpha$  y las 405 y 530 en HIF-2 $\alpha$ ) localizadas en regiones conservadas de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). La hidroxilación de estas prolinas por las prolin hidroxilasas (PHDs) facilita la interacción de HIF- $\alpha$  con la proteína supresora de tumores VHL (Von Hippel Lindau) (Maxwell et al., 1999), la cual forma parte de un complejo proteico E3 ubiquitín ligasa. Este complejo marca a HIF- $\alpha$  mediante poliubiquitinización para su entrada en el proteosoma. En hipoxia, HIF- $\alpha$  no interaccionan con pVHL y, por tanto, no se ubiquitiniza. De esta forma, la proteína se

## Introducción

estabiliza y se une a HIF-1 $\beta$  formando un complejo que se traslada al núcleo y activa la transcripción de los genes diana (Figura 2).



**Figura 2: Regulación de HIF- $\alpha$  dependiente de oxígeno.**

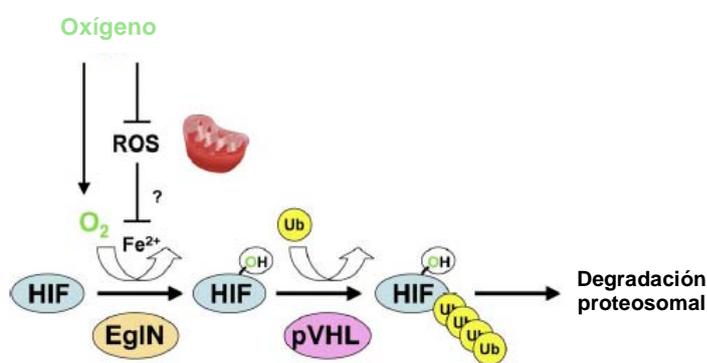
En normoxia las prolil hidroxilasas (PHDs) hidroxilan a HIF-1 $\alpha$  y del mismo modo a HIF-2 $\alpha$ , lo que permite su degradación en el proteosoma. Por otro lado la asparagil hidroxilasa (FIH) hidroxila a ambos factores inhibiendo su actividad transcripcional. En hipoxia HIF- $\alpha$  escapa a este tipo de regulación, se estabiliza y trasloca al núcleo, donde activa la transcripción de sus genes diana. Modificada de Ratcliffe, 2007.

Otro tipo de hidroxilación modula la interacción de HIF con el coactivador de la transcripción p300 (Ebert y Bunn, 1998), y por lo tanto su actividad transcripcional. En este caso, en normoxia la asparagil hidroxilasa o FIH (Factor Inhibidor de HIF) (Hewitson et al., 2002; Mahon et al., 2001) hidroxila el residuo de la asparagina 803 de HIF-1 $\alpha$  (y de la asparagina 851 en HIF-2 $\alpha$ ), impidiendo así la interacción de éste con p300 y la activación de la transcripción de los genes diana. De esta manera, las

moléculas de HIF- $\alpha$  que en normoxia pudieran escapar de la degradación en el proteasoma no activarían la transcripción de los genes diana (Dann et al., 2002; Lando et al., 2002).

Las prolin hidroxilasas pertenecen a la familia de las dioxigenasas dependientes de hierro, que emplean  $\alpha$ -cetoglutarato y oxígeno como co-sustratos. Por lo tanto la actividad enzimática de estas enzimas puede ser inhibida, además de por la hipoxia, por agentes quelantes de hierro como la desferroxamina, por compuestos análogos al  $\alpha$ -cetoglutarato, como la dimetiloxalilglicina (DMOG), y por otros compuestos como el cloruro de cobalto, que actúa modificando el estado de oxidación del hierro. La aplicación de estos compuestos induce en cada caso la estabilización de HIF- $\alpha$  en normoxia, por lo que se han utilizado ampliamente como compuestos miméticos de la hipoxia (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Lopez-Barneo et al., 2001; Semenza, 1999a; Wenger, 2002).

Aunque, desde su descubrimiento, a las prolin hidroxilasas se les ha atribuido la función sensora de la disminución del oxígeno durante la hipoxia crónica, en los últimos años numerosos estudios han propuesto la participación de la mitocondria en los mecanismos sensores de este tipo de hipoxia (Figura 3). Según estos estudios las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en la mitocondria durante la hipoxia podrían inactivar a las prolin hidroxilasas al provocar el cambio del estado redox del hierro del centro activo e inducir así la estabilización de HIF (Brunelle et al., 2005; Guzy et al., 2005; Kaelin, 2005; Mansfield et al., 2005). Este mecanismo sería diferente del que sucede durante la anoxia o el mediado por la acción de los miméticos. En cualquier caso en la actualidad existe controversia sobre la función de las prolin hidroxilasas, la mitocondria, o ambos, como sensores universales del oxígeno durante la hipoxia mantenida.



**Figura 3: Esquema de la posible implicación de la mitocondria en los mecanismos sensores de la hipoxia crónica.**

La generación de ROS que se produce en hipoxia en la mitocondria afectaría al estado de oxidación del hierro necesario para una correcta actividad de las prolin hidroxilasas. Como resultado se produciría la estabilización de HIF. Modificado de Kaelin, 2005.

### **1.3. Efectos de la hipoxia crónica sobre la regulación génica de los canales iónicos.**

Muchos tejidos excitables sensibles a hipoxia expresan canales iónicos sobre los que recae gran parte de la respuesta celular a la hipoxia aguda. Por esta razón, se considera probable que la adaptación a largo plazo a la falta de oxígeno conlleve cambios en la expresión de estos canales iónicos.

Se ha descrito que en células musculares lisas de arteria pulmonar la hipoxia induce la expresión de canales TRPC (Aaronson, 2006; Wang et al., 2006). En estas células también se ha observado una disminución en la expresión por la hipoxia del mRNA de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv1.2 y Kv1.5 (Wang et al., 1997; Wang et al., 2005). Por el contrario, los niveles del mRNA del canal Kv1.2 en la línea celular PC12 aumentan tras la exposición de las células a un 10 % de O<sub>2</sub> durante 18 horas (Conforti y Millhorn, 1997). En esta línea celular, estudios realizados en nuestro laboratorio han revelado que la hipoxia crónica induce la expresión de la subunidad  $\alpha$ 1H del canal de calcio tipo T (Del Toro et al., 2003). En paralelo, nuestro grupo ha observado que la hipoxia crónica reprime la expresión de la subunidad  $\beta$ <sub>2</sub> del canal de potasio maxi-K en células cromafines de rata (datos no publicados). También se ha descrito un aumento del mRNA de una subunidad del canal de potasio dependiente de ATP en una línea celular de cardiomiocitos (Crawford et al., 2003). La hipoxia crónica induce la expresión de la subunidad auxiliar  $\beta$ <sub>1</sub> del canal de potasio maxi-K cuando es transfectado heterológamente en células HEK293 (Hartness et al., 2003). Estas últimas observaciones están en contradicción con trabajos realizados en nuestro grupo, que han puesto de manifiesto que la subunidad  $\beta$ <sub>1</sub> se reprime por la hipoxia crónica en células de músculo liso de aorta torácica y basilar de rata (Navarro-Antolin et al., 2005). El presente trabajo se ha enfocado al estudio de la regulación de la expresión por la hipoxia del canal de potasio dependiente de voltaje y calcio (maxi-K) en el músculo cardíaco.

#### **1.3.1. Canales maxi-K dependientes de calcio y de voltaje.**

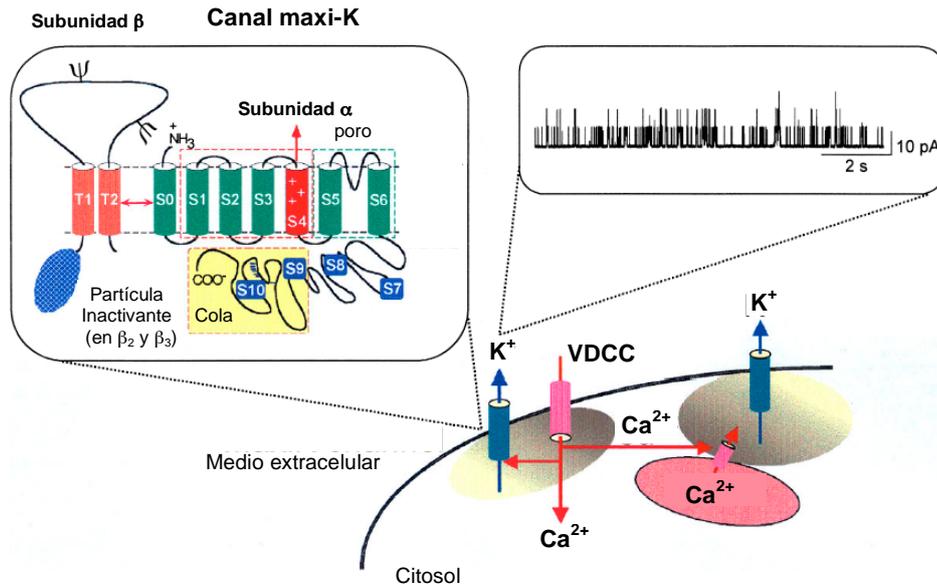
Los canales maxi-K son canales de potasio de gran conductancia dependientes de potencial y de calcio. Se expresan ubicuamente, y su función se ha estudiado en numerosos tejidos de mamíferos, como en los músculos liso y esquelético, neuronas, riñón y células secretoras. En cada uno de estos tejidos el canal maxi-K presenta una estructura molecular concreta y regula funciones celulares específicas. Estos canales

son sensibles al voltaje y también al calcio, de manera que pueden ser activados por la despolarización de la membrana plasmática y/o el aumento del calcio intracelular (Orio et al., 2002).

El canal maxi-K está compuesto por dos tipos de subunidades, una subunidad  $\alpha$ , que forma el poro, y otra reguladora o auxiliar denominada  $\beta$  (Figura 4). El canal funcional es un tetrámero de subunidades  $\alpha$  que posiblemente se asocia a 4 subunidades  $\beta$ . La subunidad principal  $\alpha$  está codificada por un gen, Slo1 (KCNMA1) clonado originalmente en *Drosophila* (Adelman et al., 1992). Su mRNA sufre *splicing* alternativo en al menos 10 sitios, localizados en los extremos 5' y 3' (Shipston, 2001; Zarei et al., 2004), generándose así numerosas isoformas que confieren al canal propiedades cinéticas distintas. Esta subunidad consta de 7 segmentos transmembrana (S0-S7) y un largo extremo carboxilo terminal con 4 segmentos hidrofóbicos (S7-S10). En esta zona se encuentra la región del canal que le confiere la sensibilidad al calcio. En el segmento S4 se encuentra el sensor de voltaje, y los dominios que unen los segmentos S5 y S6 de las 4 subunidades  $\alpha$  se agrupan formando el poro del canal. El segmento S0 permite la interacción de la subunidad  $\alpha$  con la subunidad  $\beta$ .

Las subunidades  $\beta$  están codificadas por 4 genes distintos (KCNMB1-4), dando lugar a las diferentes subunidades ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ) (Brenner et al., 2000; Jiang et al., 1999; Tseng-Crank et al., 1996; Uebele et al., 2000; Wallner et al., 1999; Weiger et al., 2000). Las subunidades  $\beta$  confieren diferentes propiedades cinéticas y farmacológicas al canal maxi-K (Lippiat et al., 2003). Este hecho, junto con el *splicing* alternativo de la subunidad  $\alpha$  constituyen las bases moleculares de la gran diversidad de corrientes que pueden ser debidas a estos canales. Las subunidades  $\beta$  constan de 2 segmentos transmembrana y tanto el extremo amino como el carboxilo terminal están orientados hacia el lado citoplásmico. Las subunidades  $\beta_2$  y  $\beta_3$  presentan un dominio en la zona amino terminal con aminoácidos hidrofóbicos que pueden ocluir el poro del canal, dando como resultado corrientes que se inactivan rápidamente (Xia et al., 1999; Xia et al., 2003).

La subunidad  $\beta_1$  se expresa mayoritariamente en músculo liso vascular, tejido en el que regula la actividad contráctil (Brayden y Nelson, 1992; Valverde et al., 1999). La subunidad  $\beta_2$  se expresa fundamentalmente en células cromafines y en cerebro (Uebele et al., 2000). La presencia tanto de la subunidad  $\beta_1$  como de la subunidad  $\beta_2$  aumenta la sensibilidad al calcio del canal. La subunidad  $\beta_3$  se expresa en páncreas, testículo y bazo. Por último, la subunidad  $\beta_4$  se expresa mayoritariamente en cerebro (Weiger et al., 2000), y su presencia disminuye la sensibilidad al calcio del canal (Ha et al., 2004; Meera et al., 2000).



**Figura 4: Topología del canal maxi-K y mecanismo de activación del canal por calcio en el músculo liso vascular.**

En este tejido el canal colocaliza con el canal de calcio dependiente de voltaje (VDCC) y con los reservorios intracelulares de calcio (en rosa). Los “sparks” de calcio procedentes de los reservorios activan al canal maxi-K, hiperpolarizando la membrana plasmática y produciendo la vasorelajación. Modificada de Tanaka et al., 2004.

Los canales maxi-K tienen un papel clave en el control del potencial de membrana y en la regulación de la excitabilidad celular. Entre sus funciones están la regulación del tono vascular (Brayden y Nelson, 1992; Valverde et al., 1999), la neurosecreción (Robitaille et al., 1993), y la generación del mapa tonotópico de la coclea (Langer et al., 2003; Ramanathan et al., 1999). En el músculo liso, la activación del canal maxi-K constituye un mecanismo de retroalimentación negativa para evitar una vasoconstricción mantenida. Brevemente, cuando aumenta la concentración intracelular de calcio en las cercanías del canal maxi-K debido a la liberación localizada desde el retículo sarcoplásmico (“sparks de calcio”), el canal maxi-K se activa. Su apertura genera un flujo de potasio hacia el medio extracelular que hiperpolariza la membrana plasmática, lo que disminuye la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, contribuyendo de esta manera a la vasorelajación.

### I.3.2. Subunidad $\beta_1$ del canal maxi-K.

La subunidad  $\beta_1$  fue la primera de las subunidades  $\beta$  clonadas, y hasta nuestros días es la más estudiada. La secuencia de la proteína de la subunidad  $\beta_1$  se ha analizado en las diferentes especies y el alineamiento de estas secuencias indica un

alto grado de homología entre ellas (Jiang et al., 1999). Un 71 % de los residuos aminoacídicos son idénticos entre las diferentes especies y algunas zonas están altamente conservadas, como los 2 segmentos transmembrana y los sitios de posible glicosilación, fosforilación y unión de toxinas (Figura 5).

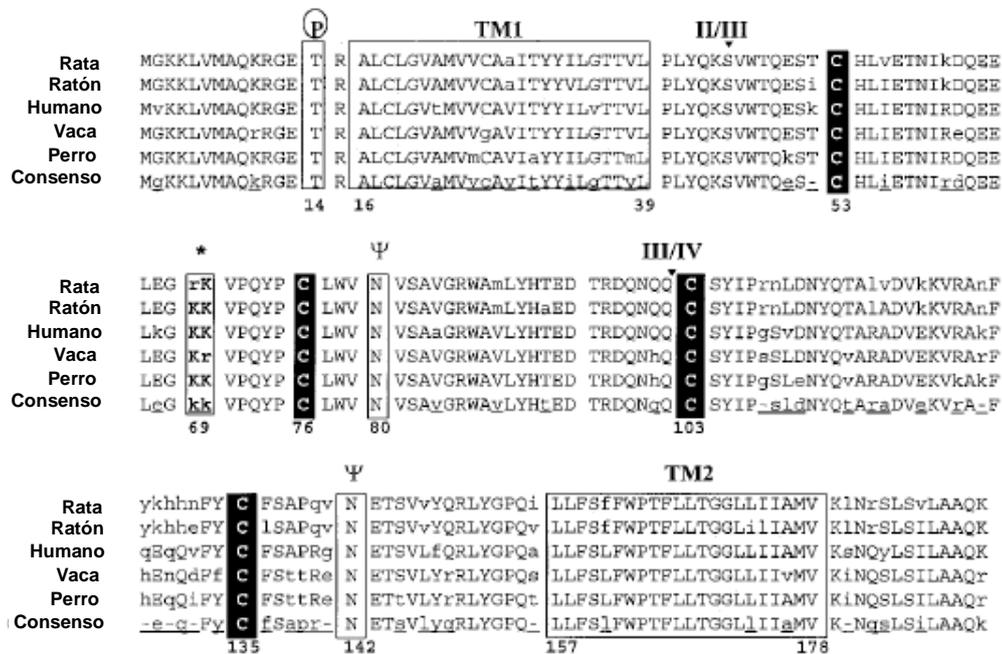


Figura 5: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las diferentes subunidades  $\beta_1$  clonadas en diferentes especies.

Secuencias de las proteínas deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de los diferentes genes clonados. Entre las zonas conservadas se encuentran los segmentos transmembrana (TM1 y TM2) y los posibles sitios de glicosilación ( $\Psi$ ) y fosforilación (P). El asterisco (\*) señala el posible lugar de unión de la caribdotoxina (ChTX). Los números romanos (II, III y IV) marcan las uniones entre intrones y exones, y las cajas negras, las cisteínas conservadas que posiblemente forman puentes disulfuro. Modificada de Jiang et al., 1999.

La sobreexpresión en sistemas heterólogos y la generación de animales knock-out para esta subunidad han dado mucha información sobre la función de la misma. Así, se ha visto que en sistemas heterólogos la expresión de la subunidad  $\beta_1$  confiere mayor sensibilidad al calcio a la subunidad  $\alpha$  (Cox y Aldrich, 2000; Jiang et al., 1999). Por otro lado, en animales con el gen de la subunidad  $\beta_1$  delecionado se ha observado, en células de arteria cerebral, una disminución en la sensibilidad al calcio del canal, además de un desacoplamiento entre la liberación del calcio desde los reservorios intracelulares (“sparks” de calcio) y la activación del canal (Brenner et al., 2000; Plugger et al., 2000).

Numerosas evidencias experimentales relacionan la alteración de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  o de su función con el desarrollo de la hipertensión arterial. Así, los animales knock-out para esta subunidad presentan una presión arterial aumentada e hipertrofia cardíaca (Pluger et al., 2000), características observadas también en humanos que han presentado hipertensión durante largo tiempo (Brenner et al., 2000). Además, se ha observado en humanos la existencia de un polimorfismo de un sólo nucleótido en este gen asociado a una baja prevalencia de hipertensión diastólica (Fernandez-Fernandez et al., 2004). También se ha comprobado que ratas tratadas crónicamente con angiotensina II, y como consecuencia hipertensas, presentan una expresión de la subunidad  $\beta_1$  disminuida (Amberg y Santana, 2003). Por otro lado, la activación aguda del canal inducida por estrógenos, la cual se produce sólo en presencia de la subunidad  $\beta_1$ , restaura el flujo coronario disminuido en mujeres postmenopausicas (Valverde et al., 1999).

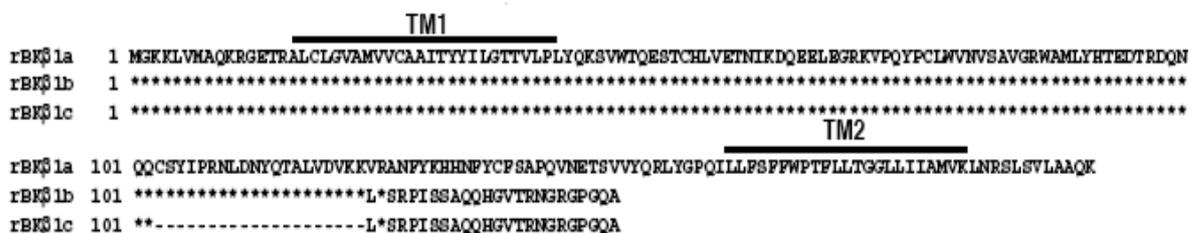
Nuestro grupo ha contribuido al estudio de los mecanismos moleculares por los cuales la hipoxia crónica puede contribuir al desarrollo de la hipertensión arterial. Experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la hipoxia reprime la expresión de la subunidad  $\beta_1$  en células de arterias basilar y aorta de rata y mamaria de humano. La menor expresión de la subunidad  $\beta_1$  produce una disminución de la probabilidad de apertura del canal maxi-K y una consecuente disminución de la capacidad vasorelajante del canal, lo cual favorece la vasoconstricción y la hipertensión (Navarro-Antolin et al., 2005).

### **I.3.3. El canal maxi-K en el músculo cardíaco.**

Hasta la fecha no se han registrado corrientes de potasio debidas a la actividad de los canales maxi-K en la membrana plasmática de las células del músculo cardíaco. Sin embargo, en este tejido se ha encontrado que existe una expresión considerable de subunidad  $\beta_1$ , y muy poca o nula expresión de subunidad  $\alpha$  (Jiang et al., 1999; Ohya et al., 2005). Numerosas evidencias experimentales han apuntado a que el canal maxi-K puede presentar una localización mitocondrial en algunos tejidos. En 1999 se detectaron por primera vez corrientes de potasio debidas a la actividad del canal maxi-K en una línea celular procedente de un glioma humano (Siemen et al., 1999). En estos experimentos se utilizaron preparaciones de membrana mitocondrial interna, denominados mitoplastos, sobre los que se registraron usando la técnica de *patch-clamp* dichas corrientes de potasio. Más tarde, en 2002, Xu y colaboradores identificaron, por primera vez, las corrientes debidas al canal maxi-K como una

componente de la conductancia basal al potasio en la membrana mitocondrial interna de cardiomiocitos de cobaya (Xu et al., 2002). En este trabajo realizaron en mitoplastos tanto registros electrofisiológicos como la medida del flujo de potasio usando un indicador fluorescente. Además, estos autores analizaron por *Western blot* la presencia de la subunidad  $\alpha$  del canal maxi-K en la fracción mitocondrial de un homogenado de corazón de cobaya, e identificaron una posible isoforma de esta proteína con un peso molecular notablemente menor al de la proteína nativa (55 KDa, frente a 120 KDa de la subunidad  $\alpha$  clásica). También se ha documentado la presencia de la subunidad  $\alpha$  del canal maxi-K en la fracción mitocondrial de homogenados fraccionados de cerebro de rata (Douglas et al., 2006).

En 2005, Ohya y colaboradores clonaron la subunidad  $\beta_1$  procedente del músculo cardíaco de rata y describieron la existencia de 2 variantes de *splicing* carentes del segundo segmento transmembrana (Ohya et al., 2005) (Figura 6). Estas variantes, denominadas  $\beta_{1b}$  y  $\beta_{1c}$  (con números de acceso en GeneBank AB010963 y AB050745, respectivamente) se expresan 10 veces menos que la variante completa, renombrada por los autores como  $\beta_{1a}$  (con número de acceso en GenBank NM\_019273). La colocalización de la subunidad  $\beta_1$  con la citocromo c oxidasa y diversas evidencias electrofisiológicas sugirieron que esta subunidad se localizaba en la mitocondria. A la misma conclusión llegaron Sato y colaboradores, que realizaron el mismo tipo de experimentos electrofisiológicos en mitoplastos de cardiomiocitos de rata (Sato et al., 2005).



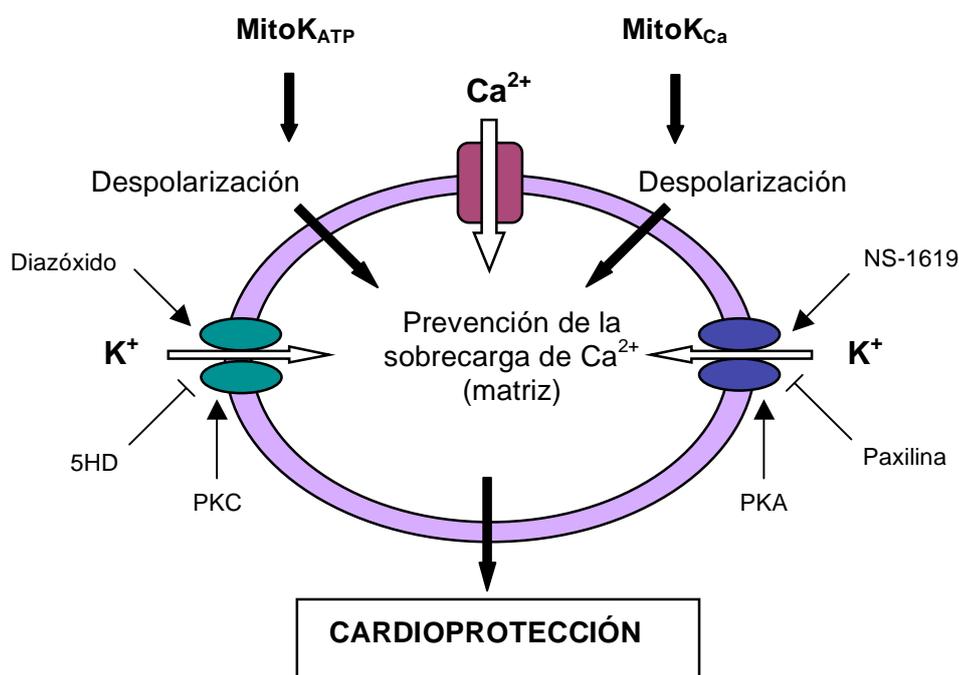
**Figura 6: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las tres variantes de splicing de la subunidad  $\beta_1$  de rata.**

Los asteriscos (\*) indican la identidad entre las secuencias, y el trazo discontinuo la ausencia de residuos. TM1 y TM2 corresponden a los segmentos transmembrana de la proteína. De Ohya et al., 2005.

En relación con la posible función en el corazón del canal maxi-K mitocondrial (mitoK<sub>Ca</sub>) se sugiere que al igual que el canal de potasio activado por ATP mitocondrial (mitoK<sub>ATP</sub>), media la cardioprotección frente al daño por isquemia y reperfusión (Cao et

al., 2005; Sato et al., 2005; Xu et al., 2002). Un episodio de isquemia y posterior perfusión en el músculo cardíaco es una situación fisiopatológica que induce daño tisular y que puede desembocar en un aumento de la muerte celular por necrosis y apoptosis. Entre las señales intracelulares que median este efecto se encuentran el aumento de calcio en el citosol de las células, la acumulación y sobrecarga de calcio en la mitocondria y el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas señales inducen la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP) y la liberación al citosol de citocromo c, señal que inicia la vía intrínseca mitocondrial de la apoptosis (Halestrap, 1999; Lemasters et al., 1998; Weiss et al., 2003), un proceso que requiere ATP. La apertura del mPTP puede inducir además la activación de la necrosis, en situaciones de depleción de ATP (Kim et al., 2003).

El mecanismo de protección propuesto para el canal mitoK<sub>Ca</sub> es similar al del canal mitoK<sub>ATP</sub>, aunque parece ser que ambos canales se activan y actúan de manera independiente (Sato et al., 2005). La apertura de ambos tipos de canales induce el flujo de potasio hacia la matriz mitocondrial, lo que despolariza la membrana de la mitocondria. Esta despolarización reduce el flujo de calcio hacia la matriz y disminuye su acumulación, frenando de esta manera la activación de la apoptosis y la necrosis (Figura 7).



**Figura 7: Esquema del mecanismo de protección mediado por los canales mitoK<sub>Ca</sub> y mitoK<sub>ATP</sub>.**

La apertura de ambos canales induce despolarización de la membrana de la mitocondria y reduce el flujo de calcio hacia la matriz, frenando su acumulación. La PKA potencia la activación del mitoK<sub>Ca</sub> y la PKC la del mitoK<sub>ATP</sub>. El NS-1619 y el diazóxido son fármacos que activan a los canales mitoK<sub>Ca</sub> y mitoK<sub>ATP</sub> respectivamente, mientras que la paxilina y el ácido 5-hidroxicanoico (5HD) los inhiben. Modificada de Sato et al., 2005.

Aunque los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos cardioprotectores del canal maxi-K en el corazón continúan estudiándose en la actualidad, se ha propuesto la implicación en ellos de la proteína quinasa A (PKA), el poro de transición mitocondrial (mPTP) y las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Cao et al., 2005; Sato et al., 2005; Stowe et al., 2006).

## II. RESPUESTAS DEL MÚSCULO CARDÍACO A LA DISMINUCIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE OXÍGENO.

El corazón es un órgano altamente especializado para la contracción, cuya función es proporcionar un adecuado suministro de sangre al resto de los órganos y tejidos del organismo. Para llevar a cabo esta función este órgano requiere, a su vez, un suministro de oxígeno adecuado que le permita obtener una gran cantidad de energía. Cuando la disponibilidad de oxígeno disminuye, el músculo cardíaco responde en un intento de preservar su importante función. La disminución de la disponibilidad de oxígeno (situación hipóxica) en el corazón puede deberse a diversas causas, entre las que se encuentran la disminución de la presión parcial de oxígeno en la sangre (hipoxemia) y la interrupción abrupta del flujo coronario al corazón (episodio isquémico). Los efectos inducidos en el músculo cardíaco por estos fenómenos son diferentes (Ostadal et al., 1999).

### **II.1. Efectos de la hipoxia sobre el corazón.**

La hipoxemia puede ser debida a varias causas. Entre estas se encuentran la disminución de la presión parcial de oxígeno en el aire inspirado (como ocurre en los lugares a gran altitud, en los que existe una hipoxia hipobárica), el ejercicio continuado, situación en la que aumenta la demanda de oxígeno por el corazón (atletas de élite) o la insuficiencia respiratoria, en la que la función alveolar se encuentra comprometida (por ejemplo en los pacientes que sufren enfermedad pulmonar obstructiva crónica). Cuando la hipoxemia es continuada en el tiempo puede dar lugar a una hipoxia sistémica en el organismo. La hipoxia sistémica es un fenómeno generalizado que afecta de forma difusa a todo el miocardio y está asociada con el *cor pulmonale*, la cianosis debida a la cardiopatía congénita hipoxémica, y a cambios inducidos en el sistema cardiopulmonar por una disminución en la presión barométrica en altitud.

La cardiopatía isquémica, denominación alternativa a la enfermedad coronaria aterosclerótica, constituye en la actualidad la principal causa de mortalidad en el mundo desarrollado. El término cardiopatía isquémica incluye a un grupo de síndromes, todos ellos causados por episodios de isquemia con diferente grado de severidad. Un episodio isquémico implica una disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo coronario al corazón. La hipoxia severa es la componente más agresiva de la isquemia, durante la cual existe además una disminución de nutrientes y un déficit en el lavado de los metabolitos de desecho. Si la duración del episodio isquémico es de pocos minutos los efectos de dicha isquemia pueden ser reversibles. Clínicamente esta isquemia breve

y transitoria se traduce como una angina de pecho (*angor pectoris*). Cuando la isquemia es completa y dura más de 20 minutos comienza la necrosis en el músculo cardíaco y se produce un Infarto agudo de miocardio. Si el infarto agudo es suficientemente extenso puede desembocar en un shock cardiogénico y en la muerte del paciente.

### **II.1.1. Efectos agudos de la hipoxia.**

#### **II.1.1.1. Efectos en la actividad metabólica.**

Durante un episodio hipoxico/isquémico, los efectos metabólicos son los primeros en aparecer. En estas condiciones se produce una inhibición de la fosforilación oxidativa y se sustituye la glucólisis aerobia por la anaerobia (Jennings y Reimer, 1991). Como resultado, disminuye el ATP y, al estar inhibido el ciclo de Krebs, el ácido pirúvico se convierte en ácido láctico. Durante la hipoxia fisiológica la glucólisis anaerobia se activa y es persistente (Opie, 1990). Sin embargo, durante la isquemia el aumento local rápido de ácido láctico, la disminución del pH y probablemente la presencia de otros metabolitos, inhibe el ciclo glucolítico a nivel de la fructosa-6-fosfato, deteniendo también la glucólisis anaerobia. Esto, junto con la presencia de radicales libres de oxígeno, producen una alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, aumentando la entrada de calcio y la concentración de este ión a nivel del citoplasma y de la mitocondria. Este incremento masivo de la concentración de calcio en la mitocondria inhibe la producción de ATP y dispara los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular. Durante la hipoxia fisiológica la perfusión del corazón es normal por lo que se produce un lavado de los productos de la glucólisis y del ácido láctico, retrasando la generación de la acidosis que se dispara durante la isquemia.

#### **II.1.1.2. Efectos en la actividad eléctrica.**

La hipoxia produce cambios profundos en la actividad eléctrica del músculo cardíaco. Sus efectos se han estudiado aplicando técnicas electrofisiológicas en preparaciones de cardiomiocitos aislados, así como sobre corazones aislados y perfundidos. El efecto principal de la hipoxia aguda sobre el músculo cardíaco es la modificación en la duración del potencial de acción cardíaco. Los mecanismos subyacentes a este efecto están mediados fundamentalmente por la apertura de canales iónicos de potasio y de sodio.

La hipoxia aguda puede inducir un acortamiento del potencial de acción cardíaco

debido principalmente al aumento de la conductancia basal al potasio. Dicha observación se extiende a diversas especies, como gato (Vleugels et al., 1980), rata (Conrad et al., 1983), conejo (Ruiz-Ceretti et al., 1983; Weiss et al., 1992) y cobaya (Deutsch y Weiss, 1993). En 1983 se identificó un nuevo canal de potasio en la membrana plasmática de los cardiomiocitos que era responsable de este efecto: el canal de potasio sensible a ATP ( $K_{ATP}$ ) (Noma, 1983). Según Noma, la hipoxia aguda induce la apertura de los canales  $K_{ATP}$  de la membrana plasmática de los cardiomiocitos. Se genera así un flujo de potasio hacia el exterior que tiende a hiperpolarizar la membrana. Como resultado se acelera la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco, que se traduce en un acortamiento de la duración de este potencial. La repolarización inhibe a los canales de calcio voltaje dependientes y se disminuye la entrada de calcio al citosol y la sobrecarga de calcio en el citoplasma, favoreciéndose la cardioprotección durante la hipoxia aguda. Aunque este mecanismo cardioprotector sigue siendo aceptado en la actualidad, también se ha descrito que el acortamiento del potencial de acción cardíaco puede tener un papel arritmogénico. De esta manera la aplicación de pinacidil, que induce la apertura de los canales  $K_{ATP}$  de la membrana plasmática, puede producir arritmias (Fischbach et al., 2004). Además de los canales  $K_{ATP}$ , durante la hipoxia aguda se activan los canales de potasio rectificadores hacia el interior IK1 (Ruiz-Petrich et al., 1991). Estos canales, y no los  $K_{ATP}$ , parecen ser los responsables del acortamiento del potencial de acción cardíaco durante la hipoxia aguda en ratón (Piao et al., 2007).

Durante la hipoxia aguda, se ha descrito que además de la conductancia al potasio, la conductancia al sodio puede aumentar y producir, de forma contraria al potasio, un alargamiento de la duración del potencial de acción cardíaco. Se ha comprobado que la hipoxia aguda aumenta la amplitud de la corriente hacia adentro de sodio persistente y sensible al bloqueante tetrodotoxina (TTX) (Hammarstrom y Gage, 2002; Ju et al., 1996). Este efecto también puede tener un papel en la generación de arritmias durante episodios de hipoxia e isquemia agudas (Carmeliet, 1999; Ju et al., 1996). Los canales de sodio responsables de esta conductancia podrían ser de varios tipos. Sin embargo, se ha demostrado que en células HEK transfectadas con un sólo tipo de canal, concretamente el canal recombinante hNav1.5, la hipoxia aguda aumenta la corriente de sodio (Fearon y Brown, 2004).

### **II.1.1.3. Efectos en la actividad mecánica.**

La hipoxia, fisiológica o isquémica, produce varios efectos sobre la actividad

mecánica del miocardio. Durante la isquemia en primer lugar se produce una alteración de la función diastólica, disminuyendo la capacidad de relajación del músculo cardíaco. Esto es debido a la disminución de los niveles de fosfatos de alta energía (ATP, creatinfosfato), lo cual inhibe los mecanismos encargados de reducir la concentración de calcio intracelular. Como consecuencia, aumenta la concentración intracelular de calcio y se favorece la contracción. Posteriormente tiene lugar la inhibición de la función sistólica, con una disminución de la contractilidad que puede desencadenar la ausencia de contracción (aquinesia) o alteración en la misma (disquinesia). Si la isquemia es transitoria, menor de 20 minutos, la capacidad contráctil se recupera al cabo de horas o días, dependiendo de la duración de la isquemia. A esta parálisis post-isquémica transitoria del músculo cardíaco se le denomina miocardio “aturdido” (en inglés *“myocardial stunning”*). Cuando la isquemia es completa y dura más de 20 minutos, comienza la necrosis del músculo cardíaco (infarto de miocardio). El tejido necrosado se sustituye posteriormente por tejido conectivo y la parálisis se hace definitiva.

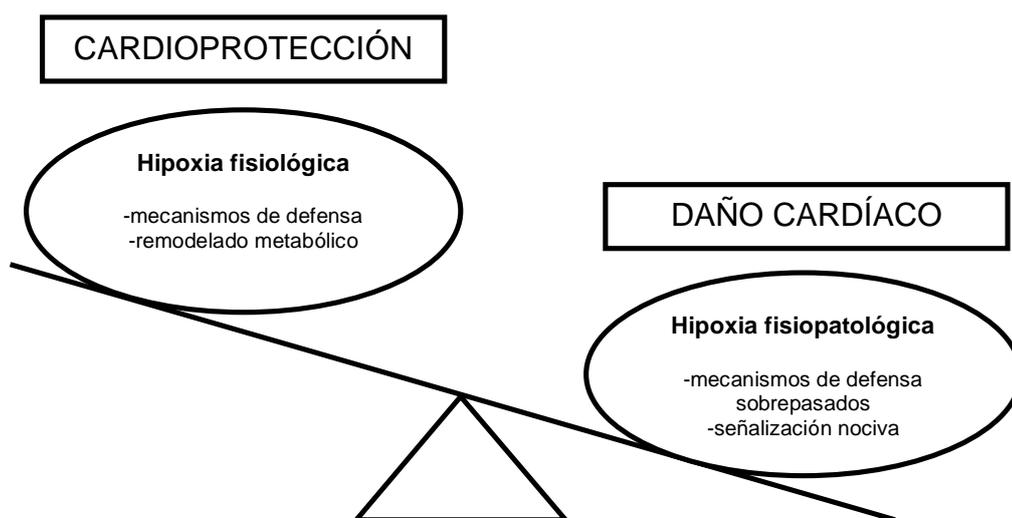
En los episodios en los que la isquemia no es completa (hipoxia fisiológica), el corazón puede permanecer viable pero aquinético. A esta situación, que es plenamente reversible se le denomina miocardio “hibernado” (en inglés *“myocardial hibernation”*). Se ha postulado que esta disfunción contráctil podría constituir un mecanismo de adaptación a la reducción del flujo coronario al corazón. La principal diferencia entre el corazón aturdido y el corazón hibernado es que tras el episodio isquémico el flujo sanguíneo es normal o casi normal en el primero (Bolli, 1992), mientras que se encuentra reducido en el segundo (Rahimtoola, 1989).

Se han propuesto varias hipótesis sobre los mecanismos responsables del miocardio “aturdido”: la generación de radicales libres del oxígeno durante la reperfusión, la alteración de la homeostasis del calcio, o posiblemente combinaciones de los dos procesos (Birnbaum y Kloner, 1996). El miocardio hibernado se desarrolla en respuesta a uno o más episodios de isquemia y reperfusión. Posiblemente resulta del progreso desde un estado repetitivo de miocardio aturdido, con flujo sanguíneo normal a un estado de miocardio hibernado con flujo sanguíneo reducido (Heusch et al., 2005).

### **II.1.2. Efectos crónicos de la hipoxia.**

El corazón es un órgano altamente sensible a los cambios en la disponibilidad de oxígeno. Ante una hipoxia moderada de larga duración (hipoxia fisiológica) el miocardio responde con la inducción de mecanismos de defensa y una reprogramación génica que le permitirá ejercer su función de manera óptima (Essop, 2007). Sin embargo, la disminución severa del aporte de oxígeno puede romper el delicado balance que existe

en este tejido entre suministro y demanda de oxígeno. En estas condiciones los mecanismos defensivos celulares se ven comprometidos y por lo tanto se generan cascadas de señalización que generalmente producen efectos nocivos sobre el corazón (hipoxia fisiopatológica) (Figura 8). De esta manera la hipoxia que se genera durante la isquemia, de naturaleza fisiopatológica, causa generalmente la mayoría de las patologías cardíacas, incluido el infarto de miocardio, la enfermedad cianótica cardíaca congénita y el *cor pulmonale* (Budev et al., 2003; Grifka, 1999; Ostadal et al., 1999).



**Figura 8: Esquema del balance existente entre suministro y demanda de oxígeno en el corazón.**

La hipoxia fisiológica induce mecanismos cardioprotectores y el remodelado metabólico. En situaciones en las que la demanda supera al suministro de oxígeno (hipoxia fisiopatológica) los mecanismos de defensa se ven sobrepasados y se generan cascadas de señalización que producen daño cardíaco. Modificada de Essop, 2007.

Los estudios centrados en los efectos fisiopatológicos de la hipoxia han revelado la participación en estos procesos de una intrincada red de rutas de señalización, mediadores intracelulares y orgánulos como la mitocondria (Solaini y Harris, 2005). Sin embargo los mecanismos reguladores subyacentes a la cardioprotección inducida por la hipoxia fisiológica son menos conocidos (ampliado en el apartado II.3.1 de esta "Introducción").

## **II.2. Daño por reperfusión.**

La reperfusión del corazón después de un episodio isquémico es un requisito indispensable para la recuperación funcional del corazón. Sin embargo, con el

advenimiento de las técnicas de revascularización coronaria (trombolisis y angioplastia percutánea), y en contra de lo esperado, se ha observado que el miocardio puede sufrir un mayor daño una vez que el flujo coronario se ha restablecido (Jennings et al., 1960).

La disfunción cardíaca más grave inducida por la reperfusión del corazón es el “daño letal por reperfusión”. Esta se caracteriza por la muerte de los cardiomiocitos previamente isquémicos tras la reperfusión, pese a que dichas células mantenían reversibilidad al daño. Estudios realizados en modelos animales han revelado que el daño letal por reperfusión contribuye a aumentar el tamaño del infarto hasta un 50 %, por lo que en la actualidad esta disfunción se ha convertido en la principal diana terapéutica en el tratamiento de la cardiopatía isquémica.

Los mediadores del daño letal por reperfusión son fundamentalmente el aumento brusco del oxígeno y del calcio (Cain et al., 1998; Sommers y Jennings, 1964), aunque también participa el rápido restablecimiento del pH celular tras la generación de ácido láctico por anaerobiosis en el periodo isquémico (Lemasters et al., 1996) y la inducción de procesos inflamatorios (Basu et al., 2000). Todos estos factores inducen una serie de eventos celulares que confluyen en la apertura del poro de transición mitocondrial y en la inducción de la hipercontractura celular (Piper et al., 2004), que consecuentemente dan lugar a la muerte de la célula. El incremento de la disponibilidad de oxígeno dispara la generación masiva de ROS (Flitter, 1993) y la disfunción mitocondrial (Lucas y Szweda, 1998), en la que además se restablece la generación de ATP. Los cardiomiocitos, sobrecargados de calcio desde el periodo isquémico, sufren una sobrecarga mayor inducida por el daño de la membrana plasmática de la célula y del retículo sarcoplásmico y por el funcionamiento inverso del intercambiador sodio-calcio. Posteriormente el calcio aumenta bruscamente también en el interior de la mitocondria, favoreciéndose la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP).

### ***II.3. Adaptación a la hipoxia. Precondicionamiento cardíaco.***

Aunque existe una estrecha relación entre hipoxia y enfermedad se sabe que tanto la hipoxia como la isquemia pueden también desencadenar mecanismos protectores. Además de los mecanismos de adaptación del corazón inducidos por hipoxia crónica, se sabe que episodios cortos de isquemia seguidos de intervalos de reperfusión pueden proteger al músculo cardíaco frente a un insulto isquémico posterior. Este fenómeno, denominado **precondicionamiento isquémico (PI)**, se ha estudiado en detalle, debido a su gran relevancia clínica (Yellon y Downey, 2003). Al igual que la isquemia, períodos cortos de hipoxia también protegen al corazón frente a una isquemia

posterior (**precondicionamiento hipóxico; PH**) (Lasley et al., 1993; Shizukuda et al., 1992). Además de estos fenómenos la aplicación de diversos compuestos también producen efectos cardioprotectores; es el denominado **precondicionamiento farmacológico (PF)**; (Zaugg et al., 2003)). Los mecanismos moleculares que subyacen a estos tres fenómenos aún no se conocen en detalle, aunque parece claro que son diferentes entre sí y a su vez a los producidos por la hipoxia crónica (Kolar y Ostadal, 2004; Tajima et al., 1994). No obstante, parece ser que todos estos fenómenos comparten algunas vías de señalización (Neckar et al., 2002).

### II.3.1. Mecanismos de adaptación a la hipoxia crónica.

Las primeras evidencias sobre el efecto protector de la hipoxia crónica en el corazón surgieron de observaciones epidemiológicas. Inicialmente se observó que la incidencia de hipertensión e infarto de miocardio era menor en lugares a gran altitud (Hurtado, 1960). Del mismo modo la tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica en estos lugares era inferior a la observada a menor altitud (Mortimer et al., 1977; Voors y Johnson, 1979). Estas evidencias fueron confirmadas en el laboratorio con estudios experimentales en los que se usaron cámaras para animales con atmósfera de hipoxia hipobárica, simulando la altitud. En estos experimentos se confirmó que los animales expuestos a hipoxia crónica desarrollaban una mejor respuesta (disminución del área infartada) a la ligación coronaria y la posterior reperfusión respecto a los animales normóxicos (Kopecky y Daum, 1958; Meerson et al., 1973; Poupá et al., 1966). Posteriormente se pudo comprobar que en los animales hipóxicos la incidencia de arritmias era menor (Asemu et al., 1999; Meerson et al., 1987) y la capacidad de recuperación frente a la isquemia mayor (Tajima et al., 1994; Turek et al., 1980).

La regulación a nivel transcripcional constituye la base molecular de la adaptación mediada por la hipoxia crónica. Aunque en la actualidad no se conocen muchos datos sobre esta forma de reprogramación génica en el músculo cardíaco, los experimentos funcionales han revelado que dicha regulación le permite por un lado aumentar la utilización de carbohidratos como fuente de energía y disminuir la de los ácidos grasos (remodelado metabólico), y por otro lado aumentar la eficiencia de la producción de energía en la mitocondria (aumento de la función respiratoria mitocondrial). Esto a su vez ayuda a preservar la función contráctil del corazón (Essop, 2007).

Los principales factores de transcripción encargados del remodelado metabólico en el corazón parecen ser HIF-1 $\alpha$  y el receptor  $\alpha$  de la proliferación del peroxisoma (PPAR $\alpha$ , *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ). Se ha postulado que la

producción de ROS durante la hipoxia crónica induce la estabilización de HIF-1 $\alpha$  y la consiguiente inducción de genes implicados en el metabolismo de la glucosa (Michiels, 2004; Essop, 2007). En paralelo PPAR $\alpha$  y su receptor RXR $\alpha$ , que en normoxia dimerizan para inducir la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, serían degradados por el proteosoma (Huss et al., 2001; Ngumbela et al., 2003; Razeghi et al., 2001).

Con respecto a la función respiratoria mitocondrial se ha propuesto que el aumento de ROS en la mitocondria durante la hipoxia crónica es responsable de activar a la proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (CaMK), la cual aumenta la expresión del receptor de la proliferación del peroxisoma gamma coactivador 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) (Wu et al., 2002). Este factor es clave en la regulación de la biogénesis mitocondrial (Hashimoto et al., 2007). Por otro lado tiene lugar una activación de las enzimas del ciclo de Krebs mediada por calcio que aumenta la producción de ATP, lo cual contribuye a aumentar la capacidad bioenergética de la mitocondria durante la hipoxia crónica (Graier et al., 2007). Por último, la hipoxia crónica intermitente aumenta la tolerancia de la mitocondria a la sobrecarga de calcio y atenúa la consiguiente apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP). Esto contribuye a disminuir la muerte celular tras una posterior situación de estrés (Zhu et al., 2006).

Aunque los mecanismos subyacentes a este tipo de protección son mucho menos conocidos que los del preconditionamiento (Kolar y Ostadal, 2004), se ha propuesto la participación de mediadores comunes a ambos tipos de protección, como el canal de potasio K<sub>ATP</sub> mitocondrial (Asemu et al., 1999; Baker et al., 1999).

### **II.3.2. Precondicionamiento cardíaco.**

El preconditionamiento isquémico (PI) fue descrito por primera vez por Murry y colaboradores, los cuales observaron en un modelo de infarto en perros que varios episodios cortos de isquemia seguidos de reperfusión protegían al músculo cardíaco frente a un insulto isquémico posterior (Murry et al., 1986). Posteriormente este fenómeno ha sido observado también en muchas otras especies, como rata (Li et al., 1990; Liu y Downey, 1992), ratón (Sumeray y Yellon, 1998), conejo (Liu et al., 1991; Miura et al., 1992), cerdo (Schott et al., 1990; Vahlhaus et al., 1998) y humano (Ikonomidis et al., 1994).

Se ha observado que, además de reducir el tamaño del área infartada (Murry et al., 1986), el PI disminuye las arritmias inducidas por reperfusión (Shiki y Hearse, 1987) y aumenta la recuperación post-isquémica de la función mecánica (Cave y Hearse,

1992).

El efecto protector del PI se manifiesta en dos fases temporales. La primera aparece en las dos primeras horas tras el episodio isquémico inicial (cardioprotección temprana) y la segunda se hace patente más tardíamente, alrededor de las 24 horas posteriores al estímulo isquémico inicial (cardioprotección tardía). Esta segunda ventana de protección es menos robusta pero más duradera, al seguir activa hasta 72 horas después (Baxter et al., 1997).

Los mecanismos responsables del PI son numerosos y complejos, posiblemente se desarrollan simultáneamente y de manera integrada. La isquemia provoca la liberación de sustancias que tras interactuar con receptores de membrana desencadenan cascadas de señalización comunes a la primera y segunda ventanas de protección del PI. No obstante, en el caso de la ventana tardía la síntesis de nuevas proteínas, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la superóxido dismutasa (SOD) y proteínas de choque térmico, marca las diferencias existentes entre ambos procesos (Rizvi et al., 1999). Entre las sustancias desencadenantes del PI, revisados en Eisen et al., 2004, se encuentran la adenosina, sustancias opiodes, la bradikinina, las prostaglandinas, la norepinefrina, la angiotensina y la endotelina. El óxido nítrico (NO), ROS y el calcio también inducen el PI, aunque sus efectos no están mediados por la interacción con receptores. Entre los mediadores de la respuesta se encuentran el canal de potasio mitocondrial  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ , el canal maxi-K mitocondrial y la proteína quinasa C (PKC). Entre los posibles efectores finales del PI se encuentra de nuevo al canal  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  y al canal maxi-K mitocondrial, así como el poro de transición mitocondrial (mPTP), el intercambiador sodio- $\text{H}^+$ , cambios en el citoesqueleto y las ROS. Aunque no está claro si los canales  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  actúan como mediadores o como efectores finales del PI, parece claro que su apertura hace a la mitocondria resistente a la sobrecarga de calcio (Holmuhamedov et al., 1998). El mismo mecanismo se ha propuesto para el canal de potasio mitocondrial maxi-K (Cao et al., 2005; Sato et al., 2005; Xu et al., 2002).

Con respecto a la segunda ventana de protección, está ampliamente aceptado que las ROS y el NO que se generan durante los periodos cortos de isquemia y reperusión activan diferentes quinasas, entre las que se encuentra la PKC. Estas mobilizan factores de transcripción como AP-1,  $\text{NF-}\kappa\beta$  y la familia STAT (Bolli, 2000; Yellon y Downey, 2003), que a su vez son responsables de la inducción de una amplia batería de proteínas cardioprotectoras, entre las que se encuentran la iNOS (Guo et al., 1999), la ciclo-oxigenasa-2 [COX-2; (Bolli et al., 2002; Wang et al., 2004)] y la hemo-oxigenasa-1 [HO-1; (Dawn y Bolli, 2005; Yoshida et al., 2001)]. Aunque varios de los genes que codifican estas proteínas se inducen típicamente por HIF, hasta fechas

recientes no se ha demostrado claramente que la inducción de este factor de transcripción participe en la cardioprotección tardía durante el PI (Loor y Schumacker, 2008).

La estabilización de HIF inducida por la isquemia se ha observado en ratón, y su efecto protector se ha evidenciado durante la primera ventana de protección, al aumentar la señalización purinérgica (Eckle et al., 2008). Además, recientemente han aparecido evidencias de que la alteración de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en normoxia de manera previa al estímulo isquémico pueden modificar la respuesta protectora temprana y tardía (primera y segunda ventanas de protección). La reducción del área infartada inducida en la ventana temprana por la isquemia no se manifiesta en animales heterocigotos para HIF-1 $\alpha$  (+/-) (Cai et al., 2008). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión constitutiva de HIF-1 $\alpha$  en cardiomiocitos de rata neonatal dispersos induce cardioprotección tardía frente a la isquemia y reperfusión mediante la inducción de sus genes diana (Date et al., 2005). En este sentido, el silenciamiento *in vivo* específico de la prolil hidroxilasa-2, que en normoxia estabiliza los niveles de HIF-1 $\alpha$  (Berra et al., 2003) produce en corazones de ratón una disminución del daño por reperfusión (Natarajan et al., 2006; Natarajan et al., 2007).

Por último cabe destacar la importancia desde el punto de vista clínico de la estrecha relación existente entre el PI y el fenómeno de la hibernación miocárdica. Este proceso es iniciado en respuesta a varios insultos breves de isquemia y reperfusión y se caracteriza por el descenso en la actividad contráctil y del consumo de oxígeno por el tejido cardíaco (Rahimtoola, 1985). Durante este proceso se ha observado una reprogramación génica similar a la observada durante la fase tardía de la protección inducida por el PI (Depre et al., 2004).

Al igual que la isquemia, la hipoxia aplicada en períodos cortos también protege al corazón frente a un insulto isquémico posterior (Lasley et al., 1993; Shizukuda et al., 1992). El preconditionamiento hipóxico (PH) comenzó a estudiarse sobre corazones aislados y perfundidos, pero la dificultad de generar un modelo animal *in-vivo* de flujo sanguíneo reducido ha hecho necesaria la búsqueda de modelos celulares *in-vitro* en este tipo de estudios. Por esta razón se ha estudiado el efecto de la hipoxia moderada sobre preparaciones de cardiomiocitos aislados (Liu et al., 2003; Silverman et al., 1997; Xu et al., 2004) y se han desarrollado diferentes protocolos de “simulación” de la isquemia y reperfusión sobre estas preparaciones (Armstrong et al., 1994; Diaz y Wilson, 2006; Ikonomidis et al., 1994; Vander Heide et al., 1990). Parece claro que HIF-1 $\alpha$  participa en estos mecanismos cardioprotectores, bien estabilizándose durante el periodo hipóxico previo a la isquemia y reperfusión (Xu et al., 2004), bien fosforilándose

## Introducción

(Liu et al., 2003).

El esclarecimiento de las vías de señalización que en último término producen el PI en el corazón disparó la búsqueda de agentes miméticos del estado precondicionado con un posible papel terapéutico. En la actualidad se conoce que determinados compuestos, entre los que se encuentran diversos anestésicos volátiles, sustancias opioides y drogas activadoras de canales iónicos, son capaces de mimetizar los efectos cardioprotectores del PI (Zaugg et al., 2003). Esta forma de precondicionamiento se denomina precondicionamiento farmacológico (PF).

Numerosos estudios han evaluado el efecto cardioprotector de los anestésicos volátiles, como son el isoflurano, el enflurano, el halotano (Mattheussen et al., 1993; Wartier et al., 1988), el sevoflurano (An et al., 2001; Toller et al., 1999) y el desflurano (Toller et al., 2000). Estos efectos fundamentalmente son la disminución de la sobrecarga de calcio citosólico y la disminución del área infartada tras la isquemia (An et al., 2001). La activación de los receptores opioides también induce ambos tipos de protección, temprana y tardía, de forma similar a la observada en el PI (Fryer et al., 1999). El PF que producen ambos tipos de compuestos comparten diversos pasos en las respectivas vías de señalización que a su vez son comunes a las del PI. Estos pasos son fundamentalmente la activación de receptores acoplados a proteínas G (Hanouz et al., 2002; Roscoe et al., 2000), la activación de proteínas quinasas (da Silva et al., 2004; Toller et al., 1999; Uecker et al., 2003), la producción de ROS (Tanaka et al., 2003) y la activación de los supuestos efectores finales, los canales de potasio dependientes de ATP sarcoplásmico y mitocondrial (Zaugg et al., 2002).

**Tabla 1: Principales agonistas y antagonistas de los canales de potasio efectores del PF en el corazón.**

Canal	Agonistas	Antagonistas
sarcoK <sub>ATP</sub>	P-1075	HMR-1098, glibenclamida
mitoK <sub>ATP</sub>	Diazóxido	Ácido 5-hidroxidecanóico, glibenclamida
mitoK <sub>Ca</sub>	NS-1619	Paxilina, caribdotoxina, iberitoxina

La activación farmacológica del canal K<sub>ATP</sub> mitocondrial fundamentalmente, aunque también del localizado en la membrana plasmática, induce el estado precondicionado en el corazón (Lamping y Gross, 1985). La aplicación de antagonistas de estos canales, a su vez, bloquea este tipo de precondicionamiento (Grover y Garlid, 2000). De la misma manera, la activación con agonistas del canal maxi-K tiene efectos beneficiosos en el corazón frente al daño por repercusión, y la aplicación de sus antagonistas los bloquean (Cao et al., 2005; Sato et al., 2005; Xu et al., 2002). En la tabla 1 se muestran los principales agonistas y antagonistas de estos tres canales iónicos.

# OBJETIVOS



El objetivo general de este proyecto fue el estudio de la regulación por la hipoxia de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal, así como de la posible importancia fisiopatológica de este efecto.

En relación con el estudio de la regulación por la hipoxia de la expresión de la subunidad  $\beta_1$ , los objetivos específicos fueron:

1. Caracterización molecular del canal maxi-K en cardiomiocitos.
2. Estudio de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  de los canales maxi-K en respuesta a la hipoxia crónica en cardiomiocitos ventriculares.
3. Determinación del mecanismo molecular subyacente a la regulación por la hipoxia de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K.

Con respecto al estudio del papel de la regulación de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K en el tejido cardíaco los objetivos específicos fueron:

1. Caracterización molecular y funcional del preconditionamiento hipóxico mediante ensayos de isquemia simulada en cardiomiocitos dispersos.
2. Estudio de la posible contribución de la regulación por la hipoxia de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K al preconditionamiento hipóxico en cardiomiocitos.

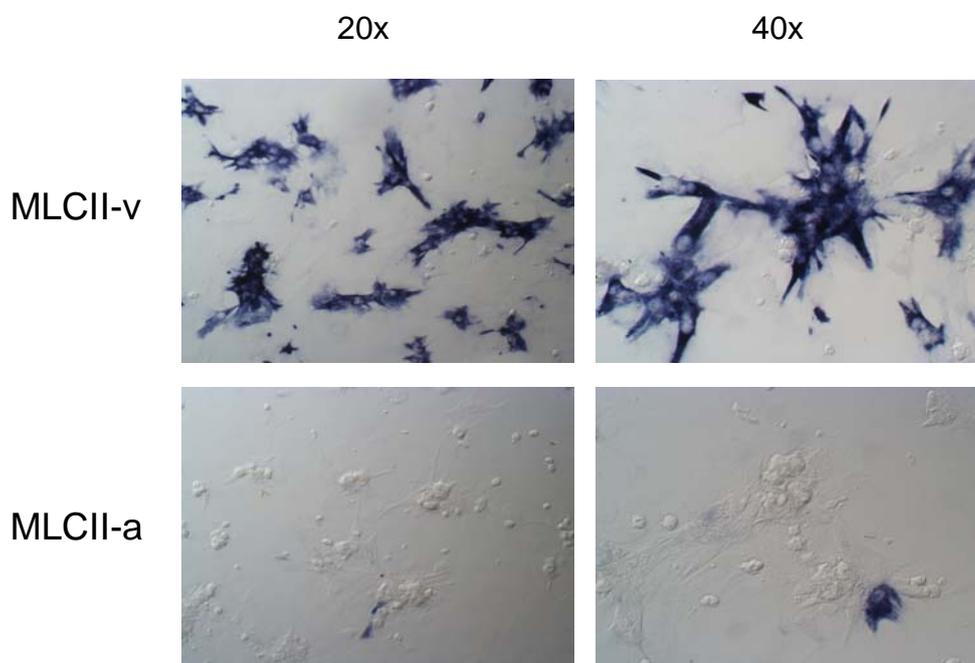


# RESULTADOS



## I. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE CARDIOMIOCITOS NEONATALES.

El primer objetivo de este trabajo fue la puesta a punto de la preparación de cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal. El protocolo de dispersión empleado, detallado en "Materiales y Métodos" de esta tesis se basa en la dispersión enzimática del tejido por tripsinización (Blondel et al., 1971). Tras la dispersión del tejido se realizó una presiembra con el objeto de enriquecer la preparación en cardiomiocitos ventriculares y eliminar la mayor cantidad posible de fibroblastos y miocitos vasculares (Polinger, 1970).



**Figura 9: Caracterización del cultivo de cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal.** Hibridación *in situ* no radiactiva sobre células dispersas. Las sondas de RNA empleadas fueron específicas para ventrículo (paneles superiores) y aurícula (paneles inferiores), y diseñadas para los mensajeros de la cadena ligera de la miosina tipo II ventricular (MLCII-v) y auricular (MLCII-a). Las imágenes fueron tomadas con aumentos de 20x (izquierda) y 40x (derecha).

Para comprobar la pureza del cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal se realizaron experimentos de hibridación *in situ* no radiactiva utilizando sondas de RNA de transcritos específicos de músculo cardíaco. Se generaron sondas antisentido mediante transcripción *in vitro* a partir de los genes de la cadena ligera de la miosina tipo 2 auricular (MLC-2a) y ventricular (MLC-2v). Posteriormente las sondas se incubaron con

## Resultados

la preparación de cardiomiocitos dispersos en las condiciones adecuadas para permitir la hibridación con sus dianas correspondientes.

En la figura 9 se muestran ejemplos de los experimentos indicados anteriormente. En los paneles superiores se observa que aproximadamente el 90-95 % de las células aparecen teñidas cuando se utiliza la sonda específica de la MLC-2v, indicando una alta proporción de células procedentes del ventrículo en estos cultivos, mientras que la sonda específica de la proteína auricular MLC-2a hibrida con un porcentaje muy bajo de células en la misma preparación (paneles inferiores). En la figura también se observa que existe un porcentaje muy bajo de células que no aparecen teñidas, las cuales probablemente corresponden a fibroblastos y miocitos procedentes de los vasos que irrigan el corazón, fundamentalmente de las arterias coronarias.

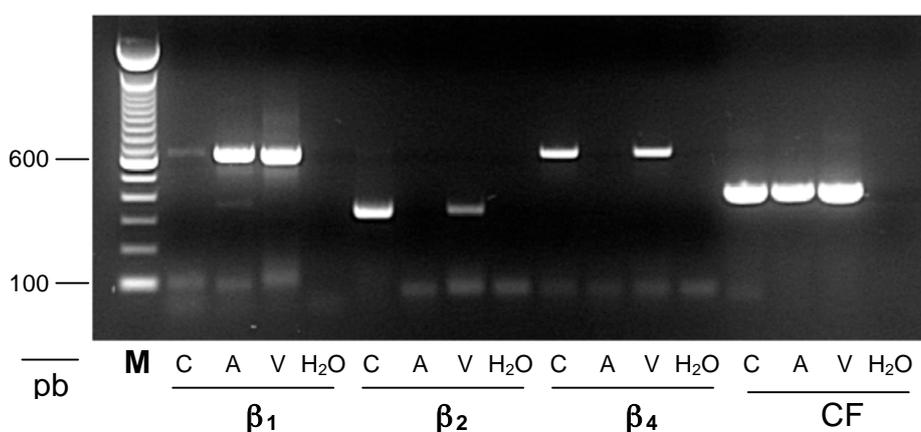
## II. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL CANAL MAXI-K EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES DE RATA NEONATAL.

Como se indicó en el apartado "Introducción" el canal maxi-K está formado por dos tipos de subunidades, la subunidad  $\alpha$ , o formadora del poro, y la subunidad  $\beta$  que regula o modula la actividad de la  $\alpha$  (Lippiat et al., 2003). Mientras que la subunidad  $\alpha$  está codificada por un solo gen, *slowpoke* (Adelman et al., 1992), hasta la fecha se han identificado cuatro genes que codifican subunidades  $\beta$ , denominados  $\beta_1$  a  $\beta_4$  (Brenner et al., 2000; Jiang et al., 1999; Tseng-Crank et al., 1996; Uebele et al., 2000; Wallner et al., 1999; Weiger et al., 2000).

Para estudiar la composición molecular del canal maxi-K en el músculo cardíaco se analizó por RT-PCR convencional la presencia de los mRNA tanto de la subunidad  $\alpha$  como de las cuatro subunidades  $\beta$  en este tejido. Para ello se utilizaron muestras de RNA total extraído a partir de cultivos de cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal, y como tejidos control se utilizaron muestras de RNA total de cerebro y aorta torácica de rata adulta.

Las PCRs se realizaron utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de las subunidades que pueden formar parte de los canales maxi-K, es decir, la subunidad  $\alpha$  y las cuatro subunidades  $\beta$ . Las secuencias de los mismos se detallan en las tablas 2 y 3. En la figura 10, que corresponde a los productos de PCR de las subunidades  $\beta$  sometidos a electroforesis en gel de agarosa, se puede observar que en ventrículo de rata (V) se detecta la expresión de tres de las cuatro subunidades  $\beta$  existentes:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_4$ . La subunidad más abundante es la  $\beta_1$ , que presenta también un alto nivel de expresión en el músculo liso vascular, como puede comprobarse en la muestra de aorta

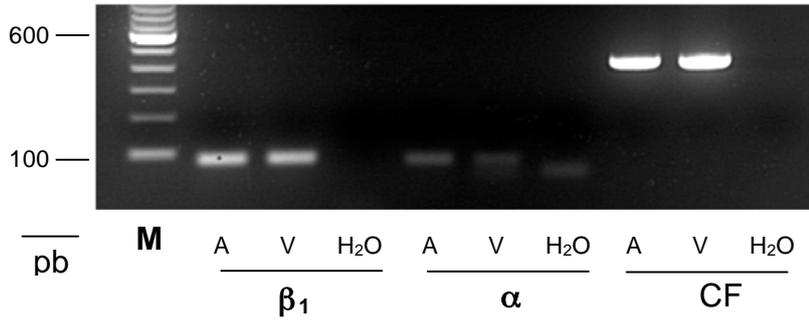
torácica (A). La banda tenue correspondiente a la subunidad  $\beta_1$  que se observa en cerebro (C) procede probablemente de los vasos sanguíneos cerebrales. La subunidad  $\beta_2$  se amplifica en ventrículo, en mayor medida en cerebro, y no se expresa en aorta. La subunidad  $\beta_3$  no se amplificó en ninguna de las muestras analizadas. Este resultado era esperable, debido a que esta subunidad sólo se expresa en páncreas, bazo y testículos. La subunidad  $\beta_4$  se detectó en cerebro y ventrículo, pero no en aorta. Para ninguna pareja de oligonucleótidos se observó amplificación en el control negativo, correspondiente a agua. Como control de carga se utilizó en estos experimentos el gen de la ciclofilina (CF).



**Figura 10: Análisis por PCR convencional de la expresión de las distintas subunidades  $\beta$  del canal maxi-K.**

Gel de agarosa al 1 % donde se visualizan los productos de PCR obtenidos a partir de cDNA procedente de cerebro (C), aorta torácica (A), y ventrículo (V) de rata. Los oligonucleótidos utilizados fueron específicos para cada subunidad  $\beta$ . Los niveles de ciclofilina (CF) se analizaron como control de carga. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular (M).

La expresión de la subunidad  $\alpha$  se analizó junto a la expresión de la subunidad  $\beta_1$  utilizando oligonucleótidos para PCR cuantitativa con muestras de aorta y ventrículo. Los productos de la amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 2 %. Como se muestra en la Figura 11, la expresión de la subunidad  $\beta_1$  es alta y similar en los dos tejidos, mientras que la subunidad  $\alpha$  se expresa en mayor medida en aorta. La expresión de la subunidad  $\alpha$  es escasa o nula en músculo cardíaco (Jiang et al., 1999), pero la amplificación de esta subunidad se detectó levemente en ventrículo. Esto puede deberse bien a que la expresión de esta subunidad, aunque baja, aparezca en células ventriculares o a la contaminación de miocitos vasculares que existe en los cultivos de tejido cardíaco.



**Figura 11: Análisis por PCR convencional de la composición molecular del canal maxi-K en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal y aorta de rata adulta.**

Productos de PCR convencional en gel de agarosa al 2 % realizados con oligonucleótidos específicos para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta_1$  del canal maxi-K a partir de muestras de cardiomiocitos de rata neonatal (V). Muestras procedentes de aorta torácica (A) fueron elegidas como control positivo para la expresión de ambos genes. Los niveles de ciclofilina (CF) se analizaron como control de carga. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular (M).

### III. REGULACIÓN POR LA HIPOXIA DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ DEL CANAL MAXI-K EN MÚSCULO CARDÍACO.

Como se indicó en el apartado anterior la expresión de la subunidad  $\alpha$  es muy escasa o prácticamente nula en músculo cardíaco, y la subunidad auxiliar predominante en este tejido es la subunidad  $\beta_1$ . Puesto que esta subunidad se regula por hipoxia en músculo liso arterial (Navarro-Antolin et al., 2005), el objetivo de este estudio fue comprobar el efecto de la hipoxia crónica sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$  en músculo cardíaco, tanto en células dispersas como en tejido cardíaco completo.

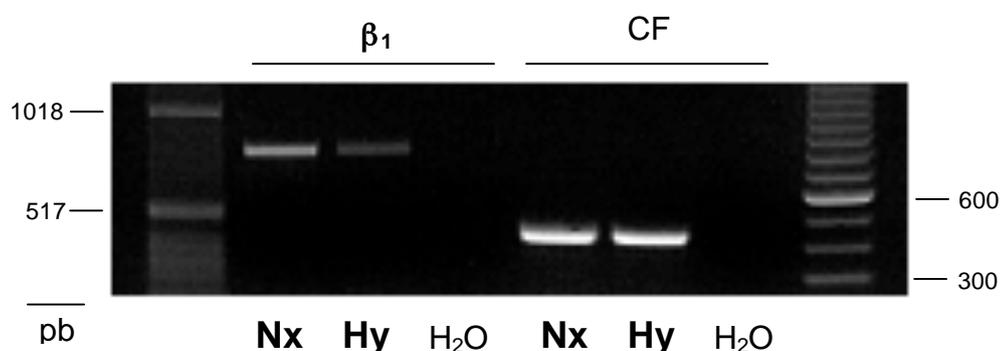
#### ***III.1. Estudio de la expresión de la subunidad $\beta_1$ de los canales maxi-K en respuesta a la hipoxia crónica en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal.***

##### **III.1.1. PCR semicuantitativa.**

En primer lugar se analizó el efecto de la hipoxia crónica y severa (1 % de  $O_2$  durante 24 h) sobre los niveles de mRNA de la subunidad  $\beta_1$  en cultivos de cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal. Para ello se extrajo el RNA total de esta preparación incubada en normoxia y en hipoxia. Tras la retrotranscripción de las

muestras, el cDNA resultante se sometió a PCR convencional con el objeto de amplificar los mensajeros correspondientes a la subunidad  $\beta_1$  y la ciclofilina, que se escogió como gen de expresión constitutiva.

En la figura 12 se puede observar que el amplicón de aproximadamente 800 pares de bases (pb) que generan los oligonucleótidos 472-473, diseñados para la subunidad  $\beta_1$ , muestra una menor intensidad en la condición de hipoxia respecto a la de normoxia, mientras que en las mismas muestras la amplificación de la ciclofilina (amplicón de aproximadamente 450 pb) es similar en ambas condiciones. Para ninguno de los genes,  $\beta_1$  y ciclofilina, se produjo amplificación en las muestras control (agua). Este resultado indicó que la hipoxia crónica produce una represión en la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal.



**Figura 12: Análisis por PCR convencional semicuantitativa de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K en normoxia e hipoxia.**

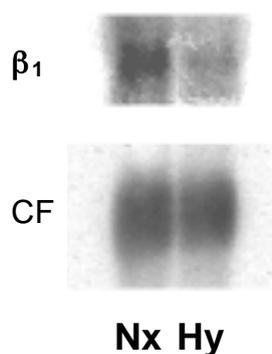
Productos de PCR fraccionados en gel de agarosa al 1 % obtenidos a partir de RNA total de células incubadas en normoxia (Nx, 21 % de O<sub>2</sub>) e hipoxia (Hy, 1 % de O<sub>2</sub>) durante 24 h. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para la subunidad  $\beta_1$  y para la ciclofilina (CF). Esta última se escogió como control de carga.

### III.1.2. Northern blot.

Para corroborar la regulación a la baja por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  se realizaron experimentos de *Northern blot* utilizando sondas de DNA específicas tanto para la subunidad  $\beta_1$  como para la ciclofilina. Las sondas se generaron por PCR convencional, y posteriormente se marcaron con <sup>32</sup>P (ver "Materiales y Métodos"). Tras la separación electroforética en gel desnaturalizante del RNA total de cardiomiocitos en cultivo sometidos a normoxia e hipoxia, el RNA fue transferido a membranas de nylon e hibridado con las sondas radiactivas complementarias a los genes a estudiar.

## Resultados

Como se observa en la figura 13 la cantidad de mRNA de la subunidad  $\beta_1$  en la condición de hipoxia es menor con respecto a la condición de normoxia. El mRNA de la ciclofilina, que se detectó sobre la misma membrana no sufrió modificación en sus niveles de expresión, verificando de esta manera la represión específica de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia.



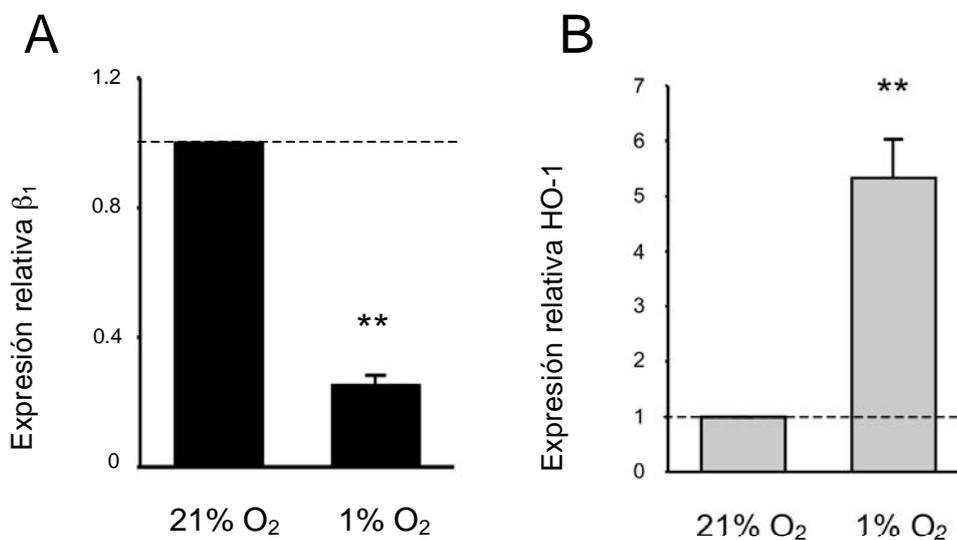
**Figura 13: Estudio por *Northern blot* de la regulación por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K.**

Análisis realizado con RNA total de células expuestas a normoxia (Nx, 21 % de O<sub>2</sub>) e hipoxia (Hy, 1 % de O<sub>2</sub>) durante 24 h. Se utilizaron, de forma sucesiva, sondas de DNA específicas para la subunidad  $\beta_1$  y para la ciclofilina (CF).

### III.1.3. PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR).

Para estimar de forma cuantitativa la magnitud de la represión de la subunidad  $\beta_1$  inducida por la hipoxia en la preparación de cardiomiocitos se realizaron experimentos de RT-qPCR. Las células procedentes de rata neonatal se incubaron durante 24 h en normoxia o hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>) y posteriormente se extrajo el RNA total. Tras la transcripción reversa del RNA a cDNA se procedió a realizar la qPCR, utilizando oligonucleótidos específicos para la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K y del RNA ribosómico 18S. Los resultados obtenidos en este tipo de experimentos se resumen en la figura 14A. En el eje de abcisas se representa la inducción del mRNA de la subunidad  $\beta_1$ , medido en unidades relativas. Para calcular dichas unidades se normalizó la cantidad del mRNA de la subunidad  $\beta_1$  con el del gen constitutivo RNA ribosómico 18S para cada condición. Posteriormente se realizó una normalización de la condición de hipoxia respecto a la condición de normoxia. De esta manera se obtuvo que tras 24 h de hipoxia al 1 % de O<sub>2</sub> la cantidad relativa del mensajero de la subunidad  $\beta_1$  en nuestra preparación disminuía hasta un 30 % respecto a la cantidad del mismo en normoxia. En estos experimentos también se analizó la regulación por la hipoxia de los niveles del transcrito de la hemo-oxigenasa-1 (HO-1), un gen clásico dentro de los que se inducen por hipoxia (Lai et al., 2004; Lee et al., 1997; Morita et al., 1995; Panchenko et al., 2000; Yang y Zou, 2001), que se usó como control positivo para esta condición experimental. El resultado, expuesto en la figura 14B, mostró que, en contraste con el transcrito de la

subunidad  $\beta_1$ , el gen de la HO-1 se indujo casi 6 veces cuando las células se expusieron a hipoxia (1 % de  $O_2$ ) durante 24 h.

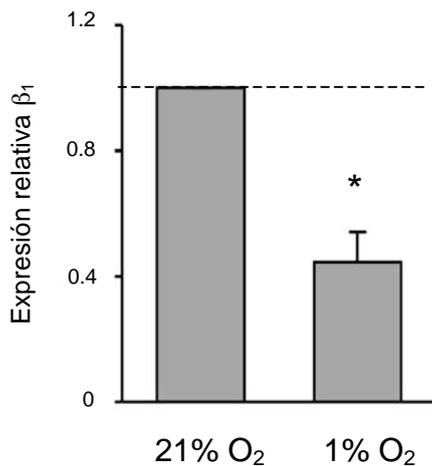


**Figura 14: Cuantificación por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K (A) y la HO-1 (B).**

Efecto de la hipoxia crónica (1 %  $O_2$ , 24 h) sobre los niveles de mRNA de ambos genes, normalizados frente al RNA ribosómico 18S. Se representan los promedios  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos. La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

### ***III.2. Estudio de la expresión de la subunidad $\beta_1$ de los canales maxi-K en respuesta a hipoxia crónica en cardiomiocitos ventriculares dispersos de ratón neonatal.***

Para comprobar si la represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia era un efecto específico de rata se analizó por RT-qPCR el efecto del mismo tratamiento hipóxico sobre preparaciones de cardiomiocitos dispersos de ratón neonatal. En esta preparación se obtuvo una disminución por la hipoxia de la cantidad relativa del mRNA de la subunidad  $\beta_1$  de un 50 % (Figura 15). Este resultado indica que el efecto de la regulación a la baja por la hipoxia del mensajero de la subunidad  $\beta_1$  es posiblemente un fenómeno general que se mantiene en diferentes especies.

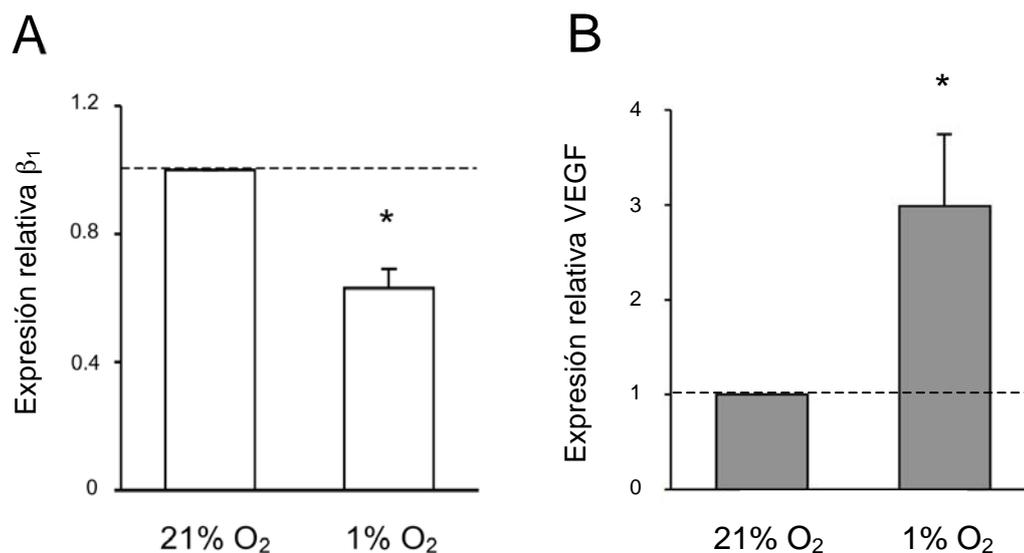


**Figura 15: Cuantificación por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K en cardiomiocitos dispersos de ratón neonatal.**

Las células fueron sometidas al mismo tratamiento hipóxico (1 % O<sub>2</sub>, 24 h) que las preparaciones procedentes de rata. Los niveles de mRNA de la subunidad  $\beta_1$  fueron normalizados frente al RNA ribosómico 18S. Se representan los promedios  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos. La línea discontinua indica el nivel de expresión de los genes correspondientes en normoxia.

### **III.3. Estudio del efecto de la hipoxia crónica en el músculo cardíaco adulto.**

Para comprobar si la regulación por hipoxia de la subunidad  $\beta_1$ , observada en cardiomiocitos neonatales, se mantiene en el tejido adulto se realizaron experimentos con corazones de ratas de 1-1,5 meses de edad. Tras la perfusión del tejido con PBS estéril para eliminar la sangre del mismo los corazones se extrajeron del animal y el tejido ventricular se troceó en esterilidad. Los fragmentos de tejido, de unos 2-3 mm de diámetro, se incubaron en las mismas condiciones que las placas de los cardiomiocitos dispersos (1 % de O<sub>2</sub> durante 24 h) y en el mismo medio de cultivo. El análisis por RT-qPCR mostró que el mensajero de la subunidad  $\beta_1$  en el ventrículo troceado de rata adulta también se regula a la baja por la hipoxia (Figura 16A). En el caso del tejido adulto la disminución de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  fue de aproximadamente un 60 %, un valor menos importante que lo observado en preparaciones de células dispersas neonatales. Este resultado parece indicar que la regulación de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia no es un efecto cualitativamente dependiente de la edad del animal. En los experimentos con trozos de tejido cardíaco adulto se utilizó el transcrito de VEGF [gen que está dentro de los clásicamente estudiados como inducible por hipoxia; (Forsythe et al., 1996; Goldberg y Schneider, 1994; Kimura et al., 2000)] como control positivo del tratamiento hipóxico para esta preparación. La inducción del mRNA de VEGF observada en hipoxia fue de aproximadamente 3 veces respecto a la normoxia (Figura 16B).



**Figura 16: Cuantificación por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K (A) y VEGF (B) en músculo cardíaco adulto.**

El tejido fue troceado e incubado en el medio de cultivo estándar durante 24 h tanto en normoxia como en hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>). Los niveles de ambos mensajeros fueron normalizados respecto al del RNA ribosómico 18S. El resultado se muestra como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) (n=6). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

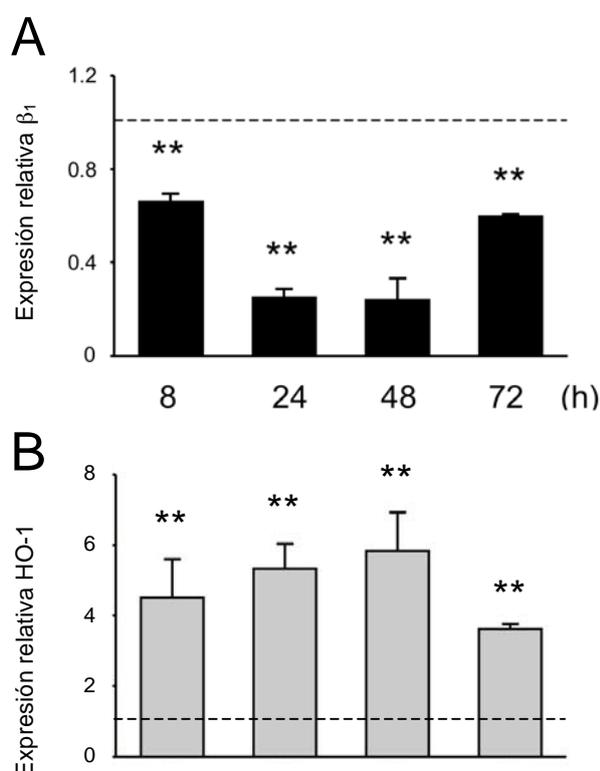
#### ***III.4. La represión de la subunidad $\beta_1$ por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal es dependiente del tiempo de exposición al estímulo.***

Con el objeto de analizar si la represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia depende del tiempo de exposición a este tratamiento los cardiomiocitos de rata neonatal dispersos se expusieron a hipoxia (1 % O<sub>2</sub>) durante diferentes tiempos. Posteriormente se extrajo el RNA total de estas muestras y los niveles de transcrito de la subunidad  $\beta_1$  se analizaron por RT-qPCR. En la figura 17A se muestra que la disminución del mensajero de la subunidad  $\beta_1$  es progresiva a medida que aumenta el tiempo de exposición a hipoxia. Tras 8 h de tratamiento hipóxico la expresión del transcrito baja un 25-30 % respecto a la expresión que tiene el mismo en normoxia. A las 24 h de tratamiento el mensajero alcanza su máxima represión, la cual se mantiene tras 48 h de exposición a la hipoxia. En ambos casos el mensajero alcanza una cantidad relativa de un 25 % aproximadamente. Posteriormente comienza la reversión del efecto, de manera que a las 72 h de hipoxia la cantidad relativa del transcrito asciende hasta un 60 %. No se analizaron tiempos superiores de exposición a hipoxia debido a que después de 72 h existe un crecimiento excesivo de fibroblastos en los cultivos. En paralelo al curso

temporal de la inhibición del gen de la subunidad  $\beta_1$ , se analizó la inducción de la expresión del gen HO-1 (gen control de la condición hipoxia), Como se muestra en la figura 17B esta inducción siguió un curso temporal prácticamente especular al de represión del mensajero de la subunidad  $\beta_1$  en los mismos experimentos. Así, a las 8 h de hipoxia la inducción del mensajero de la HO-1 es de 4-5 veces respecto al nivel del mismo en normoxia. A las 24 h se alcanza el máximo de inducción de este gen, aproximadamente 6 veces respecto a la normoxia, y este valor de inducción se mantiene a las 48 h. A las 72 h se puede observar la reversión de este efecto. A este tiempo la expresión del gen baja hasta 3,5 veces aproximadamente sobre su nivel de expresión en normoxia.

**Figura 17: Curso temporal de la regulación por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K (A) y la HO-1 (B) en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal.**

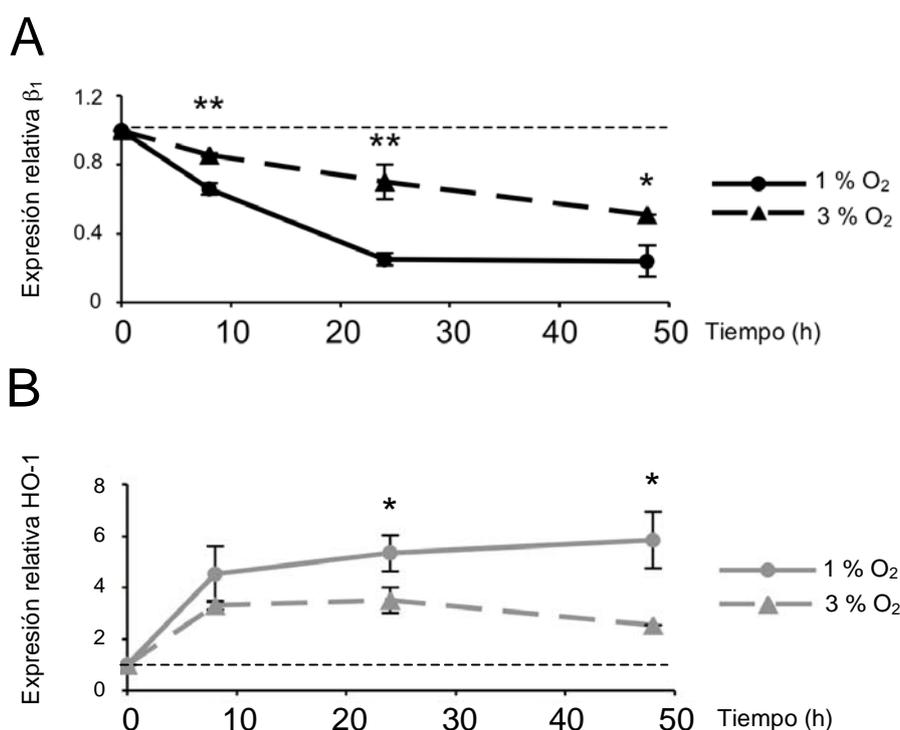
Análisis por PCR en tiempo real del efecto de la hipoxia crónica y severa (1 % de  $O_2$ ) sobre ambos mensajeros. La normalización se realizó respecto a los niveles de RNA ribosómico 18S. Representación de los promedios de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.



**III.5. La represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal es dependiente de la concentración de oxígeno.**

Para determinar si la represión del transcrito de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia dependía de la dosis de oxígeno aplicada se realizaron experimentos en los que la preparación de células se expuso a diferentes porcentajes de  $O_2$  (concretamente 1 y 3 % de  $O_2$ ) a diferentes tiempos. A continuación se analizó por RT-qPCR el grado de represión de la subunidad  $\beta_1$  en estos experimentos, El resultado se muestra en la figura

18A, en la que se observa que la bajada del mensajero de la subunidad  $\beta_1$  es más pronunciada al 1 % de  $O_2$  que al 3 %, para todos los tiempos analizados. En cualquier caso para cada % de  $O_2$  empleado, el cambio de expresión de este mensajero es significativamente diferente respecto a la situación de normoxia. De esta manera la expresión de la  $\beta_1$  baja un 75 % aproximadamente al 1 % de  $O_2$  a las 24 h, momento en el que se alcanza la máxima represión de este gen, mientras que al 3 % a ese mismo tiempo la bajada es de un 30-35 % aproximadamente. Posteriormente el mensajero de la subunidad  $\beta_1$  sigue descendiendo y a las 48 h de exposición a hipoxia (3 % de  $O_2$ ) el gen alcanza un 50 % de represión.



**Figura 18: Curso temporal de la regulación por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K (A) y la HO-1 (B) en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal a distintos porcentajes de  $O_2$ .** Análisis por RT-qPCR del efecto de la exposición de las células a un 1 % de  $O_2$  (trazo continuo) y a un 3 % de  $O_2$  (trazo discontinuo) sobre ambos mensajeros. La normalización se realizó respecto a los niveles de RNA ribosómico 18S. Representación de los promedios de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

Como control de hipoxia se analizó en los experimentos anteriores la inducción del gen de la HO-1 (Figura 18B). Tal y como se esperaba la inducción de este gen fue mayor al 1 % de  $O_2$  que al 3 %, con un incremento de la cantidad relativa de este

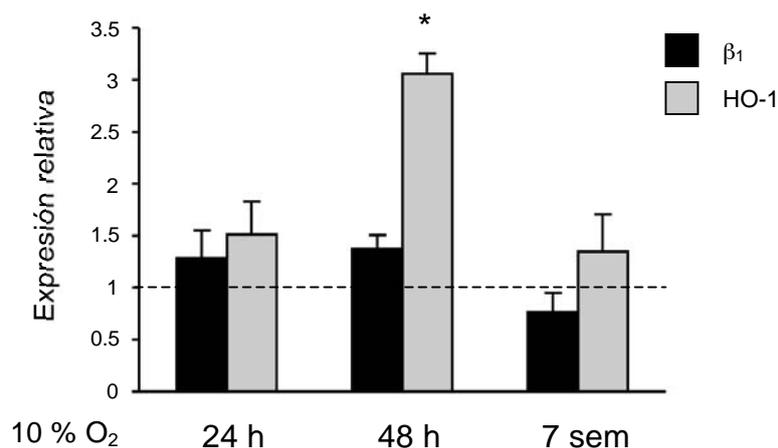
## Resultados

mensajero significativamente diferente respecto al valor en normoxia para todos los tiempos analizados. Al 3 % de O<sub>2</sub> la inducción máxima de este mensajero se alcanzó a las 24 h, con unos niveles 3,5 veces superior a los niveles en normoxia, y posteriormente comenzó la reversión del efecto. Sin embargo al 1 % de O<sub>2</sub> la inducción de la HO-1 a las 24 h fue de 5 veces. A las 48 h los niveles del mensajero continuaron ascendiendo, aunque de manera más lenta, hasta alcanzarse una inducción de 6 veces, aproximadamente.

Los datos expuestos en los párrafos anteriores nos permiten concluir que tanto la represión de la subunidad  $\beta_1$  como la inducción de la HO-1 dependen de la dosis de O<sub>2</sub> empleada, siendo mayor en cada caso cuanto menor el % de O<sub>2</sub> aplicado a la preparación.

### ***III.6. Estudio del efecto de la hipoxia en ratas expuestas a hipoxia crónica.***

El efecto de la hipoxia crónica sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$  en músculo cardíaco también se estudió tras la aplicación de la hipoxia sobre el animal completo. Los resultados que se obtuvieron en estos experimentos revelaron que una atmósfera del 10 % de O<sub>2</sub> no tiene un efecto significativo sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$  en el corazón de los animales, a ninguno de los tiempos analizados (Figura 19). El gen de la subunidad  $\beta_1$  no se reprime tras 24 h ni 48 h de tratamiento. Tampoco una exposición prolongada a esta atmósfera hipóxica (7 semanas) modificó el patrón de expresión de este gen. En los mismos experimentos se analizó de forma paralela el gen control de hipoxia, la HO-1, cuya inducción sólo se observó de forma significativa tras 48 h de tratamiento. Los resultados obtenidos con el grupo de animales control dentro de la cámara en normoxia no fueron significativamente diferentes a los obtenidos con el otro grupo de animales control, los cuales permanecieron fuera de la cámara.



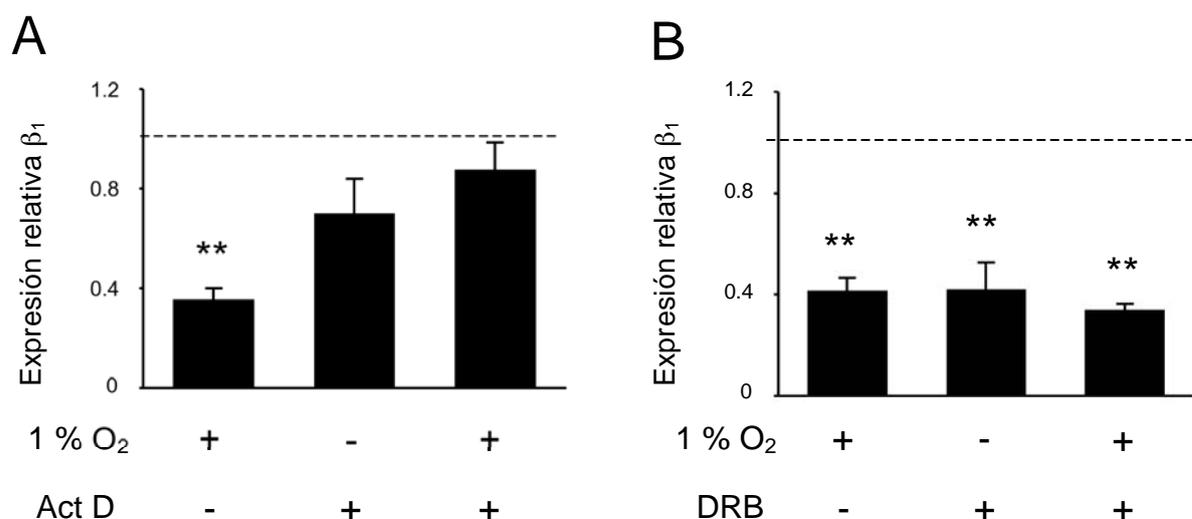
**Figura 19: Cuantificación por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K (negro) y la HO-1 (gris) en animal completo.**

Efecto de la hipoxia crónica (10 %  $O_2$ ) a diferentes tiempos (24 h, 48 h y 7 semanas) sobre los niveles de mRNA de ambos genes, normalizados frente al RNA ribosómico 18S. Se representan los promedios  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de 5 experimentos. La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

#### **IV. MECANISMO MOLECULAR RESPONSABLE DE LA REPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN POR LA HIPOXIA DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ EN MÚSCULO CARDÍACO.**

##### ***IV.1. La regulación de la expresión de la subunidad $\beta_1$ por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal se ejerce a nivel transcripcional.***

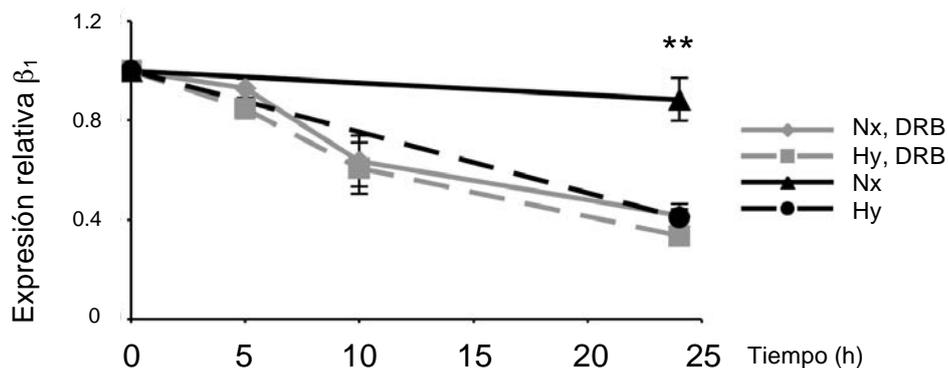
El efecto inhibitor de la hipoxia sobre la expresión del mensajero de la subunidad  $\beta_1$  se bloqueó cuando las células se sometieron a la hipoxia (1 % de  $O_2$ ) en presencia de 0.3  $\mu\text{g/ml}$  actinomicina D ó 200  $\mu\text{M}$  dichloro-1-beta-D-ribofuranosil benzamidazol D (DRB), tras una preincubación de 30 min en presencia de estos compuestos. Esto datos (resumidos en la figura 20) sugirieron que el efecto de la hipoxia sobre la subunidad  $\beta_1$  se produce a nivel transcripcional.



**Figura 20: Análisis por RT-qPCR del efecto de la inhibición de la transcripción en la regulación por la hipoxia de la subunidad β<sub>1</sub>.**

Las células se incubaron en normoxia e hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>) durante 24 h en presencia o ausencia de los inhibidores de la transcripción. (A) Actinomicina D (Act D) 0.3 μg/ml, (n=4). (B) DRB 200 μM, (n=5). La normalización se realizó respecto a los niveles del RNA ribosómico 18S. Representación de los promedios ± el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

Con objeto de determinar si la hipoxia producía una disminución de la vida media del mensajero de la subunidad β<sub>1</sub> se realizaron experimentos de bloqueo de la transcripción con DRB a diferentes tiempos (5, 10 y 24 h), tanto en normoxia como en hipoxia. Las curvas de decaimiento del mensajero que se generaron se pueden observar en la figura 21. Los resultados mostraron que en presencia del bloqueante de la transcripción el curso temporal del descenso del transcrito de la subunidad β<sub>1</sub> en hipoxia era similar al observado en normoxia. Este dato indicó que la disminución por la hipoxia del nivel de mRNA de la subunidad β<sub>1</sub> no era debido al descenso de la estabilidad del mensajero durante la hipoxia, sino a una disminución de la tasa de la transcripción de este gen.

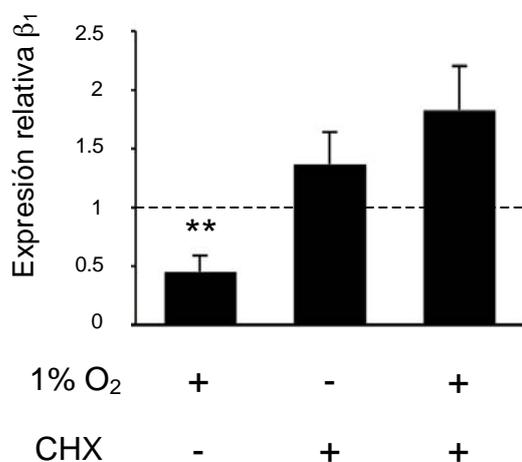


**Figura 21: Cinética de descenso de los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  tras el bloqueo de la transcripción, en normoxia y en hipoxia.**

Las células se preincubaron en presencia o ausencia de DRB 200  $\mu$ M y posteriormente se sometieron a normoxia (trazo continuo) o hipoxia (trazo discontinuo). Los niveles de transcrito se analizaron por RT-qPCR a diferentes tiempos, usando el ribosómico 18S para la normalización. Representación de los promedios de 5 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

#### ***IV.2. La regulación de la expresión de la subunidad $\beta_1$ por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal requiere síntesis “de novo” de proteínas.***

Para determinar si la regulación de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  requería la síntesis *de novo* de proteínas se realizaron experimentos de bloqueo de la traducción celular tanto en normoxia como en hipoxia mediante el empleo de 10  $\mu$ M cicloheximida (CHX). Este compuesto se añadió al medio de cultivo 30 min antes del comienzo de cada experimento. El análisis por RT-qPCR (Figura 22) reveló que el bloqueo de la traducción abolía el efecto de la hipoxia sobre la regulación de la subunidad  $\beta_1$ . Por lo tanto, se puede concluir que aunque el efecto represor de la hipoxia sobre la subunidad  $\beta_1$  se produce a nivel transcripcional también requiere la síntesis *de novo* de algún factor o factores proteicos.



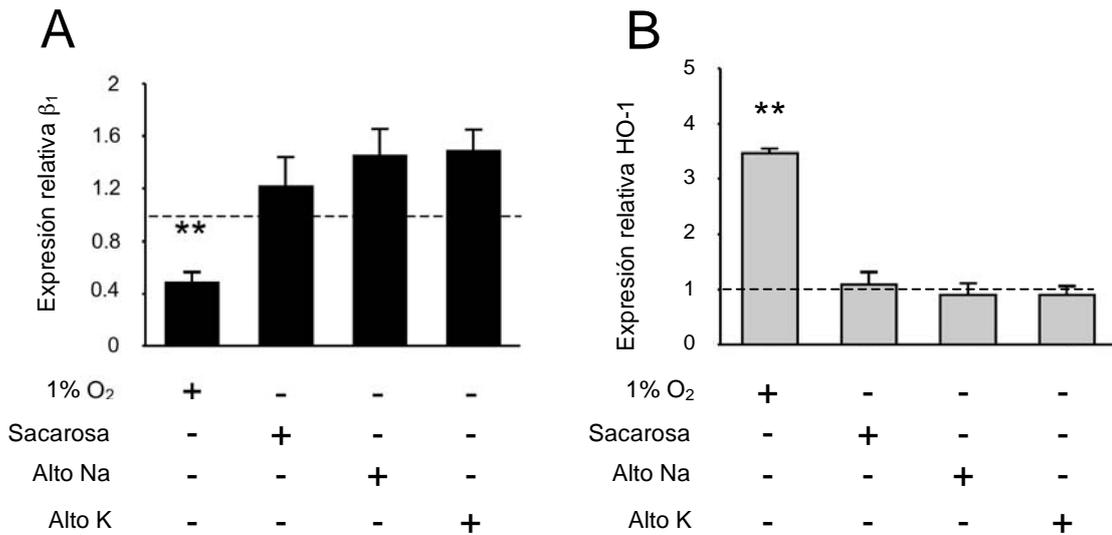
**Figura 22: Efecto del bloqueo de la traducción sobre la regulación por la hipoxia de la subunidad β<sub>1</sub>.**

Las células se preincubaron en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX) 10 μM y posteriormente se sometieron a normoxia o hipoxia durante 24 h. Los niveles de transcrito se analizaron por RT-qPCR, usando el ribosómico 18S para la normalización. Representación de los promedios de 4 experimentos ± el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

**IV.3. La regulación de la expresión de la subunidad β<sub>1</sub> por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal no depende de calcio extracelular.**

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en células PC12 indican que en estas células la bajada en la transcripción de la subunidad β<sub>2</sub> inducida por la hipoxia es dependiente de calcio extracelular (datos no publicados). Según el modelo propuesto, la despolarización de la membrana, secundaria a la hipoxia e inducida por la inhibición de canales de potasio, activa a los canales de calcio dependientes de voltaje de la membrana plasmática. Esto conlleva un flujo de calcio desde el medio extracelular al medio intracelular, siendo el aumento de calcio en el citoplasma el responsable de la represión de la subunidad β<sub>2</sub>. Este modelo se demostró mediante dos tipos de experimentos: i) Despolarizando directamente la membrana mediante la adición de una solución de alto potasio. Para estos experimentos las células PC12 se incubaron en normoxia durante 12 h en un medio con 70 mM KCl. En estas condiciones se produjo un descenso en la cantidad relativa del mRNA de la subunidad β<sub>2</sub> similar a lo observado en hipoxia. ii) Analizando el efecto de la hipoxia sobre la expresión de la subunidad β<sub>2</sub> en células PC12 en ausencia de calcio en el medio extracelular. En este caso se observó que tras 12 h de hipoxia en ausencia de calcio se abolía el efecto represor sobre la subunidad β<sub>2</sub>. Ambos resultados indicaron, por lo tanto, que en células PC12 el aumento intracelular de calcio, generado tras la despolarización de la membrana plasmática en hipoxia, participa en la regulación a la baja de la subunidad β<sub>2</sub> (datos no publicados)

Con objeto de comprobar si el modelo de regulación génica explicado en el párrafo anterior se producía también en el caso de la subunidad  $\beta_1$  en cardiomiocitos dispersos de rata neonatal se realizaron ambos tipos de experimentos con diversas modificaciones. En primer lugar se repitieron los experimentos de despolarización de la membrana plasmática con alto potasio extracelular en normoxia. El potencial de membrana en reposo de los cardiomiocitos ventriculares es cercano al potencial de equilibrio para el potasio (-90 mV, aproximadamente), pues estas células son muy permeables a este ión en situación de reposo. Aumentando la concentración de potasio en el medio externo hasta 40 mM se induce una despolarización del potencial de membrana de estas células hasta aproximadamente -35 mV, de acuerdo a la ecuación de Nernst. De esta manera aplicamos 40 mM KCl en normoxia durante 24 h a la preparación de células y comparamos por RT-qPCR el efecto de este tratamiento con el de la hipoxia sobre la regulación del mensajero de la subunidad  $\beta_1$  (Figura 23A) y de la HO-1 (Figura 23B). Debido a que al suplementar el medio con KCl estábamos induciendo un choque hipertónico a la preparación, se emplearon dos condiciones control de osmolaridad: una con NaCl a la misma concentración (40 mM) y otra con sacarosa al doble de concentración (80 mM), pues esta última molécula no se disocia en solución acuosa. La despolarización de los cardiomiocitos con alto potasio no sólo no mimetizó el efecto represor de la hipoxia sobre la subunidad  $\beta_1$ , sino que además parece que tuvo un efecto contrario (existió una tendencia hacia un aumento en la expresión del mensajero), lo cual pudiera apoyar la idea de que el calcio fuera necesario para la expresión de la subunidad  $\beta_1$  (Figura 23A). Tampoco tuvo efecto este tratamiento sobre la expresión de la HO-1 (Figura 23B).

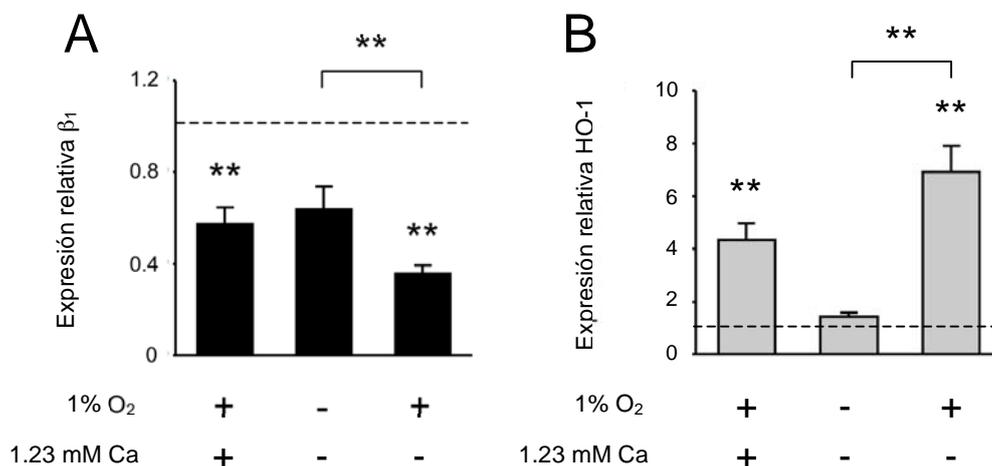


**Figura 23: Efecto del alto potasio extracelular sobre la expresión de la subunidad β<sub>1</sub> (A) y de la HO-1 (B).**

Análisis por RT-qPCR de la expresión de la subunidad β<sub>1</sub> (A) y la HO-1 (B) de células expuestas a 40 mM potasio en normoxia durante 24 h. 80 mM sacarosa y 40 mM sodio en normoxia fueron las condiciones control del choque hipertónico. Las respuestas a estos estímulos se compararon con la respuesta a la hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>). La normalización se realizó respecto a los niveles de ribosómico 18S. Representación de los promedios ± el error estándar de la media (SEM). (n=6). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

En el segundo tipo de experimentos se analizó por RT-qPCR el efecto de la hipoxia sobre la regulación de la subunidad β<sub>1</sub> en ausencia de calcio extracelular. En estos ensayos se utilizó un medio sin calcio en su formulación, al cual se le añadió CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 1,23 mM para las situaciones control, ya que ésta es la concentración de calcio presente en el medio de cultivo. Estos experimentos se realizaron en “cero calcio nominal”, es decir, sin la adición de EGTA al medio ya que la incubación de las células con este agente quelante de calcio indujo una disminución de la viabilidad celular. Cuando se incubaron los cardiomiocitos en normoxia en cero calcio (Figura 24A) se observó una tendencia a la disminución de la expresión de la subunidad β<sub>1</sub> que no llegó a ser significativa respecto a la normoxia en presencia de calcio, mientras que la ausencia de calcio en normoxia no afectó al nivel de expresión de la HO-1 (Figura 24B). Este resultado, junto con lo observado en los experimentos de alto potasio, sugieren que el calcio extracelular es necesario para la expresión de la subunidad β<sub>1</sub>. Sin embargo, en ausencia de calcio la hipoxia tuvo un efecto represor significativo sobre la subunidad β<sub>1</sub>, respecto a la normoxia, al igual que en el experimento control (en presencia de 1,23 mM calcio).

Los datos generados en los experimentos expuestos anteriormente nos permiten concluir que, al contrario de lo que ocurre en células PC12 para la subunidad  $\beta_2$ , en la preparación de cardiomiocitos de rata neonatal dispersos el aumento del calcio citoplasmático no es responsable de la disminución de la transcripción de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia.



**Figura 24: Regulación por la hipoxia de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  (A) y la HO-1 (B) en ausencia de calcio extracelular.**

Las células se incubaron en presencia o ausencia de calcio en el medio extracelular y en normoxia o hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>) durante 24 h . Los niveles de mRNA de la subunidad  $\beta_1$  (A) y la HO-1 (B) fueron analizados por RT-qPCR. La normalización se realizó respecto a los niveles de ribosómico 18S. Representación de los promedios de 5 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

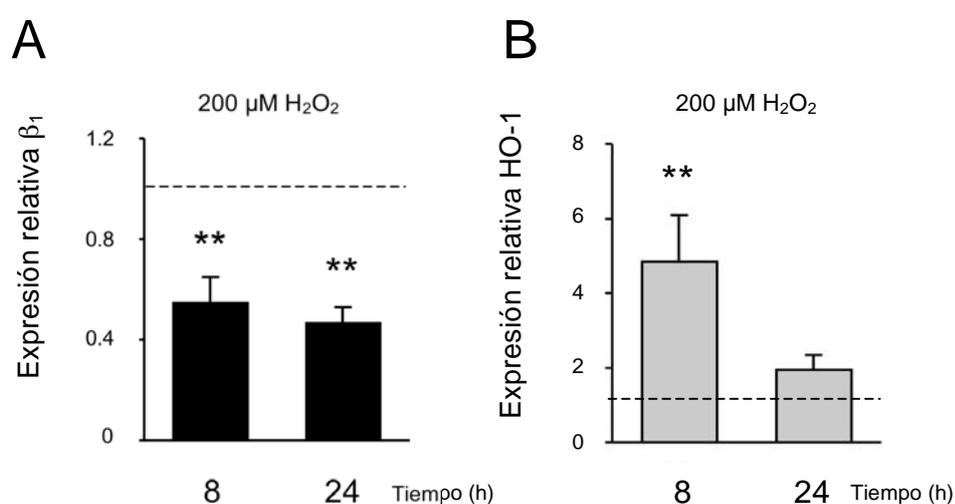
#### ***IV.4. Las especies reactivas del oxígeno participan en el mecanismo de represión de la subunidad $\beta_1$ por la hipoxia en cardiomiocitos de rata neonatal dispersos.***

Continuando con la búsqueda de los posibles responsables del efecto de represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia en nuestra preparación se fijó la atención en las especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas moléculas, también llamadas radicales libres del O<sub>2</sub>, se pueden generar durante la hipoxia como consecuencia del desajuste en el metabolismo del O<sub>2</sub> en la mitocondria, en concreto en algunos de los complejos de la cadena de transporte electrónico. Las ROS regulan numerosos procesos celulares en todos los tejidos, incluido el músculo cardíaco, relacionados con la adaptación de dichos tejidos a la falta de O<sub>2</sub>. Sin embargo las ROS también pueden ser mediadores de diversos efectos nocivos para la célula, generalmente cuando su producción es superior

## Resultados

a lo que las defensas antioxidantes naturales tales como la catalasa, glutathion peroxidasa, etc. pueden metabolizar para mantener niveles adecuados de dichas moléculas.

Para analizar el efecto de las ROS sobre la regulación de la subunidad  $\beta_1$  en nuestra preparación se realizaron experimentos en normoxia en presencia de 200  $\mu\text{M}$  peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La aplicación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en normoxia a diferentes tiempos (8 y 24 h) produjo cambios en los niveles de expresión de los mensajeros de la subunidad  $\beta_1$  y la HO-1 que se analizaron por RT-qPCR (Figuras 25A y 25B, respectivamente). Al igual que la hipoxia, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reprime la expresión de la subunidad  $\beta_1$  (Figura 25A) mientras que induce la expresión de la HO-1 (Figura 25B). En el caso de la subunidad  $\beta_1$  la represión que se alcanza a las 8 h es de aproximadamente un 40 %, y a las 24 h la expresión del transcrito es de aproximadamente el 50 % respecto al control en normoxia. El mensajero de la HO-1 en cambio se induce unas 5-6 veces respecto al control en normoxia tras 8 h de tratamiento y a las 24 h la cantidad relativa de transcrito ya ha bajado hasta 2 veces la cantidad del mismo en normoxia. Estos datos sugieren que las ROS participan en el mecanismo de regulación de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia.



**Figura 25: Efecto de las ROS sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$  (A) y la HO-1 (B).**

Las células se incubaron en normoxia en presencia de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  durante 8 y 24 h. Los niveles de transcrito de la subunidad  $\beta_1$  (A) y la HO-1 (B) se analizaron por RT-qPCR. La normalización se realizó respecto a los niveles de ribosómico 18S. Representación de los promedios de 4 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

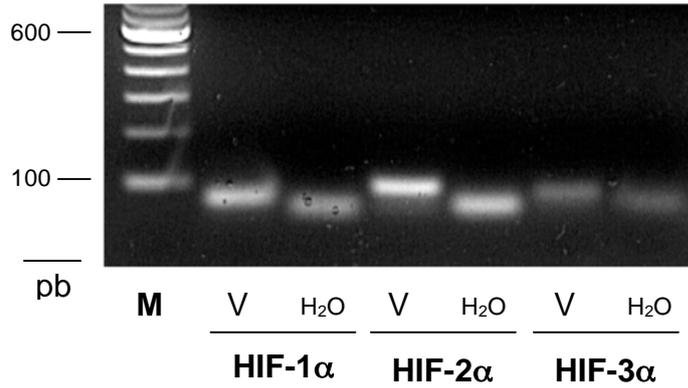
#### **IV.5. La regulación de la expresión de la subunidad $\beta_1$ por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal depende de la familia de factores HIF- $\alpha$ .**

Los resultados obtenidos y expuestos en los apartados anteriores sugieren que el efecto de represión por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  en nuestra preparación se ejerce a nivel transcripcional, que requiere síntesis *de novo* de proteínas y que no depende de calcio extracelular. Además el efecto represor de la hipoxia sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$  es mimetizado por la adición de  $H_2O_2$  en normoxia. El efecto de ROS es posiblemente mediado, entre otros mecanismos, por la inhibición de la actividad de las prolil hidroxilasas, lo que conlleva a la estabilización de las proteínas HIF- $\alpha$ , responsables de regular la transcripción de los genes involucrados en la respuesta celular a la disminución de oxígeno (Brunelle et al., 2005; Guzy et al., 2005; Kaelin, 2005; Mansfield et al., 2005). La participación de HIF- $\alpha$  en la represión de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia es una hipótesis plausible aunque no existen en la literatura ejemplos claros de genes directamente regulados a la baja por dicho factor de transcripción.

##### **IV.5.1. Estudio de la expresión de la familia de factores de transcripción HIF- $\alpha$ en cardiomiocitos de rata neonatal dispersos.**

Como se comentó en la "Introducción", existen tres isoformas de HIF- $\alpha$ : HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ . Con objeto de estudiar cuáles son las isoformas que se expresan en cardiomiocitos se realizaron ensayos de RT-PCR convencionales utilizando oligonucleótidos específicos para cada miembro de la familia de factores HIF- $\alpha$  (Tabla 2). Para esto se utilizaron muestras de RNA total extraído a partir de cultivos de cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal. La figura 26 muestra que en esta preparación se expresan las tres isoformas de HIF $\alpha$ : HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ ..

## Resultados



**Figura 26: Análisis por PCR convencional de la expresión de las distintas isoformas de la familia de factores HIF- $\alpha$ .**

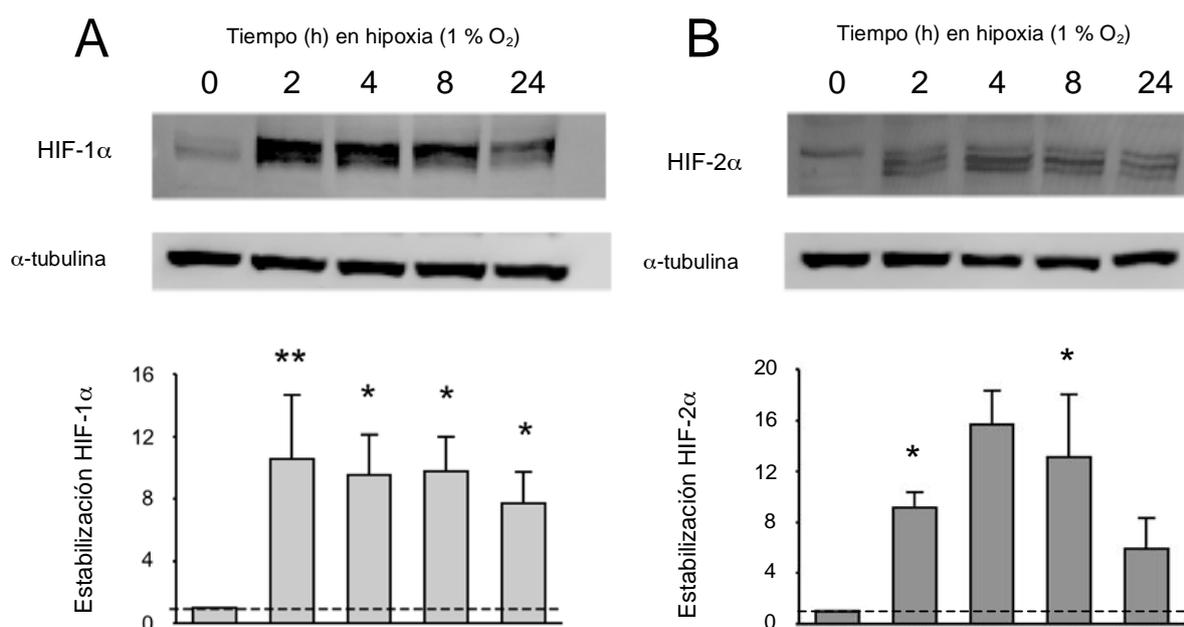
Gel de agarosa al 2 % donde se visualizan los productos de PCR obtenidos a partir de cDNA procedente de cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal (V). Los oligonucleótidos utilizados fueron específicos para cada isoforma (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ ). A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular (M).

### **IV.5.2. Estabilización de las proteínas HIF- $\alpha$ durante la hipoxia en cardiomiocitos de rata neonatal dispersos.**

Puesto que tanto HIF-1 $\alpha$  como HIF-2 $\alpha$  se expresan en cardiomiocitos de rata y existen anticuerpos comerciales para estas proteínas, se estudió el efecto de la hipoxia sobre los dos factores de transcripción, mediante análisis de *Western blots*. En estos experimentos las células se expusieron al 1 % de oxígeno durante 2, 4, 8 y 24 h.

Las figuras 27A y 27B ilustran los cursos temporales de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , respectivamente, inducidas por la hipoxia en nuestra preparación. Bajo la imagen de las bandas de las proteínas analizadas se muestran las gráficas correspondientes a la cuantificación de la estabilización de cada proteína HIF- $\alpha$ , normalizada frente a los niveles de proteína  $\alpha$ -tubulina. Tal y como se pone de manifiesto en estas figuras la hipoxia induce la estabilización tanto de HIF-1 $\alpha$  como de HIF-2 $\alpha$  en esta preparación. Para cada tiempo de hipoxia analizado los niveles de HIF-1 $\alpha$  (Figura 27A) son significativamente superiores a los que existen en normoxia, alcanzando una estabilización máxima en las primeras 2 h de tratamiento hipóxico. A este tiempo, la cantidad relativa de HIF-1 $\alpha$  es de aproximadamente 12-14 veces superior a la que existe en normoxia. Después de este tiempo los niveles de HIF-1 $\alpha$  van disminuyendo de manera lenta y gradual, de forma que a las 24 h de hipoxia los niveles de HIF-1 $\alpha$  son unas 8 veces mayores que en normoxia. Los perfiles de estabilización por la hipoxia de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  en cardiomiocitos muestran ciertas diferencias. La

estabilización de HIF-2 $\alpha$  (Figura 27B) es más lenta que la de HIF-1 $\alpha$ , puesto a que a las 2 h de hipoxia la cantidad relativa de HIF-2 $\alpha$  respecto a normoxia es de 8 veces. La máxima cantidad de HIF-2 $\alpha$  además se alcanza 2 h después que en el caso de HIF-1 $\alpha$ , es decir, tras 4 h de tratamiento, con una cantidad de proteína relativa a la normoxia de aproximadamente 16 veces. Posteriormente los niveles de HIF-2 $\alpha$  van decayendo de manera más pronunciada que en el caso de HIF-1 $\alpha$ ; así a las 24 h de hipoxia los niveles de HIF-2 $\alpha$  bajan hasta unas 5 veces los niveles existentes en normoxia. Estos resultados son compatibles con los datos disponibles en la literatura, según la cual HIF-1 $\alpha$  en músculo cardíaco es más importante en las primeras etapas tras la exposición a hipoxia al regular genes implicados en el metabolismo de la glucosa. En cuanto a HIF-2 $\alpha$ , parece que su papel en el corazón es importante a más largo plazo, y que su función aunque aún está en estudio está más relacionada con el mantenimiento de la homeostasis de la mitocondria y la modulación de factores que regulan la producción de ROS (Shohet y Garcia, 2007).



**Figura 27: Curso temporal de la estabilización de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  inducida por la hipoxia.**

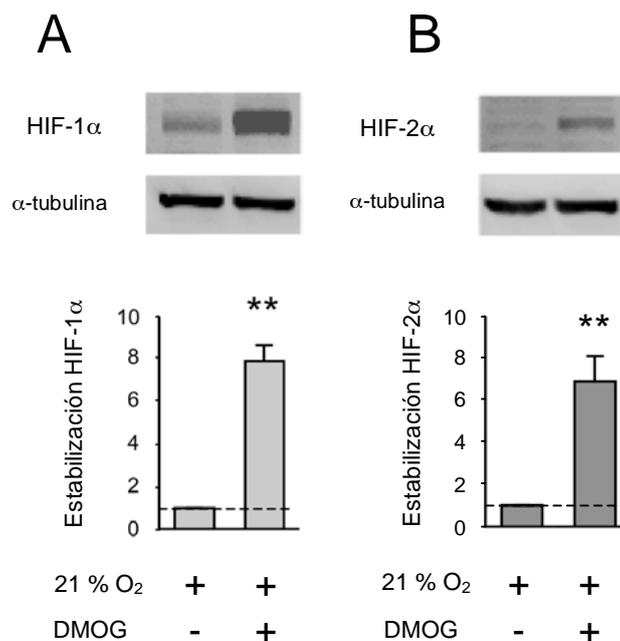
Las células fueron expuestas a hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>) durante diferentes tiempos y los extractos crudos de proteína total sometidos a SDS-PAGE. Los niveles de proteínas HIF-1 $\alpha$  (A) y HIF-2 $\alpha$  (B) fueron analizados por *Western blot*. La cuantificación se realizó normalizando los niveles de ambas proteínas respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. Representación de los promedios de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de ambas proteínas en normoxia.

### **IV.5.3. Estudio del efecto de los compuestos miméticos de la hipoxia sobre el músculo cardíaco.**

#### **IV.5.3.1. La dimetiloxalilglicina (DMOG) induce la estabilización de las proteínas HIF- $\alpha$ en normoxia en cardiomiocitos dispersos de rata neonatal.**

El DMOG se usa desde hace años como un compuesto mimético de la hipoxia. Su estructura molecular le permite ocupar el sitio activo de las prolil hidroxilasas, impidiendo así la unión del sustrato natural de estas enzimas, el  $\alpha$ -cetoglutarato. Como consecuencia, las reacciones de hidroxilación que estas enzimas llevan a cabo son inhibidas y las proteínas HIF- $\alpha$  se mantienen deshidroxiladas y se estabilizan.

Con objeto de comprobar el efecto del DMOG sobre nuestra preparación se procedió a la aplicación de este compuesto en normoxia a una concentración de 1 mM. Tras 4 h de tratamiento, coincidiendo con niveles máximos de estabilización de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  en hipoxia, se extrajeron extractos crudos de proteína de estas muestras que posteriormente fueron analizados por *Western blot*. En la figura 28A y 28B se observa que, como era de esperar, el DMOG indujo la estabilización de HIF-1 $\alpha$  (Figura 28A) y de HIF-2 $\alpha$  (Figura 28B) en cardiomiocitos dispersos de rata neonatal. La normalización con  $\alpha$ -tubulina permitió la cuantificación de la magnitud de la inducción, que fue significativa para ambas proteínas; aproximadamente 8 veces con respecto a la normoxia en el caso de HIF-1 $\alpha$ , y unas 7 veces en el caso de HIF-2 $\alpha$ .



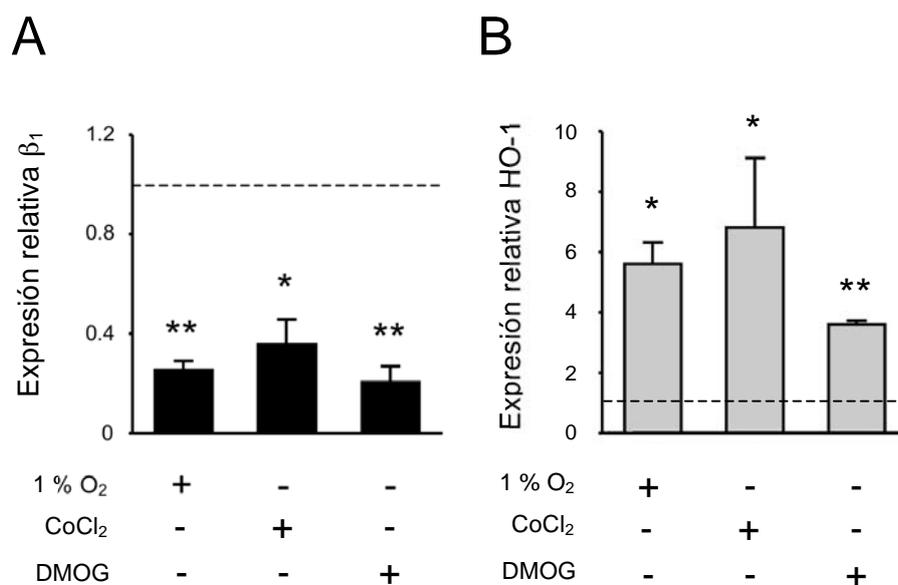
**Figura 28: Estabilización de las proteínas HIF-1α y HIF-2α inducida por DMOG.**

Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de DMOG 1 mM durante 4 h en normoxia. Los extractos crudos de proteína total fueron sometidos a SDS-PAGE y los niveles de proteínas HIF-1α (A) y HIF-2α (B) fueron analizados por *Western blot*. La cuantificación se realizó normalizando los niveles de ambas proteínas respecto a los niveles de α-tubulina. Representación de los promedios de 6 experimentos ± el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de ambas proteínas en normoxia.

#### IV.5.3.2. Estudio del efecto de los compuestos miméticos de la hipoxia sobre la regulación de la expresión de la subunidad β<sub>1</sub> en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal.

Para determinar si el DMOG mimetizaba el efecto de la hipoxia sobre la regulación de la expresión de la subunidad β<sub>1</sub> en nuestra preparación se procedió a la incubación de la misma en normoxia durante 24 h en presencia de 1 mM DMOG. Tras la extracción de RNA total de estas muestras se realizó el análisis mediante RT-qPCR. El resultado de este análisis se puede visualizar en la figura 29A, e indica que este tratamiento, al igual que el tratamiento hipóxico, reprimió la expresión de la subunidad β<sub>1</sub> en esta preparación. Además, el CoCl<sub>2</sub>, otro compuesto mimético de la hipoxia que inhibe a las prolin hidroxilasas, añadido al medio a una concentración de 100 μM tuvo también un efecto represor sobre la expresión de la subunidad β<sub>1</sub>, tal y como se observa en la misma figura. La aplicación de DMOG produjo una represión de la subunidad β<sub>1</sub> de un 75 % aproximadamente, mientras que el efecto represor del CoCl<sub>2</sub> fue de un 60 %

aproximadamente. Los niveles de HO-1 (Figura 29B) también fueron analizados en estos experimentos, y al igual que la hipoxia, en presencia de ambos compuestos el mensajero de este gen se indujo de manera significativa: unas 3 veces en el caso del DMOG y unas 7 veces en el del CoCl<sub>2</sub>. Estos datos sugieren que la familia de factores de transcripción HIF- $\alpha$  pueden estar implicados en el mecanismo de regulación a la baja por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  en nuestra preparación.



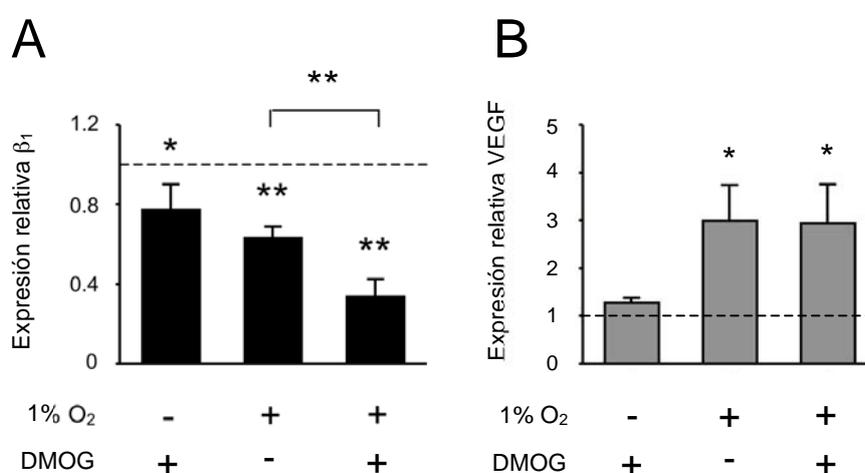
**Figura 29: Efecto de los compuestos miméticos de la hipoxia sobre expresión de la subunidad  $\beta_1$  (A) y la HO-1 (B) en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal.**

Análisis por RT-qPCR del efecto de la exposición de las células a CoCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M y DMOG 1 mM durante 24 h en normoxia sobre ambos mensajeros. La normalización se realizó respecto a los niveles de ribosómico 18S. Representación de los promedios de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

#### IV.5.3.3. Estudio del efecto de los compuestos miméticos de la hipoxia sobre la regulación de la expresión de la subunidad $\beta_1$ en el músculo cardíaco adulto.

El efecto del DMOG sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$  se analizó en el tejido adulto (Figura 30A). Los fragmentos de tejido adulto, de unos 2-3 mm de diámetro, se incubaron en las mismas condiciones que las preparaciones de cardiomiocitos dispersos. Cuando la aplicación del compuesto se realizó en normoxia se observó que tras 24 h de tratamiento se producía un descenso leve pero significativo en los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$ . No se observó en esta condición una inducción

significativa del mensajero de VEGF, gen control e inducible por la hipoxia (Figura 30B). En este grupo de experimentos y como era de esperar, tanto el mensajero de la subunidad  $\beta_1$  como el de VEGF se regulan por la hipoxia; en este caso la cantidad relativa de la subunidad  $\beta_1$  disminuyó un 35 % respecto a la cantidad en normoxia, y la de VEGF se indujo unas 3,5 veces. Cuando se aplicaron los estímulos de hipoxia y DMOG de manera simultánea, el mensajero de VEGF no sufrió una inducción significativa respecto a la condición hipoxia. Por el contrario el mensajero de la subunidad  $\beta_1$  en esta condición experimental se reprimió aún más (un 70 % aproximadamente) que en hipoxia (un 35 % aproximadamente).



**Figura 30: Efecto del DMOG sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$  (A) y VEGF (B) en músculo cardíaco adulto.**

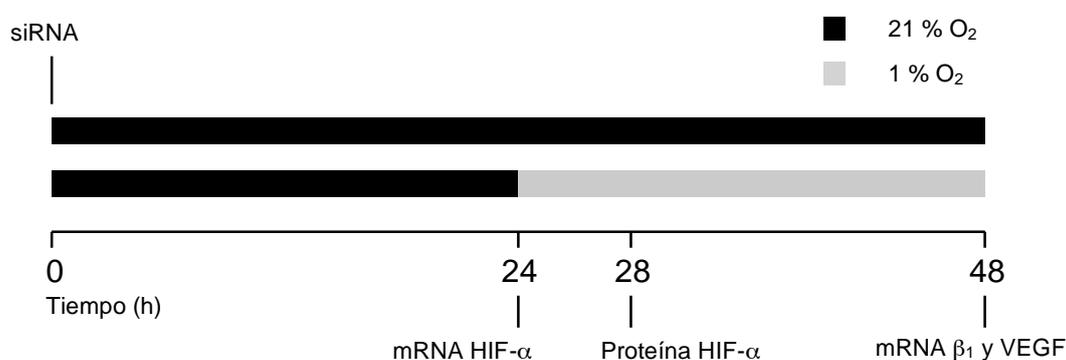
El tejido fue troceado e incubado en el medio de cultivo estándar durante 24 h en presencia o ausencia de DMOG 1 mM tanto en normoxia como en hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>). Los niveles de ambos mensajeros fueron normalizados frente al ribosómico 18S. El resultado se muestra como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) (n=6). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

#### **IV.5.4. La regulación de la expresión de la subunidad $\beta_1$ por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal depende de HIF-2 $\alpha$ , no de HIF-1 $\alpha$ .**

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que las proteínas HIF- $\alpha$  participan en el mecanismo de represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia en músculo cardíaco. Para corroborar la participación de esta familia de factores de transcripción en este fenómeno se realizaron experimentos con RNA de interferencia (siRNA) para HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , lo que además nos permitió analizar la contribución de cada uno de estos

## Resultados

factores de transcripción por separado. El protocolo seguido en esta serie de experimentos se muestra en la figura 31. Estos tuvieron una duración completa de 48 h, siempre en presencia de los diferentes siRNA, a una concentración de 25 nM. Como control negativo se utilizó un siRNA de secuencia aleatoria (*scramble*), a la misma concentración. Tras 24 h de interferencia en normoxia los niveles de mRNA de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y de la subunidad  $\beta_1$  fueron analizados por RT-qPCR, a fin de determinar la eficiencia de cada tratamiento. Posteriormente, las muestras se sometieron a hipoxia (1 % de O<sub>2</sub> durante 24 h) y tras este periodo, los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  y del VEGF se estimaron por RT-qPCR. Para corroborar la eficacia de los tratamientos de interferencia se estimó por *Western blot* la estabilización de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  después de las 4 primeras h de hipoxia, tiempo en el que tanto HIF-1 $\alpha$  como HIF-2 $\alpha$  alcanzan en condición de hipoxia su pico máximo de estabilización.

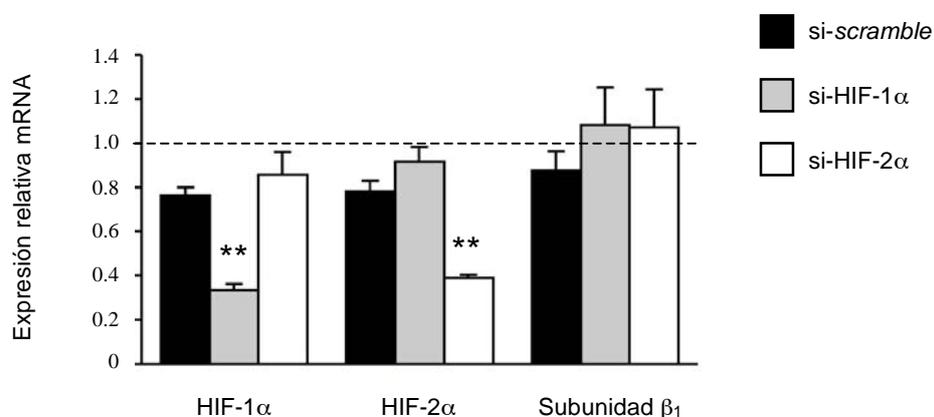


**Figura 31: Protocolo seguido en los experimentos de RNA de interferencia para HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ .**

Las células fueron incubadas durante 48 h en presencia de siRNA para HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  o *scramble* a una concentración de 25 nM. Los niveles de mensajero de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y la subunidad  $\beta_1$  fueron analizados por RT-qPCR tras las primeras 24 h de tratamiento. El nivel de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  y VEGF se analizaron, además, a tiempo final. Los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  se determinaron por *Western blot* tras las primeras 4 h de hipoxia. El resultado se muestra como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) (n=6).

En la figura 32 se muestra que tras las primeras 24 h de tratamiento con los diferentes siRNAs en normoxia se produjo un efecto selectivo sobre los mRNAs de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ . La interferencia de HIF-1 $\alpha$  (gris) resultó en una disminución de la cantidad relativa del mensajero de hasta un 70 % con respecto a la cantidad relativa del mismo en normoxia. Por el contrario el siRNA *scramble* (negro) y el siRNA para HIF-2 $\alpha$  (blanco) no afectaron a los niveles del mensajero de HIF-1 $\alpha$ . La interferencia de HIF-2 $\alpha$ , dio lugar al descenso del mRNA hasta aproximadamente el 30 % de su valor en la normoxia. Sin embargo, los otros tratamientos no afectaron de manera significativa a este transcrito.

Los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  no se afectaron por la interferencia de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ .

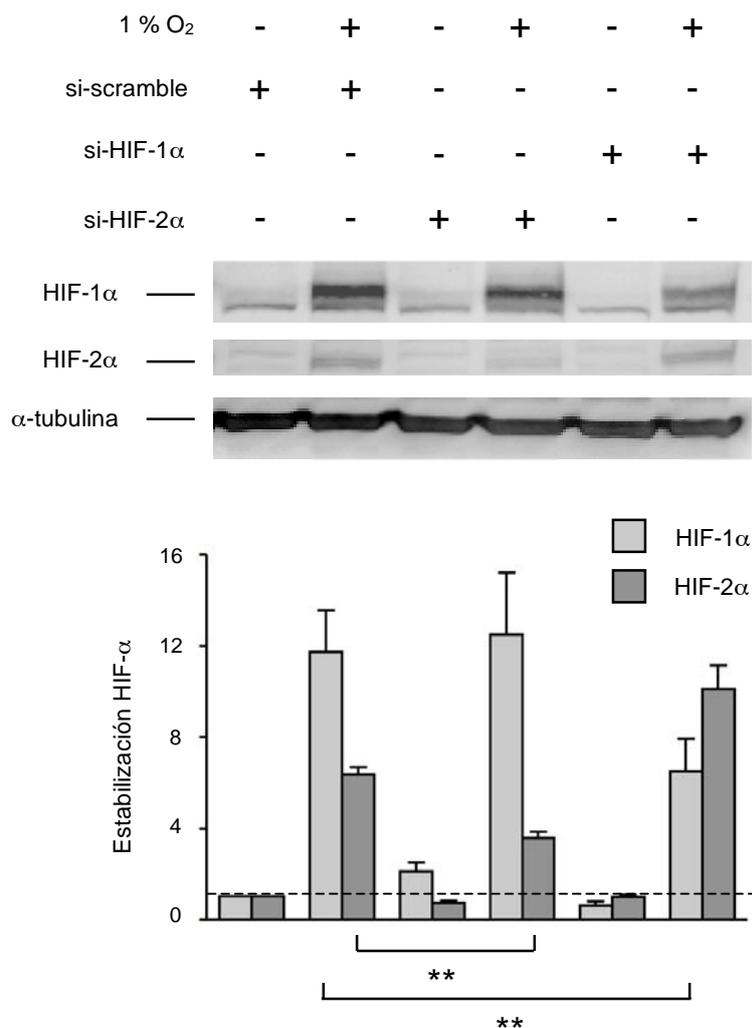


**Figura 32: Análisis por RT-qPCR de la especificidad de los siRNA para HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  tras 24 h de tratamiento.**

Los niveles de mensajero de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y subunidad  $\beta_1$  fueron analizados tras 24 h de tratamiento con los distintos siRNA. Como control negativo se utilizó un siRNA de secuencia aleatoria (*scramble*). La concentración empleada fue de 25 nM. Los niveles de mensajero fueron normalizados frente al ribosómico 18S. El resultado se muestra como el promedio de 6 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de los genes en normoxia.

Una vez verificada la especificidad de los tratamientos de interferencia a nivel de transcripción se procedió a analizar la estabilización de las proteínas HIF- $\alpha$  para cada tratamiento, tanto en normoxia como en hipoxia (Figura 33). La magnitud de la estabilización se cuantificó normalizando los niveles de cada proteína en cada condición experimental frente a la condición normoxia más *scramble*. En presencia de *si-scramble* tanto HIF-1 $\alpha$  (gris claro) como HIF-2 $\alpha$  (gris oscuro) se estabilizaron significativamente tras 4 h de hipoxia, unas 12 y 6 veces, respectivamente, respecto al control en normoxia más *scramble*.

## Resultados



**Figura 33: Estabilización de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  inducida por la hipoxia tras el tratamiento de siRNA para HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ .**

Las células fueron incubadas durante 24 h en normoxia en presencia de los diferentes siRNA. El tratamiento hipóxico posterior fue de 4 h. Los extractos crudos de proteína total fueron sometidos a SDS-PAGE y los niveles de proteínas HIF-1 $\alpha$  (A) y HIF-2 $\alpha$  (B) fueron analizados por *Western blot*. La cuantificación se realizó normalizando los niveles de ambas proteínas respecto a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. Representación de los promedios de 6 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de ambas proteínas en normoxia, en presencia de *scramble*.

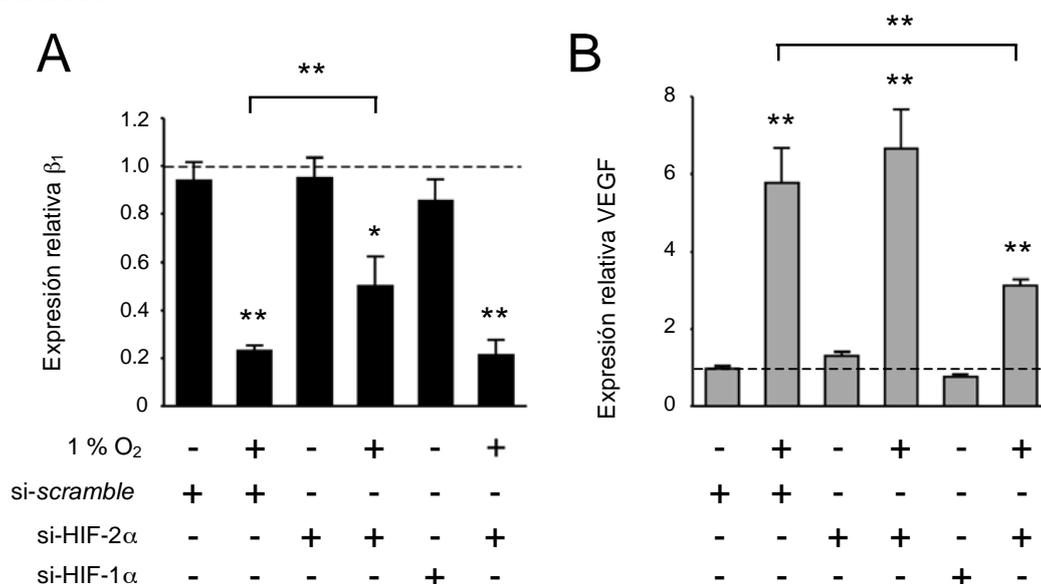
La incubación de las células en presencia de siRNA específico para HIF-2 $\alpha$  en hipoxia no cambió la cantidad relativa de HIF-1 $\alpha$  respecto a la cantidad en hipoxia con *scramble* (unas 12 veces), mientras que la proteína HIF-2 $\alpha$  sufrió una estabilización significativamente menor (3,5 veces) respecto a la situación control (6 veces). El tratamiento con siRNA específico para HIF-1 $\alpha$  produjo una disminución significativa de los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$  respecto al control (6 veces respecto a 12). En cambio, la estabilización de HIF-2 $\alpha$  no se vió afectada. El efecto de los distintos tratamientos sobre

la estabilidad de las proteínas HIF- $\alpha$  no fue significativo en condiciones de normoxia, aunque los tratamientos específicos tanto para HIF-1 $\alpha$  como para HIF-2 $\alpha$  tendían a disminuir de manera específica los niveles de estas dos proteínas. Por lo tanto podemos concluir que los diferentes tratamientos con siRNAs eran específicos y eficientes también a nivel de proteína.

A continuación se procedió a determinar el efecto de cada tratamiento de siRNA sobre la regulación por la hipoxia de la expresión de la subunidad  $\beta_1$ . Como se comentó con anterioridad este análisis por RT-qPCR se realizó tras 48 h de experimento, tanto para las muestras de normoxia como para las de hipoxia. Estas últimas fueron incubadas durante 24 h en hipoxia tras 24 h de tratamiento en normoxia en presencia de cada siRNA, con objeto de inhibir la transcripción de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ . Cuando los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  fueron analizados en estos experimentos (Figura 34A) se comprobó que la hipoxia en presencia de siRNA específico para HIF-1 $\alpha$  tuvo un efecto represor similar al observado en presencia de siRNA *scramble*. En ambas condiciones el descenso de los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  fue aproximadamente de un 75 % respecto a los niveles de este transcrito en normoxia. Sin embargo, el tratamiento con siRNA específico para HIF-2 $\alpha$  produjo una reversión parcial con respecto a la represión en presencia de siRNA *scramble*; así, la cantidad relativa de mensajero fue de un 25 % en hipoxia más *scramble*, mientras que en presencia de siRNA para HIF-2 $\alpha$  la cantidad relativa de transcrito subió hasta el 60 % de la cantidad del mismo en normoxia. La magnitud del cambio entre ambas condiciones (hipoxia más *scramble* e hipoxia más siRNA para HIF-2 $\alpha$ ) fue significativa, lo cual nos indicó que HIF-2 $\alpha$  y no HIF-1 $\alpha$  es el factor que está participando en la regulación a la baja por hipoxia del mensajero de la subunidad  $\beta_1$ .

El resultado expuesto anteriormente se complementó con el análisis de la expresión del gen VEGF por RT-qPCR en los mismos experimentos. Como se observa en la figura 34B este gen se induce por la hipoxia en situación control (en presencia de *scramble*) unas 6 veces, al igual que en presencia de siRNA específico para HIF-2 $\alpha$ . Cuando el tratamiento de hipoxia se realizó en presencia de siRNA específico para HIF-1 $\alpha$  en cambio la inducción de este mensajero fue significativamente menor, aproximadamente 3 veces respecto a la normoxia. Este resultado evidenció que como ocurre en otros tejidos la inducción de VEGF en nuestra preparación es dependiente de HIF-1 $\alpha$  y no de HIF-2 $\alpha$ . Además corroboró la especificidad de los tratamientos de interferencia empleados tanto para HIF-1 $\alpha$  como para HIF-2 $\alpha$ .

## Resultados



**Figura 34: Análisis por RT-qPCR de la regulación por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  (A) y VEGF (B) tras el tratamiento de siRNA para HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ .**

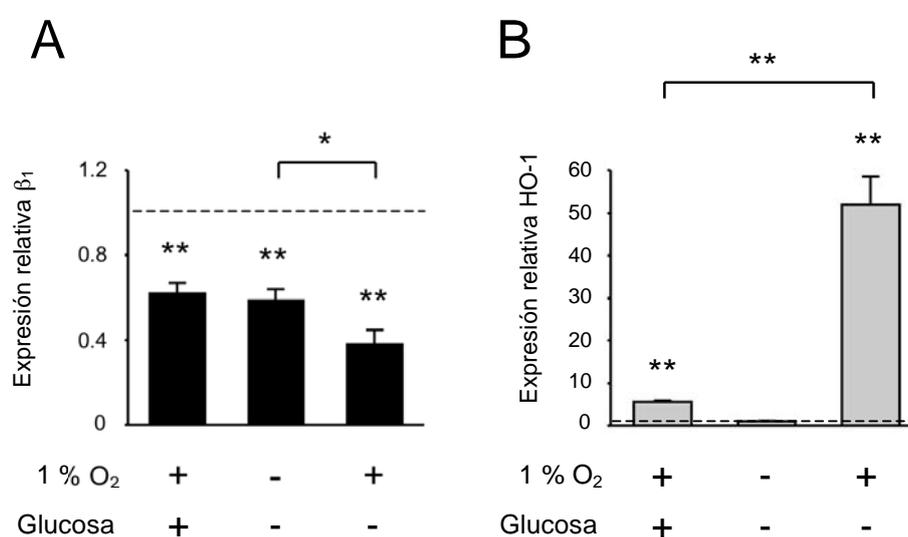
Los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  y VEGF fueron analizados tras el tratamiento con los distintos siRNA. Como control negativo se utilizó un siRNA de secuencia aleatoria (*scramble*). La concentración empleada fue de 25 nM. Las muestras expuestas a hipoxia se incubaron 24 h en esta condición, después de 24 h en normoxia en presencia de cada tratamiento de siRNA. Los niveles de mensajero fueron normalizados frente al ribosómico 18S. El resultado se muestra como el promedio de 6 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

## V. REGULACIÓN POR LA GLUCOSA DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES DISPERSOS DE RATA NEONATAL.

La disminución en los niveles de glucosa extracelular representa un estrés que en la mayoría de los tejidos (y especialmente en el hígado) provoca una modificación en el patrón de expresión de numerosos genes (Meugnier et al., 2007). En hepatocitos existe una relación muy estrecha entre las señales de hipoxia y glucosa, de manera que el HRE puede funcionar como un GlcRE (*Glucose Response Element*) y viceversa. Este hecho podría tener un papel importante en la regulación de procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Kietzmann et al., 2002); de hecho, la isquemia (déficit de oxígeno y glucosa) es una situación fisiopatológica de gran importancia médica. Puesto que la hipoxia reprime la expresión de la subunidad  $\beta_1$  en músculo cardíaco se estudió si la disminución en el aporte de glucosa afecta los niveles de mRNA de esta proteína y si ambos estímulos aplicados simultáneamente se potencian. Para cumplir este objetivo los cardiomiocitos dispersos de rata neonatal se incubaron en un medio de cultivo formulado en ausencia de glucosa durante 24 h, tanto en normoxia como en hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>). Este medio de cultivo se suplementó con 18 mM glucosa para las muestras

control de normoxia e hipoxia, concentración de glucosa presente en el medio de cultivo general de esta preparación de células.

En la figura 35 se resumen los resultados obtenidos en los experimentos explicados en el párrafo anterior. En normoxia la ausencia de glucosa respecto a la situación control tuvo el mismo efecto sobre el transcrito de la subunidad  $\beta_1$  que la hipoxia: disminuyó sus niveles de forma significativa (Figura 35A). Así, la represión alcanzada en ambas condiciones experimentales fue de un 40 % aproximadamente. Sin embargo en normoxia la ausencia de glucosa no produjo modificación en los niveles de mensajero de HO-1 respecto a la situación control (Figura 35B). La combinación de ambos estímulos simultáneamente, ausencia de glucosa más hipoxia, produjo un descenso de los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  mayor al registrado en hipoxia más glucosa (represión del 60 % y 40 %, respectivamente). En cambio los niveles de mensajero de la HO-1 en esta condición sufrieron un incremento muy alto: más de 50 veces respecto de la situación control. De este modo podemos concluir que la ausencia de glucosa es un estímulo que, al igual que la hipoxia, tiene un efecto represor sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$ . El hecho de que la represión de este mensajero en hipoxia y ausencia de glucosa sea significativamente mayor que en hipoxia en presencia de glucosa, indica que ambos estímulos tienen un efecto sumatorio sobre la regulación de la expresión de la subunidad  $\beta_1$ .



**Figura 35: Efecto de la ausencia de glucosa sobre la regulación de la subunidad  $\beta_1$  (A) y HO-1 (B).** Las células fueron incubadas durante 24 h en presencia o en ausencia de 18 mM glucosa, tanto en normoxia como en hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>). Posteriormente se analizaron los niveles de ambos mensajeros por RT-qPCR. Los niveles de mensajero fueron normalizados frente al ribosómico 18S. El resultado se muestra como el promedio de 5 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). La línea discontinua indica el nivel de expresión de ambos genes en normoxia.

## VI. IMPORTANCIA FISIOPATOLÓGICA DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ POR LA HIPOXIA EN CARDIOMICITOS VENTRICULARES DISPERSOS DE RATA NEONATAL: ENSAYOS FUNCIONALES.

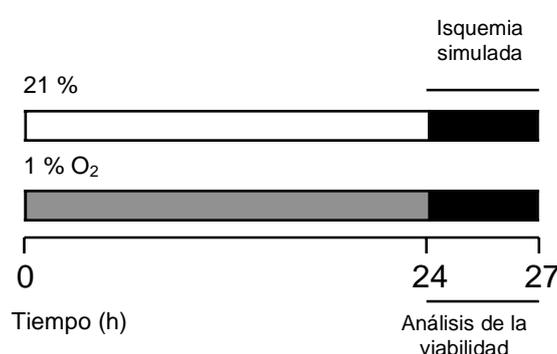
El músculo cardíaco, al igual que otros tejidos, tiene la capacidad intrínseca de responder y adaptarse a diversos estímulos, entre los que se encuentra la hipoxia. La adaptación a hipoxia (o isquemia) del músculo cardíaco le dotan de resistencia a insultos isquémicos (o hipóxicos) posteriores; fenómeno que se denomina **precondicionamiento**. Dependiendo del estímulo que lo desencadena, este fenómeno puede clasificarse en varios tipos. En el precondicionamiento isquémico la exposición de animales o corazones aislados a periodos cortos de isquemia seguidos de periodos cortos de perfusión inducen protección frente a un insulto isquémico posterior (Yellon y Downey, 2003; Zaugg et al., 2003). Por otro lado, se ha descrito que episodios cortos de hipoxia inducen el desarrollo de mecanismos de resistencia frente a insultos isquémicos posteriores (Lasley et al., 1993; Shizukuda et al., 1992). Este fenómeno, denominado precondicionamiento hipóxico, también se ha observado en preparaciones de cardiomiocitos aislados (Silverman et al., 1997). Por último, el precondicionamiento farmacológico se consigue mediante la aplicación de fármacos, algunos de los cuales activan a ciertos canales iónicos, que protegen al músculo cardíaco frente al posterior insulto isquémico (Yellon y Downey, 2003; Zaugg et al., 2003).

Generalmente, los fenómenos de precondicionamiento se han estudiado sobre el animal *in vivo* o sobre corazones aislados, en los que la cardioprotección se manifiesta como una disminución del área infartada tras el insulto isquémico final. Cuando el precondicionamiento se estudia sobre células en cultivo, la isquemia ha de ser simulada sobre la preparación de células dispersas, para lo cual existen numerosos protocolos *in vitro* validados y ampliamente aceptados (Armstrong et al., 1994; Diaz y Wilson, 2006; Ikonomidis et al., 1994; Vander Heide et al., 1990). Los resultados que se exponen a continuación se obtuvieron de experimentos en los que se empleó uno de estos modelos *in vitro* de isquemia simulada sobre la preparación de cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal. Este modelo, que aparece detallado en “Materiales y Métodos”, básicamente consiste en la separación de las células de la placa de cultivo tras la aplicación del estímulo en cuestión y la posterior centrifugación de las células. Después de eliminar el medio de cultivo, se añade una capa de aceite mineral sobre el precipitado de células para bloquear el intercambio gaseoso entre las células y el exterior. En esas condiciones, los cardiomiocitos se encuentran en un entorno similar al que se genera en situación de isquemia.

### VI.1. Precondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal.

#### VI.1.1. La hipoxia crónica y severa aumenta la viabilidad de los cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal durante la isquemia simulada.

Con objeto de estudiar si el estímulo hipóxico aplicado a nuestra preparación generaba algún efecto sobre la viabilidad del cultivo ante un insulto isquémico posterior, se realizaron experimentos siguiendo el protocolo que se muestra en la figura 36. Las células se incubaron durante 24 h en normoxia (blanco) o en hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>; gris), y posteriormente se sometieron a una isquemia simulada de 3 h. A lo largo de esta isquemia la viabilidad del cultivo se analizó mediante la toma de alícuotas de células procedentes del precipitado celular, tinción con azul tripán y posterior cuantificación del número de células. La proporción de células no teñidas, y por tanto vivas, respecto al número total de células contadas nos informó sobre la viabilidad del cultivo en el momento de la isquemia en el que se realizó la toma de la muestra.



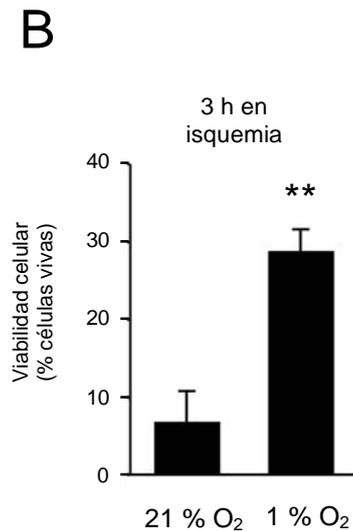
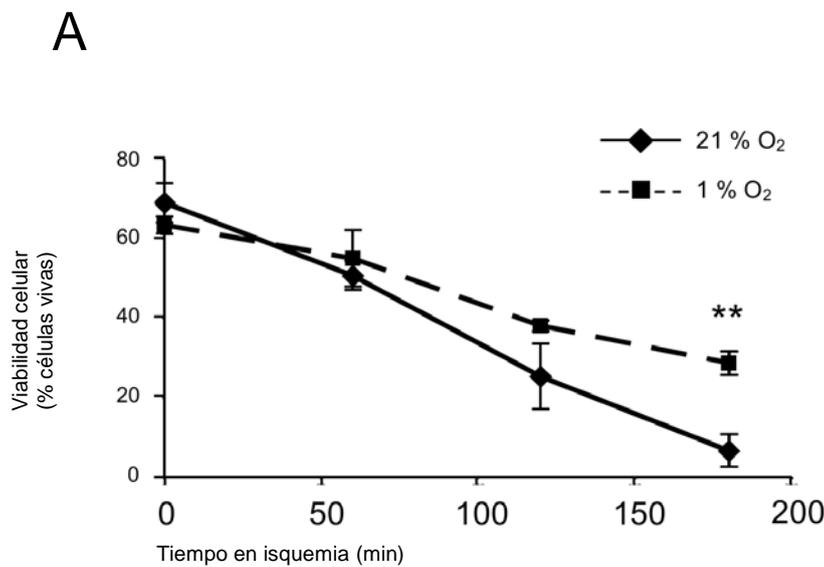
**Figura 36: Protocolo seguido en los experimentos funcionales de precondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal.**

Las células fueron incubadas en normoxia (blanco) o hipoxia (gris) durante 24 h. Posteriormente fueron sometidas a un período de “isquemia simulada” con una duración total de 3 h, a lo largo del cual se analizó la viabilidad celular del cultivo.

El resultado de los experimentos anteriormente expuestos se muestran en la figura 37A. En ella se observa como la viabilidad del cultivo disminuye en cada condición experimental a lo largo de la isquemia simulada. Las células que estuvieron expuestas a 24 h de hipoxia muestran un descenso de la viabilidad celular menos pronunciado que las que fueron incubadas en normoxia. A las 2 h del inicio de la isquemia la diferencia entre ambas condiciones experimentales se hace patente, y a las 3 h el porcentaje de

## Resultados

células vivas es significativamente mayor en la condición hipoxica frente a la condición normoxica. En la figura 37B se muestra la cuantificación del ensayo de viabilidad, expresado como porcentaje de células vivas respecto al total de células, a las 3 h de la isquemia. De las células incubadas en hipoxia, aproximadamente el 30 % es aún viable tras 3 h de isquemia, mientras que de las incubadas en normoxia sólo un 10 % permanecen vivas. La hipoxia crónica, por tanto, “precondiciona” al cultivo ya que permite a las células que han sido expuestas a hipoxia ser más resistentes ante un insulto isquémico posterior.

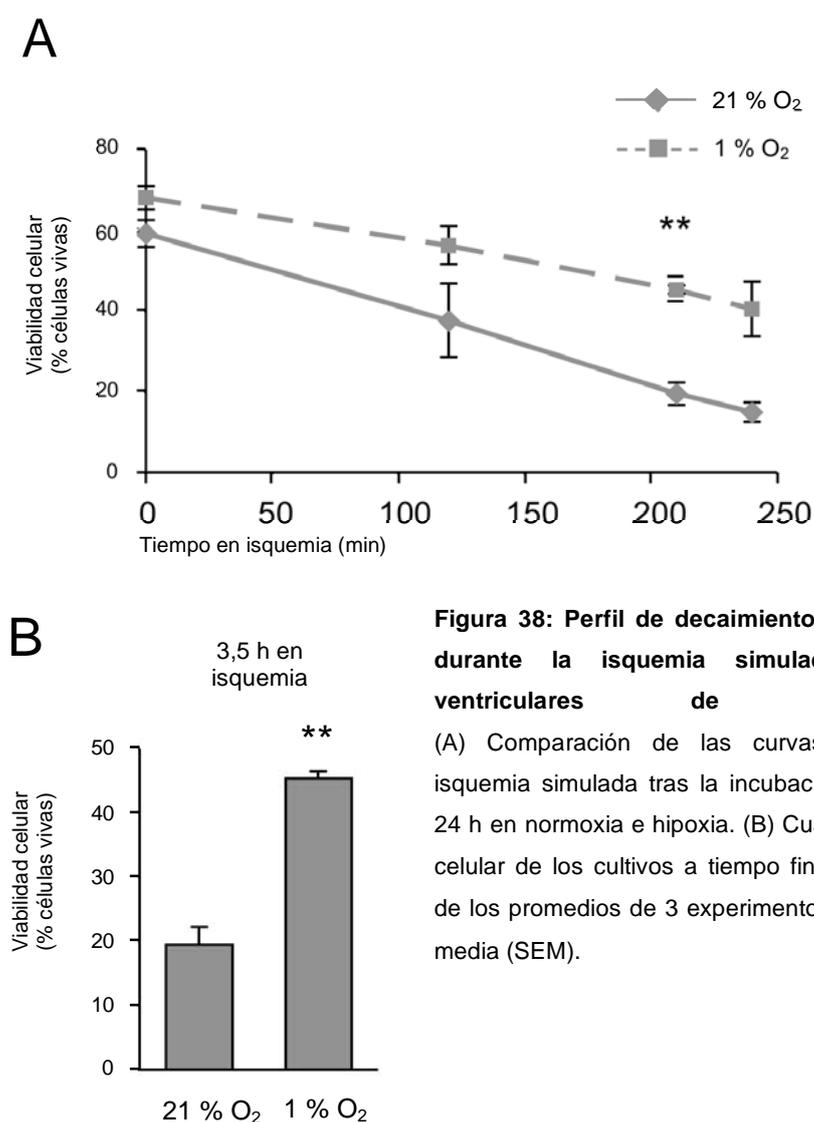


**Figura 37: Perfil de decaimiento de la viabilidad celular durante la isquemia simulada en cardiomiocitos ventriculares de rata neonatal.**

(A) Comparación de las curvas generadas durante la isquemia simulada tras la incubación de las células durante 24 h en normoxia e hipoxia. (B) Cuantificación de la viabilidad celular de los cultivos a tiempo final (3 h). Representación de los promedios de 3 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

### VI.1.2. Precondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos ventriculares dispersos de ratón neonatal.

Para determinar si el fenómeno del precondicionamiento hipóxico descrito para cardiomiocitos de rata en el apartado anterior también se observa en otras especies se realizaron dispersiones a partir de corazón de ratón neonatal, a las cuales se aplicó el protocolo esquematizado en la figura 36. El resultado de estos ensayos se muestra en la figura 38, en la que se observa que en esta preparación la hipoxia también promueve un incremento en la viabilidad del cultivo ante la isquemia. En este caso la diferencia en la viabilidad celular se hizo significativa media hora después que en el caso de la preparación precedente de rata, es decir, tras 3,5 h de isquemia. La cuantificación de la viabilidad celular a tiempo final se muestra en la figura 38B. Para esta preparación la supervivencia en hipoxia es cercana al 50 %, mientras que en normoxia sólo un 20 % de células aproximadamente sobrevive al insulto isquémico.

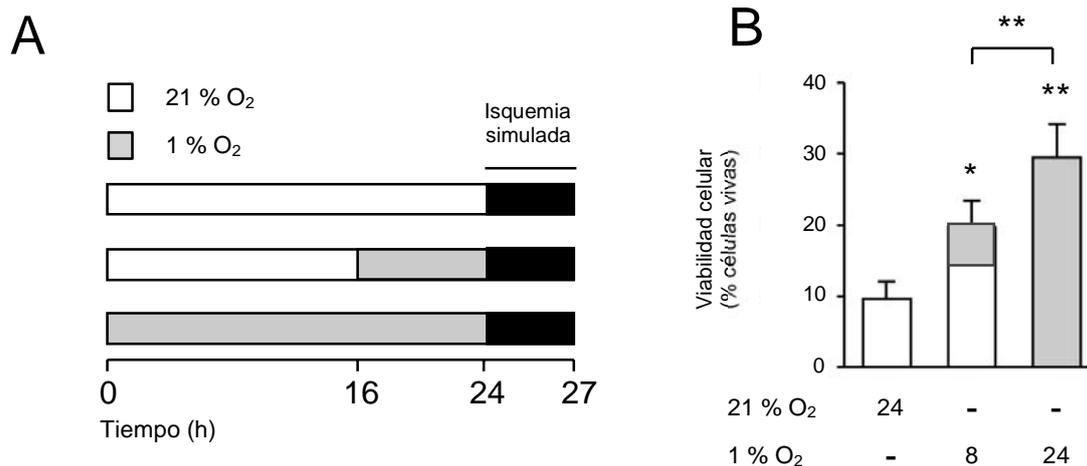


## **VI.2. Caracterización del preconditionamiento hipóxico.**

Una vez descrita la existencia del preconditionamiento hipóxico en nuestras preparaciones quisimos caracterizar este fenómeno con más detalle.

### **VI.2.1. Dependencia del preconditionamiento hipóxico del tiempo de exposición al estímulo hipóxico en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal.**

En nuestro modelo celular ha quedado demostrado que la magnitud de la regulación de la expresión de la HO-1 y de la subunidad  $\beta_1$  depende del tiempo de exposición a la hipoxia. Así, la inducción de la HO-1 y la represión de la subunidad  $\beta_1$  son mayores a las 24 h que tras 8 h de hipoxia (Figura 17A y 17B). Por lo tanto es plausible pensar que, si el mecanismo subyacente al preconditionamiento hipóxico implica la modificación de los patrones de expresión génica, dicho fenómeno sería también dependiente del tiempo de exposición a hipoxia. Para comprobar esta hipótesis se realizaron los experimentos esquematizados en la figura 39A. En ellos los cardiomiocitos de rata neonatal dispersos fueron sometidos a 8 y 24 h de hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>), y después de 3 h de isquemia simulada la viabilidad de estas preparaciones fueron comparadas con la de las células incubadas en condiciones normóxicas. El resultado de estas pruebas, representado en la figura 39B evidenció que en efecto, las células expuestas a 24 h de hipoxia sobrevivían mejor a la isquemia simulada que las células incubadas durante 8 h de hipoxia, con un cambio en la viabilidad celular significativo entre ambas condiciones. El porcentaje de células vivas de estos cultivos a tiempo final fue de aproximadamente 30 % y 20 %, respectivamente, frente al 10 % registrado para las células incubadas en normoxia.



**Figura 39: Dependencia del preconditionamiento hipóxico del tiempo de exposición al estímulo hipóxico.**

(A) Protocolo seguido en esta serie de experimentos. Las células fueron incubadas en normoxia (blanco) durante 24 h o en hipoxia (gris) durante 8 o 24 h. Posteriormente fueron sometidas a isquemia simulada durante 3 h. (B) Cuantificación de la viabilidad celular de los cultivos a tiempo final (3 h). Representación de los promedios de 7 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

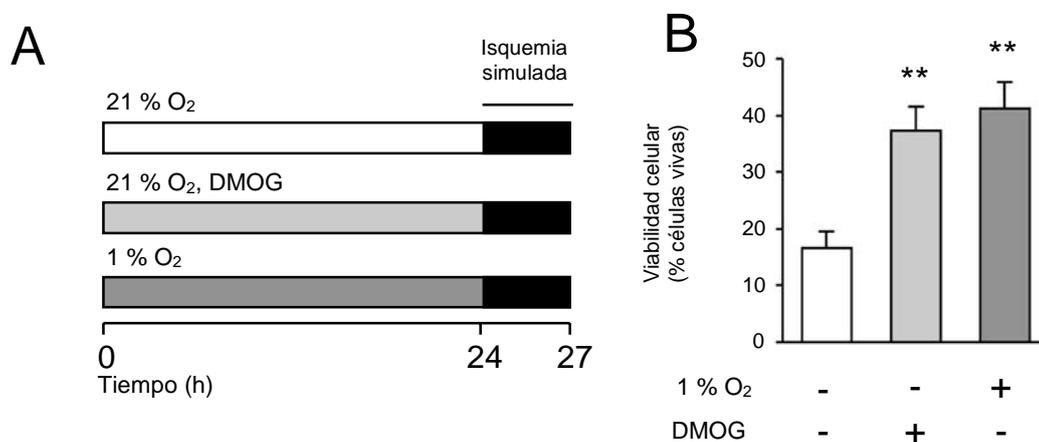
### VI.2.2. Dependencia del preconditionamiento hipóxico de la estabilización de la familia de factores de transcripción HIF- $\alpha$ en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal.

Continuando con la caracterización del preconditionamiento hipóxico quisimos profundizar en el estudio de los mecanismos responsables de este fenómeno en los cardiomiocitos dispersos de rata neonatal. La familia de factores de transcripción HIF- $\alpha$  es la principal responsable de disparar la reprogramación génica frente a la hipoxia, y está implicada en algunos modelos de preconditionamiento (Cai et al., 2003; Cai et al., 2008; Date et al., 2005; Loor y Schumacker, 2008), por lo que quisimos comprobar si la estabilización de estas proteínas pudieran estar implicadas en el preconditionamiento hipóxico en nuestro modelo celular. Para ello se realizaron experimentos en los que se compararon las respuestas a la isquemia de células expuestas a normoxia (blanco), hipoxia (gris oscuro) y normoxia en presencia del mimético de hipoxia DMOG (gris claro), como se esquematiza en la figura 40A. Este compuesto, como quedó demostrado en la figura 28, estabiliza los niveles de proteínas HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  en normoxia.

Tal y como se muestra en la figura 40B la supervivencia observada tras 3 h de isquemia de las células incubadas en presencia de DMOG es similar a la registrada en hipoxia; en ambos casos la proporción de células vivas es de aproximadamente un 40 % respecto al total. En cambio, sólo sobreviven a la isquemia aproximadamente un 18 %

## Resultados

de células incubadas en normoxia. El DMOG por tanto mimetiza a la hipoxia y genera el mismo nivel de preconditionamiento que la hipoxia. Este resultado indica, por lo tanto, que la familia de factores de transcripción HIF- $\alpha$  están implicados en nuestro modelo de preconditionamiento hipóxico.



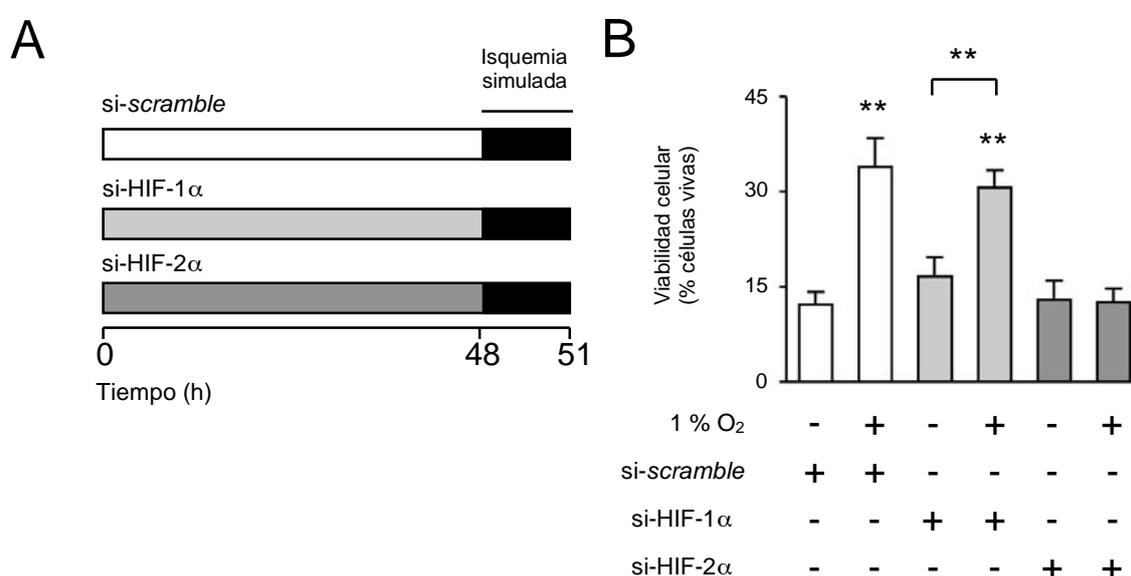
**Figura 40: Dependencia del preconditionamiento hipóxico de la estabilización de la familia de factores HIF- $\alpha$ .**

(A) Protocolo seguido en esta serie de experimentos. Las células fueron incubadas durante 24 h en normoxia (blanco), hipoxia (gris oscuro) o en normoxia en presencia de DMOG 1mM. Posteriormente fueron sometidas a isquemia simulada durante 3 h. (B) Cuantificación de la viabilidad celular de los cultivos a tiempo final (3 h). Representación de los promedios de 4 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

### VI.2.3. Dependencia del preconditionamiento hipóxico de la estabilización de HIF-2 $\alpha$ en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal.

Para el estudio de la contribución diferencial de los factores de transcripción HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  al preconditionamiento hipóxico se empleó la tecnología de silenciamiento génico con siRNA para cada uno de estos factores. Como ya se demostró en la primera parte de “Resultados” los si-RNAs empleados fueron eficientes y específicos tanto a nivel de RNA como a nivel de proteína (Figuras 32 y 33). El proceder experimental se refleja en la figura 41A. Los siRNAs empleados en esta serie de experimentos fueron específicos para HIF-1 $\alpha$  (gris oscuro), HIF-2 $\alpha$  (gris claro) y *scramble* (blanco), que se eligió como control negativo. Las concentraciones de todos ellos fue de 25 nM y fueron aplicados durante 48 h en total. Para cada tratamiento se ensayaron células incubadas en normoxia y en hipoxia. La duración del estímulo hipóxico en éstas últimas fue de 24 h, y se aplicó tras 24 h de tratamiento en normoxia. Como se puede observar en la figura 41B, en presencia del siRNA *scramble* la viabilidad del cultivo tras la isquemia es

significativamente superior en hipoxia que en normoxia, con un porcentaje de células vivas a tiempo final del 35 % y 12 %, respectivamente. Cuando se administró siRNA específico para HIF-1 $\alpha$  se observó que si bien en normoxia la supervivencia de las células tras la isquemia era ligeramente superior a la registrada con *scramble* (20 % de células vivas), en hipoxia seguía existiendo un aumento en la viabilidad con respecto a su normoxia (30 % respecto a 20 %). Sin embargo, en presencia de siRNA específico para HIF-2 $\alpha$  la hipoxia no generó aumento en la viabilidad celular del cultivo tras la isquemia; la supervivencia celular fue de aproximadamente un 12 % tanto en normoxia como en hipoxia. Estos datos nos permiten concluir de manera clara que el responsable del preconditionamiento hipóxico en nuestro modelo celular no es HIF-1 $\alpha$ , sino HIF-2 $\alpha$ .



**Figura 41: Dependencia del preconditionamiento hipóxico de la estabilización de HIF-2 $\alpha$ .**

(A) Protocolo seguido en esta serie de experimentos. Las células fueron incubadas durante 48 h en presencia de siRNA *scramble* (blanco), siRNA para HIF-1 $\alpha$  o para HIF-2 $\alpha$ . Las células que se expusieron a hipoxia estuvieron 24 h bajo este estímulo tras 24 h en normoxia en presencia de cada tratamiento. Posteriormente fueron sometidas a isquemia simulada durante 3 h. (B) Cuantificación de la viabilidad celular de los cultivos a tiempo final (3 h). Representación de los promedios de 6 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

### **VI.3. Contribución de la represión por la hipoxia de la subunidad $\beta_1$ del canal *maxi-K* al preconditionamiento hipóxico.**

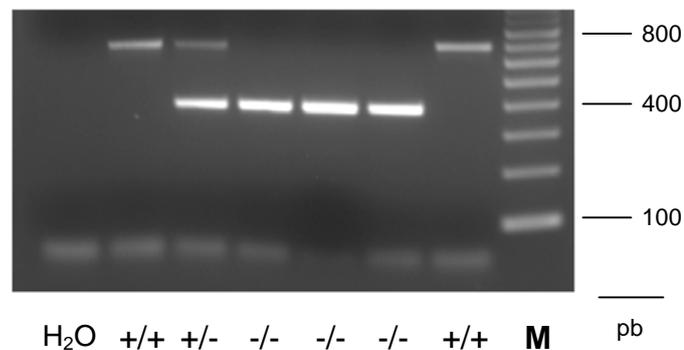
Los datos mostrados en apartados anteriores indican que el preconditionamiento hipóxico en nuestro modelo celular depende de HIF-2 $\alpha$  (Figura 41). Puesto que, además, este factor participa en el mecanismo de represión de la subunidad  $\beta_1$  por la

## Resultados

hipoxia (Figura 34A), nos planteamos la hipótesis de que la represión de este gen pudiera contribuir al acondicionamiento hipóxico en nuestra preparación. Con objeto de responder a esta pregunta se realizaron experimentos de dos tipos. Por un lado se estudió el acondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos dispersos procedentes de ratón neonatal knock-out para la subunidad  $\beta_1$ . Por otro lado, y de manera complementaria, se llevaron a cabo experimentos en los que se analizó el efecto del tratamiento con siRNA para el gen de la subunidad  $\beta_1$  en normoxia sobre el acondicionamiento hipóxico.

### VI.3.1. El acondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos dispersos de ratón neonatal knock-out para la subunidad $\beta_1$ .

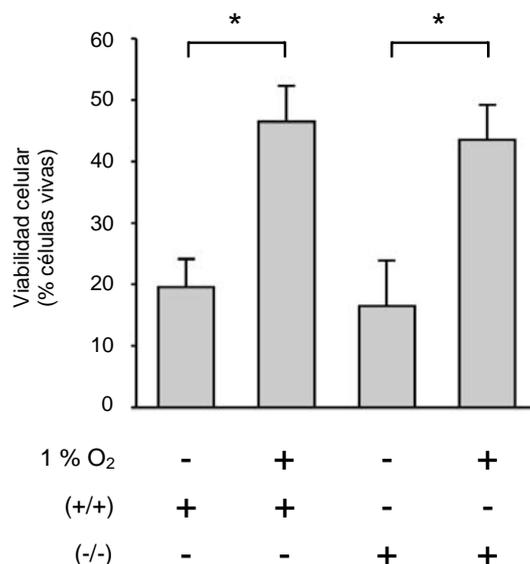
Para este tipo de experimentos se realizaron dispersiones de cardiomiocitos de ratón neonatal knock-out [KO; (-/-)] embrionario para la subunidad  $\beta_1$ . Estos ratones fueron cedidos amablemente por el laboratorio del Dr. O. Pongs (Pluger et al., 2000). Como animales control se escogieron ratones homocigotos (+/+) de la misma cepa. El genotipado de estos se realizó mediante PCR convencional (ver "Materiales y Métodos"). En la figura 42 se muestra el resultado del genotipado de algunos de los ratones analizados.



**Figura 42: Genotipado de los ratones knock-out para la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K.** Análisis realizado por PCR convencional. Los fragmentos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 2 %. El fragmento silvestre obtenido fue de 719 pb. En cambio, la ausencia del gen de la subunidad  $\beta_1$  generó un fragmento de 372 pb. Ambos fragmentos fueron detectados en las muestras de los animales heterocigotos. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular (M).

Para el estudio del acondicionamiento hipóxico se realizaron dispersiones simultáneas de cardiomiocitos procedentes de ratones, de hasta 4 días de edad, de ambos genotipos. Los estudios funcionales se realizaron tres días después de la

siembra de las células, y consistieron en la incubación de los cardiomiocitos en normoxia y en hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>) durante 24 h. Posteriormente se realizó el protocolo de isquemia simulada, y tras 3,5 h se analizó la viabilidad del cultivo (Figura 43).



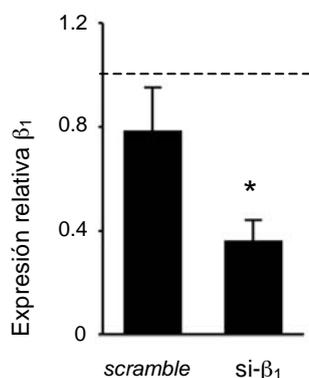
**Figura 43: Precondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos procedentes de ratón knock-out para la subunidad  $\beta_1$ .**

Se realizaron de manera simultánea y en paralelo dispersiones procedentes de ratones (+/+) y (-/-). Las células fueron incubadas en normoxia o en hipoxia durante 24 h. Posteriormente fueron sometidas a isquemia simulada durante 3,5 h. La cuantificación de la viabilidad celular de los cultivos se realizó a tiempo final (3,5 h). Representación de los promedios de 5 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

Cuando en los experimentos explicados con anterioridad se comparó la viabilidad a tiempo final no se observaron diferencias significativas entre las células provenientes de ratones (+/+) y (-/-) tanto para las condiciones de normoxia como para las de hipoxia. Esto puede ser debido a dos posibles causas. Por un lado, a que la subunidad  $\beta_1$  no contribuya al preconditionamiento hipóxico, y por otro a que la ausencia del gen de la subunidad  $\beta_1$  desde el periodo embrionario sea compensado de alguna manera, como ocurre en el caso de otros genes, en el animal knock-out.

### VI.3.2. Efecto del siRNA específico para la subunidad $\beta_1$ sobre el preconditionamiento hipóxico en cardiomiocitos dispersos de rata neonatal.

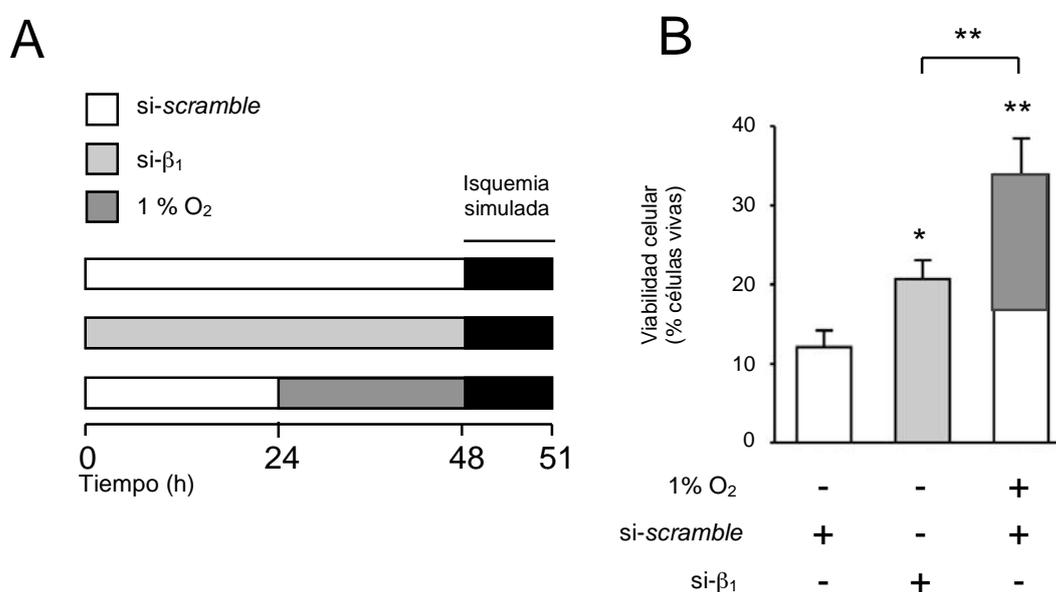
Para complementar los datos obtenidos en los experimentos con los animales knock-out para la subunidad  $\beta_1$  se analizó el preconditionamiento hipóxico en células en las que se reprimió la expresión de la subunidad  $\beta_1$  mediante el uso de siRNA. En primer lugar se comprobó mediante RT-qPCR que el tratamiento con siRNA específico para la subunidad  $\beta_1$  era efectivo. Tras 48 h de incubación con el siRNA en normoxia los niveles de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  fueron analizados y comparados con los niveles del mismo en presencia de siRNA *scramble*. La concentración de ambos siRNAs fue de 50 nM en esta serie de experimentos. En la figura 44 se muestra el resultado de este análisis, que indica que mientras que la aplicación de *scramble* no modifica de manera significativa la cantidad relativa de mensajero de la subunidad  $\beta_1$  respecto a la cantidad en normoxia, el tratamiento con siRNA específico para la subunidad  $\beta_1$  reduce la transcripción de este gen. Los niveles de transcrito de la subunidad  $\beta_1$  respecto a normoxia en esta condición experimental (40 % aproximadamente) son significativamente diferentes a los niveles del mismo en presencia de *scramble*.



**Figura 44: Análisis por RT-qPCR de la especificidad del tratamiento de siRNA para la subunidad  $\beta_1$ .** Las células fueron incubadas en normoxia en presencia de siRNA *scramble* 50 nM o siRNA para la subunidad  $\beta_1$  50 nM durante 48 h. La normalización se realizó frente al ribosómico 18S. Se representan los promedios  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de 4 experimentos. La línea discontinua indica el nivel de expresión de la subunidad  $\beta_1$  en normoxia.

Tras comprobar que el tratamiento con siRNA específico para la subunidad  $\beta_1$  producía el silenciamiento génico esperado, se procedió a realizar los ensayos funcionales esquematizados en la figura 45A. Tras 3 h de isquemia se analizó la viabilidad del cultivo incubado en normoxia en presencia del siRNA para la subunidad  $\beta_1$ , y se comparó con la viabilidad de las células incubadas en presencia de siRNA *scramble*, tanto en normoxia como en hipoxia. En la figura 45B se muestran los

resultados obtenidos en esta serie de experimentos funcionales. Así, en presencia de siRNA específico para la subunidad  $\beta_1$  (gris claro) y tras el insulto isquémico la viabilidad celular fue de aproximadamente un 20 % de células vivas, un valor que se mantuvo entre los registrados para las condiciones de normoxia (12 %, blanco) e hipoxia en presencia de *scramble* (35 %, gris oscuro). Las diferencias observadas entre todas las condiciones experimentales fueron significativas, lo cual nos permitió concluir que un descenso en los niveles de mRNA de la subunidad  $\beta_1$  en normoxia tenía un efecto positivo sobre la supervivencia de los cultivos sometidos a isquemia simulada. Por lo tanto, la represión de la subunidad  $\beta_1$  contribuye al preconditionamiento hipóxico en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal.



**Figura 45: Contribución de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K al preconditionamiento hipóxico.**

(A) Protocolo seguido en esta serie de experimentos. Las células fueron incubadas durante 48 h en normoxia en presencia de RNA *scramble* (blanco) o siRNA para la subunidad  $\beta_1$  (gris claro), a una concentración de 50 nM. Las células que se expusieron a hipoxia estuvieron 24 h bajo este estímulo tras 24 h en normoxia en presencia de RNA *scramble*. Posteriormente fueron sometidas a isquemia simulada durante 3 h. (B) Cuantificación de la viabilidad celular de los cultivos a tiempo final (3 h). Representación de los promedios de 6 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

## VII. ESTUDIO DE LAS POSIBLES INTERACCIONES DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ DEL CANAL MAXI-K CON OTRAS PROTEÍNAS EN MÚSCULO CARDÍACO.

En cardiomiocitos, el nivel de expresión del mRNA de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K es elevado, mientras que apenas se detecta la subunidad  $\alpha$ . Además, existen datos en la literatura indicando que la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K puede interactuar con otras proteínas, como el canal de cloruro activado por calcio (Greenwood et al., 2002) y la subunidad I de la citocromo c oxidasa (Ohya et al., 2005). Nuestro objetivo inicial era estudiar las posibles interacciones de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K con otras proteínas, además de la supuesta interacción con la subunidad  $\alpha$  del mismo canal, en cardiomiocitos de rata neonatal. Para aplicar el sistema "DUAL membrane" a nuestros objetivos, y como se comentó anteriormente, se utilizó como "cebo" la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K. El cDNA de la subunidad  $\beta_1$  se amplificó mediante PCR convencional. Una vez secuenciado, el cDNA se subclonó en el vector apropiado para generar una proteína de fusión con Cub y el factor de transcripción. A su vez se construyó una genoteca a partir de RNA total de cardiomiocitos de rata neonatal con el fin de generar proteínas de fusión con Nub. Posteriormente se procedió a estudiar las posibles interacciones entre la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K con las proteínas codificadas en los distintos clones de la genoteca.

De los más de 5 millones de clones ensayados con el sistema "DUAL membrane", 192 dieron señal positiva para la interacción con la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K. De ellos, se seleccionaron los 6 que mostraron la señal más intensa. Estas 6 interacciones fueron reconfirmadas en un nuevo ensayo. Posteriormente, se procedió a la secuenciación de dichos clones. Una vez obtenidas las secuencias parciales de los clones, éstas se compararon con las secuencias de las bases de datos de DNA. El resultado obtenido se resume en:

- 2 clones, que eran idénticos entre sí, correspondían a la subunidad 1 del complejo "peptidasa señal".

- otro clon correspondía al procolageno  $\alpha$  I.

- otro clon correspondía a la polimerasa  $\alpha$  de poli-A.

- un clon correspondía a la subunidad 1 de la NADH-deshidrogenasa mitocondrial (ND1).

- uno de los clones no mostró similaridad con ninguna secuencia en las bases de DNA según los resultados aportados por DUAL systems. No obstante, en un posterior análisis detallado de la secuencia en nuestro laboratorio observamos que se trata de la subunidad 6 de la ATP-sintasa F0 mitocondrial.

Por tanto, los resultados obtenidos con el sistema "DUAL membrane" indican que la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K es capaz de interactuar con varias proteínas. Entre ellas se encuentran al menos dos proteínas mitocondriales (subunidad 1 de la NADH-deshidrogenasa mitocondrial (ND1) y subunidad 6 de la ATP-sintasa F<sub>0</sub>), ambas implicadas en la fosforilación oxidativa y pertenecientes a los complejos I y V de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna de la mitocondria. Estos resultados sugieren que la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K podría desempeñar funciones distintas a las de modificar la actividad de la subunidad  $\alpha$  del canal maxi-K.



# DISCUSIÓN



Los canales de potasio dependientes de calcio y voltaje (maxi-K) participan en las respuestas agudas a la hipoxia en las células neurosecretoras (Pardal et al., 2000), la musculatura vascular (Gebremedhin et al., 1994) y determinadas neuronas sensibles al oxígeno (Haddad y Jiang, 1993). Datos generados en nuestro laboratorio han mostrado que algunas de las subunidades reguladoras de este canal se regulan en respuesta a la hipoxia crónica en diversos tejidos. En células cromafines de rata la hipoxia disminuye el nivel de expresión de la subunidad  $\beta_2$  (datos no publicados). Del mismo modo, en células de músculo liso de aorta torácica y arteria basilar de rata los niveles de la subunidad  $\beta_1$  también descienden en respuesta a la hipoxia crónica (Navarro-Antolin et al., 2005). Por lo tanto, el canal maxi-K es un elemento clave en los mecanismos de adaptación de las células a la disminución en la presión parcial de oxígeno. Aunque los datos disponibles en la actualidad sugieren que el canal maxi-K está presente en el tejido cardíaco, existen todavía dudas sobre la función fisiológica de este canal en el corazón (Jiang et al., 1999). Dado que la subunidad reguladora que más se expresa en el corazón es la subunidad  $\beta_1$ , nos planteamos que, al igual que sucede en el músculo liso vascular, el mRNA de esta subunidad podría regularse por la hipoxia crónica en preparaciones de cardiomiocitos dispersos. A su vez, pensamos que el estudio del mecanismo molecular subyacente a la regulación de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia podría arrojar luz sobre el papel fisiopatológico del canal maxi-K en el músculo cardíaco.

## **I. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL CANAL MAXI-K EN EL MÚSCULO CARDÍACO.**

En la fase inicial de este trabajo se analizó la composición molecular del canal maxi-K en preparaciones de cardiomiocitos de rata neonatal dispersos, comprobándose que, en efecto, la subunidad reguladora que más se expresa en esta preparación es la subunidad  $\beta_1$ . Por el contrario, la subunidad  $\alpha$  o formadora del poro apenas se detecta en el tejido cardíaco, siendo su nivel de expresión muy bajo en relación al existente en el músculo liso. En la actualidad existe controversia sobre la composición molecular del canal maxi-K en el corazón y su posible función en este tejido (Jiang et al., 1999). Las evidencias existentes sobre la presencia del canal maxi-K en cardiomiocitos proceden de experimentos funcionales en los que se han detectado corrientes de potasio debidas a canales maxi-K en la membrana interna mitocondrial (Cao et al., 2005; Ohya et al., 2005; Sato et al., 2005; Wang et al., 2008; Xu et al., 2002). La falta de un anticuerpo suficientemente específico para detectar estas proteínas en el corazón, junto con la dificultad metodológica para la obtención de fracciones mitocondriales de alta pureza

dificulta el estudio del canal maxi-K en este tejido. Además algunos autores han sugerido que la subunidad  $\beta_1$  puede interactuar con otras proteínas, como el canal de cloruro activado por calcio (Greenwood et al., 2002) y la subunidad I de la citocromo c oxidasa (Ohya et al., 2005). Por lo tanto queda por determinar la naturaleza molecular de las proteínas con las que interacciona la subunidad  $\beta_1$  en el corazón, lo que a su vez permitirá averiguar la función fisiológica del canal maxi-K en este tejido, así como su importancia fisiopatológica.

## **II. REGULACIÓN POR LA HIPOXIA DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ DEL CANAL MAXI-K EN EL MÚSCULO CARDÍACO.**

Nuestros resultados muestran que, al igual que sucede en miocitos vasculares de arterias cerebral y aorta de rata y mamaria humana (Navarro-Antolin et al., 2005), la hipoxia crónica reprime la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K en cardiomiocitos neonatales, tanto en rata como en ratón. Hemos observado una disminución en los niveles de mRNA de la subunidad  $\beta_1$  en la condición de hipoxia. El posible cambio en los niveles de proteína de la subunidad  $\beta_1$  no se ha podido analizar debido a que el uso de los anticuerpos disponibles contra esta proteína para las aplicaciones de *Western blot* e inmunocitoquímica no generaron datos fiables (datos no mostrados). No obstante, los estudios funcionales realizados sobre las preparaciones de miocitos vasculares demuestran que la regulación a la baja del mRNA de la subunidad  $\beta_1$  también se refleja en una disminución de los niveles de proteína (Navarro-Antolin et al., 2005). Por esta razón, es plausible asumir que en cardiomiocitos expuestos a hipoxia los niveles de proteína de la subunidad  $\beta_1$  disminuyen en paralelo con los niveles de mRNA.

El efecto represor de la hipoxia sobre la subunidad  $\beta_1$  se observa en diversos tejidos (músculo liso y cardíaco) y en diferentes especies (rata, ratón y humanos). Además, en el caso del músculo cardíaco esta regulación se produce tanto en animales neonatos como en la etapa adulta. Por otro lado, la represión por la hipoxia del mRNA de la subunidad  $\beta_1$  en cardiomiocitos, al igual que en los miocitos vasculares, depende del tiempo de exposición al estímulo hipóxico. El efecto es mayor cuanto más tiempo permanece la preparación en hipoxia, y el descenso de los niveles de transcrito es lento y la reversión no aparece hasta las 72 h. Además, este efecto depende del nivel de hipoxia aplicada a la preparación, siendo más pronunciado cuanto menos oxígeno disponible hay, tal y como se observa en las preparaciones de miocitos vasculares. La dependencia tanto del tiempo como del nivel de hipoxia es similar a la que se observa

para otros genes cuya expresión se regula por la tensión de O<sub>2</sub> (Del Toro et al., 2003; Semenza, 1999b; Wenger, 2002).

Todos estos datos sugieren que la regulación a la baja por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  es un proceso general que probablemente se produce mediante un mecanismo molecular común en diferentes tejidos.

### **III. EFECTO DE LA HIPOXIA CRÓNICA SOBRE LA REGULACIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ EN EL ANIMAL COMPLETO.**

El efecto represor de la hipoxia sobre la subunidad  $\beta_1$  se observa en preparaciones de cardiomiocitos dispersos, indicando que la capacidad de responder a este estímulo reside en el propio tejido cardíaco. Sin embargo, la hipoxia aplicada sobre el animal completo (atmósfera del 10 % de O<sub>2</sub>) no produjo modificación en los niveles de expresión de la subunidad  $\beta_1$ , a ninguno de los tiempos analizados. Hay que destacar que en nuestras condiciones experimentales tampoco se modificó la expresión de genes como el del VEGF o la HO-1, que se sabe se inducen por hipoxia. Sólo se observó un ligero incremento en el mRNA de la HO-1 tras 48 h de tratamiento. Puesto que la exposición de porcentajes de O<sub>2</sub> menores al 10 % sobre animales completos no es realizable por motivos éticos, no se puede descartar que la subunidad  $\beta_1$  (además de otros genes) se regule en el animal completo en situaciones de hipoxia más severa, más próximas a la isquemia, en las que el aporte de oxígeno al corazón queda prácticamente interrumpido. En este sentido en un futuro queda por analizar la regulación de la subunidad  $\beta_1$  en modelos *in vivo* de isquemia y reperfusión sobre animales mediante oclusión o ligación transitoria de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda.

### **IV. MECANISMO MOLECULAR SUBYACENTE A LA REPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ POR LA HIPOXIA.**

Los experimentos realizados en presencia de inhibidores de la transcripción (actinomicina D y DRB) revelaron que la disminución en los niveles de mRNA de la subunidad  $\beta_1$  observada durante la hipoxia se debe a una disminución en la tasa de transcripción del gen, y no a una disminución de la estabilidad del transcrito inducida en esta condición experimental. Además, el inhibidor de la traducción cichoeximida produjo una reversión de la represión de la subunidad  $\beta_1$ , dato que indica que la síntesis *de novo* de proteínas es necesaria para que se produzca dicha represión.

Tanto el CoCl<sub>2</sub> como el DMOG inhiben la actividad de las proлил hidroxilasas e

## Discusión

inducen la estabilización de las proteínas HIF- $\alpha$ , por lo que se usan para mimetizar la situación de hipoxia (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Lopez-Barneo et al., 2001; Semenza, 1999a; Wenger, 2002). En cardiomiocitos neonatales la aplicación de DMOG produjo la estabilización tanto de HIF-1 $\alpha$  como de HIF-2 $\alpha$ . Además, la aplicación de CoCl<sub>2</sub> o DMOG en normoxia produjo una disminución en los niveles del mRNA de la subunidad  $\beta_1$  similar a la observada en hipoxia. Estos resultados sugieren que los factores de transcripción HIF- $\alpha$  están implicados en la regulación de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia.

La participación del sistema HIF/prolil hidroxilasas en la regulación del gen de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia está de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos en los que se incubaron las células en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la condición de normoxia. En estas condiciones también se produjo la represión de la subunidad  $\beta_1$ , lo cual sugiere que las ROS participan en el mecanismo molecular subyacente a la represión por la hipoxia de este mensajero. Se ha propuesto que uno de los mecanismos por los que las ROS median sus efectos es la inhibición de la actividad de las prolil hidroxilasas (al oxidar el Fe<sup>2+</sup> que actúa como cofactor enzimático), lo que conlleva la estabilización de las proteínas HIF- $\alpha$ , y la regulación transcripcional mediada por estos factores en respuesta a la hipoxia crónica (Brunelle et al., 2005; Guzy et al., 2005; Kaelin, 2005; Mansfield et al., 2005).

La entrada de calcio al citoplasma media la regulación a la baja de la subunidad  $\beta_2$  del canal maxiK en células PC12 (datos sin publicar de nuestro laboratorio). Para comprobar si el calcio participa en la represión por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  en los cardiomiocitos, se realizaron distintas maniobras experimentales. La concentración de calcio en el citoplasma celular aumenta en respuesta a la despolarización de la membrana celular tras la aplicación de una solución con alto potasio y disminuye cuando el calcio es eliminado del medio extracelular (Beekman et al., 1990). En nuestra preparación la despolarización de la membrana citoplasmática con alto potasio en normoxia no produjo represión de la subunidad  $\beta_1$ . Complementando a este resultado se observó que la eliminación del calcio extracelular no sólo no indujo la reversión de la regulación de la subunidad  $\beta_1$  en hipoxia, sino que además producía regulación a la baja del mRNA de la subunidad  $\beta_1$  tanto en normoxia como en hipoxia. Estos resultados están en consonancia con datos recientes que demuestran que la eliminación del calcio intracelular induce la estabilización de HIF (Berchner-Pfannschmidt et al., 2004; Liu et al., 2004). Los resultados obtenidos revelan, por lo tanto, que la entrada de calcio al citoplasma no participa en la regulación transcripcional de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia,

a diferencia de lo que se observa en células PC12 para la subunidad  $\beta_2$  (material de nuestro grupo sin publicar)

Para analizar de forma más directa la participación de HIF en la regulación de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia se realizaron experimentos en los que se inhibió de manera específica la acumulación de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  en hipoxia mediante el empleo de siRNAs. En ellos se observó que HIF-2 $\alpha$ , y no HIF-1 $\alpha$ , participa en la represión por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$ , pues sólo cuando se inhibió específicamente la estabilización de HIF-2 $\alpha$  se produjo una reversión de esta represión. Mientras que HIF-1 $\alpha$  se expresa en numerosos órganos y a lo largo de toda la escala filogenética, HIF-2 $\alpha$  sólo está presente en vertebrados, particularmente en mamíferos, con un patrón de distribución más reducido. Esto sugiere que HIF-2 $\alpha$  tiene un papel más especializado en la homeostasis del oxígeno (Jiang et al., 2001). Diversos estudios sobre células madre embrionarias (*Embryonic Stem*, ES) que carecen de los factores HIF han revelado que HIF-2 $\alpha$  no cumple un papel crítico en las respuestas generales frente a la hipoxia (Brusselmans et al., 2001; Carmeliet et al., 1998; Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). No obstante los ratones knock-out para HIF-2 $\alpha$  (-/-) presentan letalidad durante el desarrollo embrionario como consecuencia de una maduración deficiente de los pulmones y los vasos sanguíneos (Compernelle et al., 2002; Peng et al., 2000), fallo cardíaco y una homeostasis alterada de las catecolaminas (Tian et al., 1998). Además, HIF-2 $\alpha$  regula la expresión de la tirosina hidroxilasa en el órgano de ZuckerKandl (Peng et al., 2000; Tian et al., 1998) y de VEGF en pneumocitos (Compernelle et al., 2002) en el periodo embrionario. Estos datos indican que las proteínas HIF- $\alpha$  cumplen funciones no redundantes durante el desarrollo (Hu et al., 2003; Wiesener et al., 1998). Recientemente se ha demostrado que tras la inactivación génica de HIF-2 $\alpha$  de manera aguda en ratones adultos, estos animales desarrollan anemia, lo cual apoya las evidencias previas de que este factor regula la expresión del gen de la eritropoyetina en la edad adulta (Gruber et al., 2007). Además, diversos trabajos han sugerido que algunos genes cuya expresión está regulada por HIF-2 $\alpha$  son críticos para la función mitocondrial y los mecanismos celulares de defensa frente al estrés oxidativo en la edad adulta (Oktay et al., 2007; Scortegagna et al., 2003a). Parece, por tanto, que HIF-2 $\alpha$  tiene funciones específicas en el adulto regulando a genes específicos, entre los que se encuentra la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K.

Un aspecto interesante de la regulación de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia es que representa uno de los pocos ejemplos conocidos de represión mediada por el sistema HIF. Aunque durante la hipoxia crónica se induce la transcripción de una gran cantidad de genes, se ha comprobado que también se produce represión

transcripcional (Manalo et al., 2005). Sin embargo, existen pocos ejemplos bien caracterizados de genes cuya expresión se reprima específicamente por HIF-1 $\alpha$ . Entre estos genes se encuentran el receptor el receptor  $\alpha$  de la proliferación del peroxisoma (PPAR $\alpha$ ) (Narravula y Colgan, 2001), el transportador 1 equilibrativo de nucleósido (ENT-1) (Eltzschig et al., 2005) y la kinasa de adenosina (Morote-Garcia et al., 2008), cuya represión en hipoxia se produce por la unión directa de HIF-1 $\alpha$  a sus promotores. El análisis de la secuencia del promotor de la subunidad  $\beta_1$  ha mostrado la existencia de posibles sitios de unión de los factores de transcripción HIF (secuencias HRE; datos no mostrados), por lo que sería plausible asumir que en hipoxia HIF-2 $\alpha$  media la represión de la subunidad  $\beta_1$  mediante su unión directa al promotor de la subunidad  $\beta_1$ . Sin embargo la existencia de estas secuencias consenso no demuestra de manera directa que estos factores sean responsables de la regulación transcripcional de la subunidad  $\beta_1$  (Morote-Garcia et al., 2008). Dado que la represión del mRNA de la subunidad  $\beta_1$  se ejerce a nivel transcripcional y depende de la síntesis *de novo* de proteínas, una posibilidad que no puede descartarse es que la estabilización de HIF-2 $\alpha$  induce la expresión de otro(s) factor(es) de transcripción con función(es) represora(s) que actúa(n) sobre el promotor de la subunidad  $\beta_1$  para inhibir su transcripción. Tampoco se puede excluir la posibilidad de que otros factores de transcripción contribuyan junto a HIF-2 $\alpha$  a mediar del efecto represor de la hipoxia sobre la subunidad  $\beta_1$ . En cualquier caso nuestros resultados sugieren que la subunidad  $\beta_1$  pertenece a la cohorte de genes regulados por HIF-2 $\alpha$  y que su represión forma parte de la reprogramación génica mediada por este factor en hipoxia en cardiomiocitos neonatales.

## **V. REGULACIÓN POR LA GLUCOSA DE LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ DEL CANAL MAXI-K EN EL MÚSCULO CARDÍACO.**

Los cambios en los niveles de glucosa en el medio regulan la transcripción de diversos genes en varios tejidos y tipos celulares, como el hígado y las células  $\beta$  del páncreas (Meugnier et al., 2007). Además, se ha demostrado que en hígado las secuencias de unión HRE en los promotores de los genes diana pueden operar como "*glucose response elements*" (GlucRE) y viceversa (Kietzmann et al., 2002). Los efectos transcripcionales mediados por la hipoxia y la hipoglucemia pueden tener gran importancia fisiopatológica en numerosos órganos. Durante la isquemia miocárdica tiene lugar una interrupción del aporte tanto de glucosa como de oxígeno al corazón. En nuestra preparación, la subunidad  $\beta_1$  se regula por la hipoxia, por la ausencia de glucosa y, cuando ambos estímulos se aplican de forma simultánea, su efecto es aditivo. Este

resultado sugiere que estos estímulos pueden tener un papel fisiológico o fisiopatológico importante en la represión de la subunidad  $\beta_1$ , también en el músculo cardíaco.

## **VI. EFECTO DE LA HIPOXIA CRÓNICA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DEL MÚSCULO CARDÍACO DURANTE LA ISQUEMIA. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO.**

La hipoxia aplicada en varios períodos sucesivos de corta duración, al igual que ocurre con la isquemia, protege al corazón frente a un período de isquemia posterior (Lasley et al., 1993; Shizukuda et al., 1992). Este fenómeno, denominado preconditionamiento hipóxico, se ha observado tanto en animales completos, como en corazones aislados y células dispersas. La cardioprotección que producen estos fenómenos sobre células aisladas se puede analizar como el aumento de la supervivencia celular tras la simulación de un insulto isquémico posterior (Diaz y Wilson, 2006). Estos experimentos funcionales se llevaron a cabo sobre nuestra preparación y revelaron por primera vez que la hipoxia crónica y severa induce un aumento en la viabilidad del cultivo en el transcurso de la isquemia, tanto en células procedentes de rata como de ratón. Por lo tanto nos encontramos ante un modelo celular que nos permite estudiar de una manera fácil y rápida los efectos cardioprotectores de la hipoxia crónica sobre la viabilidad celular del tejido cardíaco tras la isquemia.

En la actualidad no se conocen con detalle los mecanismos moleculares responsables del preconditionamiento isquémico e hipóxico. Aunque se ha propuesto la participación de los factores de transcripción HIF en estos procesos ningún estudio ha demostrado claramente que la inducción de estos factores de transcripción constituya la base molecular de la cardioprotección inducida por ambos tipos de preconditionamiento (Loor y Schumacker, 2008). La aplicación de DMOG en normoxia indujo en nuestra preparación un aumento en la viabilidad del cultivo tras la isquemia similar al observado en hipoxia, lo cual demuestra inequívocamente la participación de HIF en el modelo de preconditionamiento hipóxico desarrollado a lo largo de este trabajo. Por otro lado, el hecho de que el preconditionamiento hipóxico en nuestro modelo celular sea un proceso dependiente del tiempo de exposición a la hipoxia previa al estímulo isquémico apoya la hipótesis de que la base molecular de este fenómeno sea una reprogramación génica inducida por HIF.

El silenciamiento transcripcional del factor de transcripción HIF-2 $\alpha$  mediante siRNA abolió completamente el aumento de la viabilidad celular inducida por la hipoxia, mientras que la supresión de HIF-1 $\alpha$  no modificó la viabilidad del cultivo en comparación

a la situación control. Por lo tanto, en contra de lo esperado, HIF-1 $\alpha$  no participa en este proceso, aunque existen evidencias de que este factor participa en otras formas de preconditionamiento hipóxico e isquémico mediante la inducción de algunos de sus genes diana. Entre éstos genes se encuentran enzimas glicolíticas y factores angiogénicos (Bernhardt et al., 2007; Cai et al., 2008; Jurgensen et al., 2004). Nuestros datos revelan, por primera vez, que HIF-2 $\alpha$  no sólo participa, sino que además es imprescindible para que se produzca el preconditionamiento hipóxico, al menos en el que se induce tras una hipoxia sostenida. Hasta la fecha, se había sugerido que HIF-2 $\alpha$  contribuye a las respuestas protectoras de adaptación a la isquemia en el riñón (Kojima et al., 2007) y en neuronas (Ralph et al., 2004). Además, se ha observado que HIF-2 $\alpha$  regula la expresión de genes antioxidantes en el hígado, como la superóxido dismutasa 2 (SOD-2) y la frataxina (Oktay et al., 2007; Scortegagna et al., 2003a), aunque se desconoce si esta regulación sucede también en el tejido cardíaco. Después de un infarto de miocardio existe una inducción de las proteínas HIF- $\alpha$  en el tejido que rodea al área infartada, donde se ha comprobado que HIF-2 $\alpha$  se expresa en las zonas más alejadas al infarto (Jurgensen et al., 2004; Shohet y Garcia, 2007). Por lo tanto, parece que HIF-2 $\alpha$  tiene funciones aún por investigar, y su estabilización probablemente represente una de las respuestas de la célula frente a procesos de isquemia y perfusión, tanto en cardiomiocitos como en otros tipos celulares.

## **VII. CONTRIBUCIÓN DE LA REPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ POR LA HIPOXIA AL PRECONDICIONAMIENTO HIPÓXICO.**

Nuestros resultados demuestran que HIF-2 $\alpha$  en hipoxia media, por un lado, el aumento de la viabilidad de los cardiomiocitos en cultivo tras la isquemia, y por otro, participa en la represión por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  en esta preparación. Estos datos nos llevaron a postular la posible participación de la regulación de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia en el preconditionamiento hipóxico en nuestro modelo celular. Para estudiar esta posible contribución se analizó la viabilidad del cultivo tras la isquemia en células tratadas en normoxia con siRNA específico para la subunidad  $\beta_1$ . Se observó que el cultivo en estas condiciones presentaba una supervivencia celular frente a la isquemia superior a la observada para las células en normoxia e inferior a las de las células en hipoxia. Este resultado indicó que la represión a la baja de la subunidad  $\beta_1$  contribuye a aumentar la resistencia del cultivo frente a la isquemia y que esta regulación durante la hipoxia tiene un papel cardioprotector. Por lo tanto, la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K es uno de los genes regulados por HIF-2 $\alpha$  que participan en el proceso

de cardioprotección. La represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia es una componente del efecto global de la hipoxia sobre la supervivencia celular. De hecho, durante la hipoxia se produce una modificación del patrón de expresión de numerosos genes, entre los que se encuentra la subunidad  $\beta_1$ . Por lo tanto es esperable que las células preincubadas en hipoxia muestren una mayor viabilidad tras la isquemia que aquellas preincubadas en normoxia en las que se ha silenciado la expresión de la subunidad  $\beta_1$ .

En contraposición a los resultados anteriormente expuestos se observó que en células procedentes de ratones knock-out para la subunidad  $\beta_1$  la viabilidad del cultivo tras la isquemia era similar al observado en células procedentes de ratones silvestres. La delección del gen de la subunidad  $\beta_1$  en estos animales se produce en el periodo embrionario, y en ellos se ha observado el desarrollo de hipertensión arterial e hipertrofia cardíaca durante la edad adulta (Brenner et al., 2000; Pluger et al., 2000). Existen evidencias de que la reducción funcional de la subunidad  $\beta_1$  en el músculo liso se relaciona con el desarrollo de la hipertensión arterial (Amberg y Santana, 2003; Fernandez-Fernandez et al., 2004). Parece claro que la hipertrofia observada en el corazón de estos ratones no se debe a un efecto directo de la ausencia de la subunidad  $\beta_1$  en este órgano, sino que es secundaria a la hipertensión arterial y al posterior remodelado vascular (Brenner et al., 2000; Pluger et al., 2000). El que no haya diferencias en la viabilidad entre los cardiomiocitos procedentes de ratones silvestres y de ratones knock-out para la subunidad  $\beta_1$  sugiere la posible existencia de mecanismos de compensación por parte de otras proteínas relacionadas con la supervivencia celular.

#### **VIII. PAPEL CARDIOPROTECTOR DEL CANAL MAXI-K. IMPORTANCIA FUNCIONAL DE LA REPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD $\beta_1$ POR LA HIPOXIA CRÓNICA.**

Para conocer la función de una molécula es muy importante saber su localización. Una de las cuestiones que aún están por resolver es la de la localización subcelular del canal maxi-K en el corazón. Hasta la fecha no se han detectado corrientes iónicas debidas a la actividad de los canales maxi-K en la membrana plasmática de los cardiomiocitos. Aunque no existen anticuerpos fiables que detecten de forma inequívoca a esta proteína en una preparación de tejido cardíaco, estudios recientes basados en datos farmacológicos han sugerido una localización mitocondrial del canal maxi-K (Ohya et al., 2005; Wang et al., 2008; Xu et al., 2002). En estos trabajos se muestran datos electrofisiológicos y se utilizan varios compuestos que, supuestamente, abren o bloquean de forma selectiva los canales maxi-K localizados en la mitocondria. Estas

evidencias son poco claras debido a varias causas. Por un lado no se puede descartar una posible contaminación de las preparaciones de mitocondrias con otras membranas, por lo que las corrientes debidas a los canales maxi-K que se han detectado podrían provenir de éstas, y no de la membrana mitocondrial interna de las células. Por otro lado, existen varios trabajos en la literatura que ponen en duda la existencia de la subunidad  $\alpha$  del canal maxi-K en la mitocondria de los cardiomiocitos (Halestrap et al., 2007). Además, se sugiere que gran parte de los efectos observados al aplicar los diferentes compuestos que supuestamente afectan a los canales maxi-K, son producidos por mecanismos desconocidos e independientes de la presencia de los canales maxi-K (Cancherini et al., 2007; Debska et al., 2003; Halestrap et al., 2007). Por tanto, la existencia del canal maxi-K en la membrana interna mitocondrial de los cardiomiocitos es una posibilidad atractiva pero que permanece sujeta a debate.

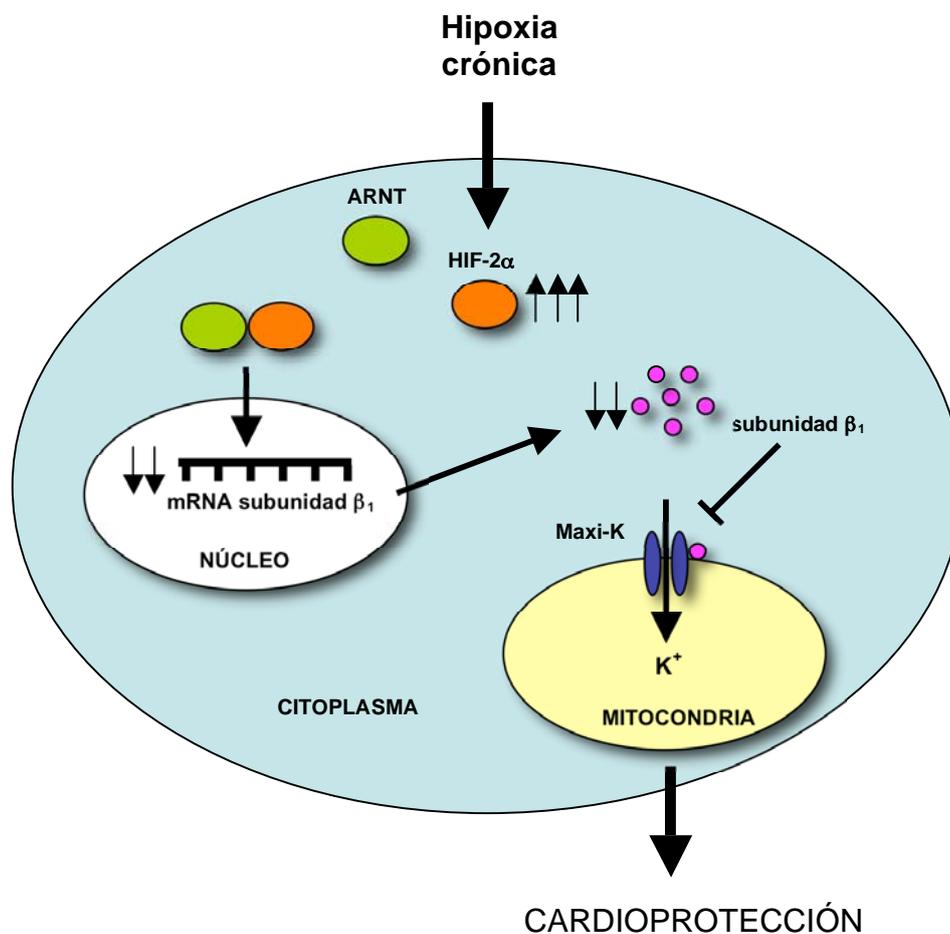
Independientemente de lo expuesto en el párrafo anterior, se ha propuesto que la activación de los canales mitoK<sub>ATP</sub> participan en diversos mecanismos cardioprotectores (Kong et al., 2001; Liu et al., 1998). El flujo de potasio hacia la matriz mitocondrial que sigue a la activación de estos canales induce una leve despolarización de la membrana de la mitocondria que a su vez inhibe la sobrecarga de calcio de la matriz mitocondrial (Stowe et al., 2006; Wang et al., 2001). Este flujo de potasio produce además un ligero aumento de la producción de ROS (Stowe et al., 2006) y del volumen de la mitocondria, lo cual induce un incremento en la eficiencia de la producción de energía (Sato et al., 2005; Stowe et al., 2006). De la misma manera, se ha observado que la apertura del canal mitoK<sub>Ca</sub> también participa en los acondicionamientos isquémico e hipóxico (Sato et al., 2005; Shi et al., 2007; Stowe et al., 2006; Wang et al., 2004; Xu et al., 2002), aunque parece que ambos canales actúan de manera independiente (Sato et al., 2005). Se ha observado que la activación del canal maxi-K mediante la aplicación de su agonista, el NS-1619, induce cardioprotección temprana y tardía en corazones procedentes de ratón, aunque los mecanismos subyacentes a ambos tipos de respuestas parecen ser diferentes (Wang et al., 2004). Además, se ha sugerido que la activación del canal inicia el mecanismo cardioprotector, en el que también participa el poro de transición mitocondrial (mPTP) (Cao et al., 2005). Recientemente, se ha propuesto que la presencia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K es crítica para que se produzca la cardioprotección inducida por el sildenafil, efectos mediados por la apertura tanto de los canales mitoK<sub>ATP</sub> como de los mitoK<sub>Ca</sub> (Wang et al., 2008). En este trabajo los autores muestran que el silenciamiento génico de la subunidad  $\beta_1$  mediante siRNA *in vivo* sobre ratones abole el efecto cardioprotector del sildenafil. Aunque este estudio es el primero en relacionar a la subunidad  $\beta_1$  con la cardioprotección, llama la atención el

que estos autores no aborden el estudio directo del efecto de dicho silenciamiento génico en la cardioprotección.

La mayoría de los trabajos existentes centrados en el estudio del papel cardioprotector del canal maxi-K se basan en la aplicación de periodos cortos de isquemia o hipoxia. Sólo algunos trabajos han estudiado el efecto de la hipoxia sostenida sobre este canal y su implicación en la cardioprotección. En este sentido se ha encontrado que la activación del canal con un agonista, el NS-1619, no induce cardioprotección en corazones de conejos neonatales mantenidos en hipoxia, mientras que sí la produce en corazones provenientes de conejos normóxicos (Shi et al., 2007). Sus autores postulan que durante la hipoxia crónica se produce una inhibición de la actividad del canal maxi-K sin que disminuyan los niveles de expresión de la subunidad  $\alpha$ . Puesto que en músculo liso la represión de la subunidad  $\beta_1$  se acompaña de una disminución de la probabilidad de apertura del canal (Navarro-Antolin et al., 2005) podemos asumir en cardiomiocitos una disminución funcional del maxi-K durante la hipoxia. Por lo tanto la represión de la subunidad  $\beta_1$  en hipoxia podría ser la base molecular de la disminución funcional del canal observada en esta condición experimental.

A lo largo de este trabajo se ha abordado por primera vez el estudio del efecto de la hipoxia crónica y severa sobre la regulación génica del canal maxi-K en el corazón. Los trabajos que han abordado el papel cardioprotector del canal maxi-K en el corazón sostienen que la activación del canal de forma aguda protege a las células del daño por isquemia/reperfusión. Por el contrario, nuestros resultados han indicado que la represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia contribuye a aumentar la resistencia de las células frente a un insulto isquémico. Puesto que una represión de la subunidad  $\beta_1$  supondría una disminución en la activación del canal, ambas observaciones aparentemente pueden parecer contradictorias. Sin embargo, se ha de considerar que un episodio hipóxico de larga duración induce numerosos cambios a diferentes niveles en estas células, entre los que se podría incluir un cambio en el estado de activación del canal maxi-K. La hipoxia crónica induce la despolarización del potencial de membrana mitocondrial y un aumento de la concentración de calcio en la matriz mitocondrial (Honda et al., 2005), favoreciendo la activación de los canales mitoK<sub>Ca</sub>. Dada la gran conductancia este canal, se podría especular que una apertura del mismo continuada en el tiempo, como ocurriría durante la hipoxia crónica, podría producir un hinchamiento excesivo que podría conllevar la rotura de la estructura vesicular de la mitocondria (Garlid y Paucek, 2003). A su vez, se podría producir un aumento de la producción de ROS y el colapso del potencial de membrana mitocondrial, los cuales promoverían la

apertura del poro de transición mitocondrial y la consecuente activación de las vías que conducirían a la muerte celular (necrosis y apoptosis) (Halestrap et al., 2007). Por lo tanto la represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia crónica podría constituir un mecanismo de adaptación para la disminución de la entrada de potasio a la mitocondria, con el consiguiente aumento de la supervivencia en células en las que este orgánulo esté despolarizado y sobrecargado de calcio. En el futuro, son necesarios nuevos estudios para comprobar esta hipótesis y determinar con mayor precisión el papel de la subunidad  $\beta_1$  en el preconditionamiento hipóxico.



**Figura 46: Modelo de cardioprotección inducida por la represión de la subunidad  $\beta_1$ .** Durante la hipoxia crónica se produce la estabilización de HIF-2 $\alpha$  y la regulación transcripcional de sus genes diana, entre los que se encuentra la subunidad  $\beta_1$ . La represión de la subunidad  $\beta_1$  daría lugar a una disminución funcional del canal maxi-K mitocondrial que reduciría el flujo de potasio hacia la matriz mitocondrial. Como resultado se frenaría la despolarización excesiva y continuada en el tiempo de la mitocondria, con el consiguiente efecto cardioprotector.

Independientemente del modelo de protección detallado anteriormente, la existencia de un elevado nivel de expresión de la subunidad  $\beta_1$  en la práctica ausencia de las subunidades  $\alpha$  plantea múltiples interrogantes acerca de cuál es la función de la subunidad  $\beta_1$  en los cardiomiocitos. Como ya se ha comentado anteriormente, una de sus funciones podría ser regular a la subunidad  $\alpha$  del canal maxi-K, y los resultados de este trabajo se han analizado principalmente considerando dicha posibilidad. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestra preparación con el sistema “*DUAL membrane*” y con resultados obtenidos en otros laboratorios (ver apartado I de esta “Discusión”), la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K puede interactuar con otras proteínas, entre ellas algunas mitocondriales, por lo que su función podría ser la regulación de la actividad mitocondrial, probablemente de la fosforilación oxidativa. En este sentido, se ha demostrado que en hipoxia HIF-1 $\alpha$  no sólo induce la expresión de enzimas glucolíticas, sino que también reprime la función mitocondrial y el consumo de oxígeno mediante la inducción de la piruvato deshidrogenasa kinasa 1 (PDK-1) (Papandreou et al., 2006). En este sentido podríamos especular con la posibilidad de que la represión de la subunidad  $\beta_1$  en hipoxia, pueda contribuir a la inhibición de la cadena de transporte electrónico y la consiguiente reducción del consumo de oxígeno observada en hipoxia. Se trataría de un mecanismo complementario al descrito por Papandreou y colaboradores, mediado en este caso por HIF-2 $\alpha$ . Aunque esta hipótesis está aún por estudiar, los resultados hasta ahora expuestos evidencian una estrecha relación entre HIF-2 $\alpha$ , la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K y la función mitocondrial, así como de la existencia de un mecanismo cardioprotector en respuesta a la hipoxia en el que participan estos tres elementos de manera integrada.



# CONCLUSIONES



Las principales conclusiones de la presente investigación ha sido las siguientes:

1. La expresión de la subunidad  $\alpha$  del canal maxi-K es muy escasa o prácticamente nula en cardiomiocitos de rata neonatal. Sin embargo, estas células expresan cantidades importantes de la subunidad  $\beta_1$ , que es la subunidad auxiliar predominante en el miocardio.
2. La hipoxia crónica produce una represión en la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal. Esta regulación se observó también en preparaciones de cardiomiocitos dispersos de ratón neonatal, por lo que posiblemente se trata de un fenómeno general que se mantiene en diferentes especies.
3. La represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia no es un efecto cualitativamente dependiente de la edad del animal, puesto que también se produce en tejido de animal adulto.
4. La regulación de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia en células dispersas depende del tiempo de exposición a este estímulo, así como del nivel de oxígeno en el medio. Este efecto no se observó en tejido cardíaco de animales mantenidos en hipoxia crónica.
5. En células dispersas la regulación de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia se ejerce a nivel transcripcional, requiere síntesis *de novo* de proteínas y no depende del nivel de calcio extracelular.
6. Las especies reactivas del oxígeno participan en el mecanismo de represión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia.
7. La regulación de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  por la hipoxia en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal depende de HIF-2 $\alpha$ , no de HIF-1 $\alpha$ . Se trata de uno de los pocos ejemplos conocidos de represión mediada por el sistema HIF durante la hipoxia.
8. La ausencia de glucosa, al igual que la hipoxia, tiene un efecto represor sobre la expresión de la subunidad  $\beta_1$ . Ambos estímulos aplicados simultáneamente tienen, además, un efecto sumatorio sobre la regulación de la expresión de la subunidad  $\beta_1$ .
9. La hipoxia crónica y severa aumenta la viabilidad de los cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata y ratón neonatales durante la isquemia simulada. De esta manera la hipoxia “precondiciona” a estas células protegiéndolas durante la isquemia. Este efecto protector del “precondicionamiento hipóxico” incrementa con el tiempo de exposición a la hipoxia.

## Conclusiones

10. El acondicionamiento hipóxico en cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal depende fundamentalmente de HIF-2 $\alpha$ .
11. La represión por la hipoxia de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K contribuye a aumentar la resistencia de los cardiomiocitos frente a la isquemia. Dado que se han descrito canales maxi-K en la membrana interna mitocondrial, la represión de la subunidad  $\beta_1$  podría actuar como mecanismo de freno para dificultar la apertura de los canales de potasio y la consiguiente despolarización mitocondrial.
12. La subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K es capaz de interactuar con, al menos, dos proteínas mitocondriales (subunidad 1 de la NADH-deshidrogenasa mitocondrial (ND1) y subunidad 6 de la ATP-sintasa F<sub>0</sub>), implicadas en la fosforilación oxidativa y pertenecientes a los complejos I y V de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Por lo tanto, la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K podría desempeñar funciones distintas a las de modificar la actividad de la subunidad  $\alpha$  del canal maxi-K.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## **I. PREPARACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CARDIOMIOCITOS DE RATA NEONATAL.**

Para el cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares se utilizaron ratas o ratones de hasta tres días de edad (P0-P3). Tras la decapitación de los animales, se extrajeron los corazones y se limpiaron bajo la lupa en PBS frío (pH 7,4). Se descartaron las dos aurículas y las válvulas aórtica y pulmonar. Posteriormente, los ventrículos fueron lavados en PBS frío y estéril en la campana de flujo laminar y troceados con tijeras curvadas estériles hasta obtener fragmentos de aproximadamente 2 mm.

La dispersión del tejido se realizó enzimáticamente (Blondel et al., 1971) mediante tripsinizaciones sucesivas (6 ó 7 en total) de unos 20 min cada una a 37 °C en un baño con agitación. Para ello se usó tripsina (SIGMA), la cual se diluyó desde su concentración inicial (10X, equivalente a 25 g/l ó 2,5 % p/v) hasta 1X en PBS estéril (2,5 g/l ó 0,25 % p/v) para su utilización. Tras cada tripsinización, las fracciones dispersas se fueron retirando con pipeta automática a otro tubo, y al tejido aún no digerido se le añadió tripsina fresca, continuando la dispersión de la misma manera.

A las fracciones dispersas se les añadió suero bovino fetal (FBS) para inactivar la tripsina. Posteriormente se centrifugaron a temperatura ambiente durante 5 min a 1.500 rpm. El precipitado de células resultante se resuspendió en FBS, y cada fracción así obtenida se mantuvo en el incubador (95 % aire y 5 % CO<sub>2</sub>, a 37 °C) hasta la dispersión completa del tejido.

Una vez disperso el tejido, se unieron todas las fracciones y se volvieron a centrifugar durante 8 min hasta obtener un precipitado compacto de células. Dicho precipitado se resuspendió en medio completo para cardiomiocitos con la siguiente composición: DMEM y M199 en relación 4:1 (en volumen) suplementado con 10 % de suero de caballo (HS) y 5 % de FBS, penicilina (10 U/mL), estreptomycin (10 U/mL) y L-glutamina (2 mM). Posteriormente las células se sembraron, manteniéndose durante 1 h en el incubador (pre-siembra). Esta pre-siembra se realizó con el fin de eliminar los fibroblastos del cultivo, pues este tipo celular se adhiere más rápidamente a la placa que los cardiomiocitos (Polinger, 1970). A continuación, se recogieron las células no adheridas a la superficie de la placa, cardiomiocitos en su mayoría, y se contabilizaron en la cámara de Neubauer. Simultáneamente, se realizó el test de viabilidad mediante tinción con azul tripán. Las células se sembraron en placas de cultivo a una densidad aproximada de 1,3-1,5 millones de células vivas totales para las placas de 3,5 cm de diámetro y de 3-3,5 millones para las placas de 6 cm.

Las placas de cultivo se mantuvieron en el incubador y el medio se sustituyó a los dos días con el fin de eliminar los cardiomiocitos muertos (no adheridos a la superficie de la placa). Los experimentos se realizaron a partir del tercer día de cultivo y duraron 48 h como máximo, puesto que a tiempos superiores los fibroblastos comenzaban a proliferar en los cultivos. De esta manera se obtuvieron cultivos de alta pureza en cardiomiocitos ventriculares (90-95 % de las células del cultivo), como se pudo confirmar por experimentos de hibridación *in situ* que se detallan más adelante.

## **II. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR.**

### ***II.1. Hibridación “in situ” no radiactiva.***

Los experimentos de hibridación *in situ* se realizaron con sondas de RNA marcadas con UTP-digoxigenina en preparaciones de cardiomiocitos ventriculares dispersos de rata neonatal y sembrados sobre fragmentos de cubreobjetos.

#### **II.1.1. Síntesis de la sonda.**

La síntesis de RNA se llevó a cabo por transcripción *in vitro* a partir de plásmidos linearizados (pBluescript) que contenían secuencias parciales de cDNA de los genes de la cadena ligera de la miosina tipo 2 auricular (MLC-2a) y ventricular (MLC-2v). Estos plásmidos se linearizaron con enzimas de restricción (*Ava II* para el plásmido pBS-MLC-2a y *Sma I* para el plásmido pBS-MLC-2v), y a continuación se generaron las sondas antisentido. La reacción de transcripción se llevó a cabo durante 2,5 h a 37 °C con 2 µg de DNA molde, en presencia del tampón de la RNA polimerasa, 10 U de la enzima RNA polimerasa T7 (PROMEGA), 10 mM de DTT, 50 U RNasa Out (INVITROGEN) y una mezcla de 1 mM rNTPs que contenía uridina marcada con digoxigenina [Digoxigenina-11-uridina-5'-trifosfato, (ROCHE)]. Después de la transcripción, la sonda se trató con 20 U de DNasa I (INVITROGEN) durante 15 min a 37 °C. A continuación, se precipitó con 30 µg de RNA de la levadura *Torula* (SIGMA), 100 mM de cloruro de litio (LiCl) y 2 volúmenes de etanol 100 % durante toda la noche a -20 °C. Tras centrifugar a 4 °C durante 30 min a 16.000 g, el RNA marcado se lavó con etanol 70 % (v/v) libre de nucleasas y se volvió a centrifugar durante 30 min a 16.000 g. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O-depc (agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) al 0,01 % (v/v) para eliminar las ribonucleasas contaminantes).

### **II.1.2. Procedimiento.**

Los cardiomiocitos en cultivo se fijaron en paraformaldehído al 4 % (p/v) disuelto en PBS-depc durante 20 min. Posteriormente, se procedió a hidratar las células incubándolas en primer lugar en etanol 70 % durante 30 min y en segundo lugar en etanol 50 % otros 30 min. Este tratamiento contribuyó a permeabilizar las membranas celulares. Tras dos lavados de 5 min cada uno en PBS-depc las células se incubaron durante 2 min a 37°C en PBS-depc con 10 µg/ml proteinasa K (ROCHE), para digerir parcialmente las proteínas celulares y aumentar la accesibilidad de la sonda. Seguidamente, las células se trataron con PBS-depc conteniendo glicina al 2 % (p/v) durante 3 min y se lavaron dos veces en PBS-depc durante 5 min. Posteriormente, las células se volvieron a fijar en PBS-depc con paraformaldehído al 4 % (p/v) y glutaraldehído al 0,2 % (v/v), y tras 15 min de tratamiento en esta solución las células se volvieron a lavar dos veces durante 5 min en PBS-depc. Seguidamente, las células se incubaron durante 1 h a 57 °C en una solución de prehibridación con la siguiente composición: 50 % formamida desionizada, 750 mM NaCl, 75 mM citrato sódico, 2 % reactivo de bloqueo (BOEHRINGER), 0,1 % tritón X-100 (SIGMA), 0,1 % detergente CHAPS (SIGMA), 1 mg/ml RNA de la levadura *Torula* (SIGMA), 50 µg/ml heparina (SIGMA) y 5 mM EDTA. Posteriormente, se sustituyó la solución de prehibridación por la de hibridación, nueva solución de prehibridación que contenía la sonda previamente desnaturalizada durante 10 min a 70 °C. La concentración óptima de hibridación tanto para la sonda MLC-2a como para MLC-2v fue de 1:1.000 (v/v). La incubación con la sonda se prolongó durante toda la noche a 57 °C. Pasado este tiempo se realizaron 2 lavados de 30 min cada uno sobre un termobloque a 57 °C con la solución de lavado [2x SSC y formamida al 50 % (v/v) a pH 4,5] precalentadas a esa temperatura, seguidos de dos lavados en PBS-depc a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se incubaron las células en solución de bloqueo, compuesta por KTBT [tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, Tritón X-100 al 0,3 % (v/v), NaCl 150 mM, KCl 10 mM] suplementado con suero neonatal bovino al 20 % (v/v) y reactivo de bloqueo al 0,7 % (p/v), durante 30 min a temperatura ambiente. Durante el bloqueo, se procedió a la preabsorción del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (ROCHE) en solución con polvo de cerebro. Dicha suspensión de polvo de cerebro se preparó mediante trituración con ayuda de un micropistilo (EPPENDORF) de 3 mg de polvo de cerebro en 1 ml de KTBT, e incubando la mezcla durante 30 min a 70 °C. Tras el enfriado de la misma se añadió el anticuerpo anti-digoxigenina a una concentración de 2:1.000 (v/v) y se incubó durante 1 h a 4 °C (preabsorción). A continuación, se centrifugó durante 5 min a 10.000

rpm a 4 °C y el sobrenadante se añadió a la solución de bloqueo, de forma que el anticuerpo quedase a una concentración final de 1:1.000 (v/v). Las células se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina preabsorbido en polvo de cerebro durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente se procedió a los lavados en KTBT (dos de 5 min y de 3 de 10 min), seguidos de 3 lavados de 5 min en tampón NTMT [100 mM Tris-HCl pH 9,5, 1 mM levamisol (inhibidor de la fosfatasa alcalina endógena; SIGMA), 0,1 % Tween 20, 50 mM MgCl<sub>2</sub> y 100 mM NaCl] a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo mediante incubación durante toda la noche a temperatura ambiente en una solución de revelado [225 µg/ml de NBT y 115 µg/ml de BCIP (BOEHRINGER), en NTMT] y protegido de la luz. La fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo, en presencia de BCIP, transforma el cromógeno NBT en un precipitado de color azul. Una vez visualizada la señal, se detuvo la reacción lavando 3 veces durante 5 min con KTBT, y luego 2 veces durante 5 min con PBS-depc. Los cubres se conservaron a 4 °C en PBS-depc con 0,02 % azida sódica hasta su montaje o se montaron directamente sobre portaobjetos en posición invertida sobre 2-3 ml de reactivo de montaje fluorescente DakoCytomation (DAKO). El resultado de la hibridación *in situ* se visualizó en un microscopio con óptica de *Nomarsky* (OLYMPUS) y se fotografiaron con una cámara CCD (OLYMPUS).

## ***II.2. Extracción de RNA total.***

Para extraer RNA total de cardiomiocitos en cultivo se utilizó el kit *Nucleospin RNA II* (MACHEREY-NAGEL), basado en la purificación del RNA por columnas de afinidad. Este protocolo incluía un paso de digestión con DNasa I para eliminar el DNA genómico presente en la preparación. El RNA se eluyó en H<sub>2</sub>O-depc y posteriormente se precipitó añadiéndole 1:10 (v/v) de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100 % e incubándolo toda la noche a -20 °C. Tras la centrifugación, el precipitado de RNA resultante se lavó con etanol 70 % y se resuspendió en H<sub>2</sub>O-depc.

El RNA de tejidos como corazón, cerebro o aorta se extrajo con el reactivo Trizol (INVITROGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dichos tejidos fueron siempre congelados en nitrógeno líquido para mantener la integridad de los mismos y para facilitar su ruptura tras la descongelación. El tejido fue homogenizado en el reactivo con la ayuda de un homogenizador (PT4.000; POLYTRON). Posteriormente se realizó una centrifugación para eliminar los restos de tejido, seguido de una extracción con cloroformo y una extracción adicional con fenol-cloroformo para aumentar la limpieza de la muestra. La precipitación del RNA se realizó añadiendo isopropanol 1:1 (v/v) e

incubando durante 10 min a temperatura ambiente, después de lo cual se procedió a centrifugar el RNA. Tras un lavado con etanol 70 % el RNA se resuspendió en H<sub>2</sub>O-depc. La concentración de RNA de las muestras obtenidas con ambos métodos fue determinada utilizando un espectrofotómetro (DU640; BECKMAN), con el que se midió la densidad óptica de las muestras a 260 nm. La calidad del RNA se comprobó mediante la relación entre las densidades ópticas a 260 y 280 nm y visualizando el RNA ribosómico en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En el caso del RNA procedente de tejidos, tras la cuantificación fue necesario un tratamiento con DNasa I pancreática bovina (INVITROGEN), a fin de eliminar el DNA genómico presente en la preparación.

Todas las muestras de RNA así obtenidas se conservaron a -80 °C.

### **II.3. Northern blot.**

Esta técnica permite la detección del RNA mensajero con sondas marcadas radiactivamente con <sup>32</sup>P que presentan una secuencia complementaria a la del mensajero a estudiar. En nuestro caso se usaron sondas de cDNA para detectar los mensajeros de la subunidad β<sub>1</sub> del canal maxi-K y de la ciclofilina.

#### **II.3.1. Generación de las sondas.**

La sonda para el mensajero de la subunidad β<sub>1</sub> del canal maxi-K se obtuvo a partir de una PCR convencional con cDNA de cardiomiocitos de rata en cultivo. Para esta PCR se utilizó la pareja de oligos 449-JN4 (Tabla 2), con los que se obtuvieron dos amplicones, uno de 450 pb y otro de 250 pb, correspondientes a variantes de *splicing* de este gen. Posteriormente se procedió a la purificación en gel de agarosa del fragmento de 450 pb, que corresponde a la variante de *splicing* más frecuente en nuestra preparación), con el Accuprep Gel Purification Kit (BIONEER).

La sonda para el mensajero de la ciclofilina se obtuvo a partir de la digestión con EcoRI y HindIII del plásmido psP65-CF, y posterior purificación en gel con el Accuprep Gel Purification Kit (BIONEER). Esta sonda se utilizó para controlar la carga de RNA en los genes, pues el mensajero de la ciclofilina se expresa de manera constitutiva.

A continuación se cuantificaron los cDNAs así obtenidos y aproximadamente 25 ng de los mismos se marcaron radiactivamente con 50 μCi de 5' [α-<sup>32</sup>P]dCTP (3.000 mCi/mmol) mediante el empleo del kit de marcaje Rediprime II random prime labelling system (AMERSHAM BIOSCIENCES) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El exceso de nucleótidos no incorporados se eliminó por filtración en columnas Illustra Microspin S-400 HR Columns (GE HEALTHCARE).

### **II.3.2. Procedimiento.**

Se utilizaron 20 µg de RNA total procedente de cada condición experimental, los cuales se desnaturalizaron durante 5 min a 65 °C en una solución que contenía 1x MOPS, 10 % formaldehído (SIGMA) y 50 % formamida desionizada (FLUKA). Tras una incubación posterior en hielo de 5 min se añadió tampón de carga (0,05 % Azul de Bromofenol, 50 % glicerol y 1 % SDS) y 1 mg de bromuro de etidio.

A continuación, se sometieron a electroforesis en un gel desnaturalizante al 1 % de agarosa en tampón MOPS 1x con 5,5 % formaldehído. La electroforesis se llevó a cabo en tampón MOPS 1x durante 4-5 h a un voltaje que se eligió en base al tamaño del gel; por cada cm<sup>2</sup> de gel se aplicaron 5 V. Una vez terminada la electroforesis el gel se sumergió durante 15 min en agua a 65 °C para eliminar el formaldehído. Posteriormente el gel se incubó otros 15 min a temperatura ambiente en una solución de NaOH (10 mM NaCl y 100 mM NaOH), y seguidamente se realizó otra incubación de 15 min a temperatura ambiente en una solución 10 mM Tris pH 8. Se concluyó con 2 lavados de 20 min en el tampón de transferencia (20x SSC, pH 6,2).

Seguidamente el gel se transfirió por capilaridad a membranas de nylon cargadas positivamente Hybond-N+ (AMERSHAM BIOSCIENCES). Pasado este tiempo, las membranas se expusieron a un pulso de luz UV (SPECTRONICS CORPORATION) de 120 mj/cm<sup>2</sup> decreciente durante 1 min. Las membranas se conservaron a temperatura ambiente protegidas entre papel de filtro hasta su uso.

Las membranas con las muestras de RNA se sometieron a prehibridación durante 2 h a 42 °C en la solución de hibridación comercial Ultrahyb (AMBION) y posteriormente se incubaron toda la noche a 42 °C en la solución de hibridación. Dicha solución contenía la sonda desnaturalizada mediante incubación durante 5 min a 95 °C. Transcurrido ese tiempo, se procedió al lavado de las membranas para eliminar el exceso de sonda. Se efectuaron dos lavados de 5 min cada uno a temperatura ambiente y dos lavados de 15 min a 42 °C con 2x SSC y 0.1 % SDS.

La exposición de las membranas a las placas radiográficas se realizó a temperatura ambiente con pantallas intensificadoras durante tiempos variables. Para cuantificar la intensidad de las bandas marcadas, se utilizó el sistema de detección Typhoon 9.400 Variable Mode Imager (AMERSHAM BIOSCIENCES) y las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa ImageQuant (AMERSHAM BIOSCIENCES).

#### **II.4. Retrotranscripción.**

Las muestras de RNA fueron sometidas a una reacción de retrotranscripción o transcripción inversa para su posterior análisis por PCR. La reacción se llevó a cabo a partir de 2-4 µg de RNA total usando la enzima de retrotranscripción, SuperScript II RNase H<sup>-</sup> (INVITROGEN). El RNA total se incubó con una mezcla de 50 ng de hexanucleótidos aleatorios y 1 mM de dNTPs, durante 5 min a 65 °C. Posteriormente se añadieron a la mezcla, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 40 U de inhibidor de RNasas y 50 U de enzima SuperScript II. Esta mezcla se incubó a 25 °C durante 15 min, después a 42 °C durante 50 min y por último se inactivaron las enzimas incubando a 72 °C durante 15 min. El cDNA así obtenido se conservó a -20 °C.

#### **II.5. PCR convencional.**

La reacción se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50 µl en presencia de tampón de la polimerasa EcoTaq 1x (ECOGEN), MgCl<sub>2</sub> 1 mM (ECOGEN), 0,2 mM desoxinucleótidos trifosfato o dNTPs (INVITROGEN), 10 pmoles de cada oligonucleótidos (“sentido” y “antisentido”) y 1 U de la DNA polimerasa EcoTaq (ECOGEN). La reacción se realizó usando 0,5-1 µl de cDNA en termociclador (BIOMETRA).

El protocolo de amplificación fue el siguiente: 3 min a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de amplificación cada uno de ellos consistente en 30 seg de desnaturalización a 94 °C, 30 seg de renaturalización a 58 °C y 1 min de polimerización a 72 °C. Posteriormente las muestras se incubaron 10 min a 72 °C y finalmente se mantuvieron a 4 °C hasta que se analizó su resultado mediante la visualización de los productos de la reacción en gel de agarosa.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 2. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa Primer Express (APPLIED-BIOSYSTEMS).

**Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR convencional.**

Nombre	Gen	Tipo	Secuencia (5' a 3')
449	Subunidad $\beta_1$	Sentido	AGGAATCCACCTGTCACTTGGT
JN4	Subunidad $\beta_1$	Antisentido	CCATGCTGCTGTGCAGAAGA
472	Subunidad $\beta_1$	Sentido	TGTGCTCAGACTTGACCATGTTT
473	Subunidad $\beta_1$	Antisentido	CCATGCTGCTGTGCAGAAGA
ML-36	Subunidad $\beta_2$	Sentido	CGGGAATTCACCATGACCTCCTGGACAAAA GG
ML-37	Subunidad $\beta_2$	Antisentido	GCCGAATTCTTCTGTGTGGTAGAGGAGGAG CT
ML-54	Subunidad $\beta_3$	Sentido	CGGGAATTCATGACAGCCTTTCCTCGGTCA G
ML-55	Subunidad $\beta_3$	Antisentido	CGGGAATTCGGGATTTATCTGGACAGCCTC
ML-31	Subunidad $\beta_4$	Sentido	CGGGAATTCATGGCGAAGCTCAGGGTGTCT TAC
ML-32	Subunidad $\beta_4$	Antisentido	CGGGAATTCTTAAGAGAACTTGCGTTTCTTC
Ppia-1-51	Ciclofilina	Sentido	GTCTCTTTTCGCCGCTTGCTG
Ppia-1-31	Ciclofilina	Antisentido	GCTCATGCCTTCTTTACCTTCC

## II.6. PCR cuantitativa (qPCR).

La amplificación del DNA en una reacción de PCR tiene tres fases bien diferenciadas: exponencial, lineal y de meseta. La monitorización de dichas fases en tiempo real es posible mediante el empleo de fluorocromos como el SYBR Green (APPLIED-BIOSYSTEMS); esta molécula se intercala en el surco menor de la doble hélice de DNA y fluoresce cuando es irradiada con luz ultravioleta.

La cuantificación por PCR a tiempo real (qPCR) se basa en el hecho de que, durante la fase exponencial de la reacción, la cantidad de DNA amplificado es directamente proporcional a la cantidad de DNA molde inicial. El parámetro principal que nos va a permitir la cuantificación es el denominado "Ct" (*Threshold Cycle*), el ciclo en el cual comienza a detectarse la amplificación del DNA.

Para analizar diferencias de expresión de un gen en una preparación sometida a diferentes condiciones experimentales se realiza una cuantificación relativa. En este tipo de cuantificación el descenso o aumento de expresión del gen de interés en una situación problema es referida a la de la situación control, calculándose con el método

del  $\Delta\Delta Ct$ . Dicho método está basado en el cálculo, en primer lugar, del  $\Delta Ct$  de las condiciones problema y control. El  $\Delta Ct$  es la diferencia entre el Ct del gen de interés y el Ct de un gen de expresión constitutiva (que se usa para normalizar), en la misma condición experimental. Seguidamente se calcula el  $\Delta\Delta Ct$ , o diferencia entre los  $\Delta Ct$  en las condiciones problema y control. Para terminar, mediante la fórmula  $N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  se calcula el número de veces que el gen de interés cambia en la condición problema respecto a la condición control (N). El método del  $\Delta\Delta Ct$  sólo puede ser utilizado si la eficiencia de la amplificación de los genes de interés y de expresión constitutiva es similar. Para determinar la eficiencia de la PCR se construyen las rectas patrón para cada gen usando diluciones seriadas de cDNA. Una amplificación óptima es aquella en la que la recta patrón presenta una pendiente de -3,32 y un coeficiente de regresión R mayor de 0,97. Para emplear el método de cuantificación relativa  $\Delta\Delta Ct$  las rectas patrón del gen problema y el gen constitutivo han de ser semejantes (pendientes con una diferencia inferior a 0,3).

Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en los sistemas ABI Prism 7.000 y 7.500 Sequence Detection System (APPLIED-BIOSYSTEMS). El protocolo optimizado de PCR, según las recomendaciones del fabricante, consistió en una primera fase de 10 min a 95 °C y una segunda con 40 ciclos de 15 seg de desnaturalización a 95 °C y 1 min de amplificación a 60 °C.

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa Primer Express (APPLIED-BIOSYSTEMS). Cada pareja de oligonucleótidos fueron diseñados para generar un amplicón de no más de 150-200 nucleótidos, tal y como recomienda el fabricante para una óptima eficiencia de la reacción. En la Tabla 3 se muestra un listado de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diferentes genes analizados.

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en un volumen total de 30  $\mu$ l que contenía 15  $\mu$ l de Master mix SYBR Green (APPLIED-BIOSYSTEMS), 150-300 nM de oligonucleótidos específicos, y 0,1-1  $\mu$ l de cDNA.

Tras el protocolo de amplificación, se incluyó un paso adicional que consistió en un aumento progresivo de la temperatura de 60 a 95 °C para obtener la "curva de disociación". Con este protocolo se obtiene la temperatura de disociación o  $T_m$  (*Temperature of melting*) del fragmento de DNA amplificado. La curva de disociación permite, por un lado, comprobar si la  $T_m$  obtenida se corresponde con el valor teórico para el amplicón y, por otro, diferenciar los productos específicos de la amplificación de los *primer-dimers*. En todos los experimentos realizados se comprobó que las curvas de disociación mostrasen un pico único de fluorescencia y que coincidiera con el valor teórico de la  $T_m$  para cada fragmento amplificado.

**Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR cuantitativa.**

**Tipos de oligonucleótidos: (S) Sentido; (AS) Antisentido.**

Nombre	Gen	Especie	Tipo	Secuencia (5' a 3')
JN3	Subunidad $\beta_1$	Rata	S	TCATTGCCATGGTAAAGCTCAA
JN4	Subunidad $\beta_1$	Rata	A	CCATGCTGCTGTGCAGAAGA
450	Subunidad $\beta_1$	Ratón	S	TGCTGTATCACACGGAAGACACT
451	Subunidad $\beta_1$	Ratón	A	GATATAGGAGCACTGTTGGTTTTGATC
HIF-1-RTf	HIF-1 $\alpha$	Rata	S	ACACGAGCTGCCTCTTCGA
HIF-1-RTr	HIF-1 $\alpha$	Rata	A	CAGCCGCTGGAGCTAGCA
HIF-2-RTf	HIF-2 $\alpha$	Rata	S	GCAGATGGATAAATTGTACCTGAAAG
HIF-2-RTr	HIF-2 $\alpha$	Rata	A	CAGCCGCTGGAGCTAGCA
424	HIF-3 $\alpha$	Rata	S	ACCCTGACACTCCGGACTTG
425	HIF-3 $\alpha$	Rata	A	GGAGTTGAGCTGGAAGTCATCAT
439	VEGF	Rata	S	TCCTGGAGCGTTCACTGTGA
440	VEGF	Rata	A	CACGTCTGCGGATCTTGGA
420	HO-1	Rata	S	CGTGCTCGCATGAACACTCT
421	HO-1	Rata	A	GGAAGGCGGTCTTAGCCTCTT
LG-7	18S rARN	Rata y ratón	S	AACGAGACTCTGGCATGCTAACTA
LG-8	18S rARN	Rata y ratón	A	GCCACTTGTCCTCTAAGAAGTTG

### **II.7. Genotipado de los ratones knock-out para la subunidad $\beta_1$ .**

El genotipo de estos animales se analizó por PCR convencional en la que se utilizó como molde DNA genómico.

#### **II.7.1. Extracción de DNA genómico.**

Las extracciones de DNA genómico se realizaron bien a partir de los deditos que se le cortan a los ratones para marcarlos (el día P10), ó bien utilizando un trocito de cola. Los tejidos se conservaron a  $-20$  °C hasta su utilización. A cada fragmento de tejido se le añadieron 200  $\mu$ l del tampón Direct PCR (Tail) (VIAGEN) y 60  $\mu$ g de proteinasa K (ROCHE). Las muestras se incubaron a 55 °C en agitación durante 3 h utilizando un termoagitador Thermomixer Comfort (EPPENDORF). Posteriormente se

procedió a incubar los lisados a 85 °C durante 45 min sin agitación, con el objeto de inactivar la proteinasa K. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 2 min a velocidad máxima, para eliminar los restos de tejido o pelo de los animales. Los sobrenadantes se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

### II.7.2. PCR convencional.

La reacción se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50 µl en presencia de tampón de la polimerasa EcoTaq 1x (ECOGEN), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (ECOGEN), 0,25 mM dNTPs (INVITROGEN) y 1 U de la DNA polimerasa EcoTaq (ECOGEN). Se utilizaron los oligonucleótidos BKMB 11s (100 pmoles), BKMB 17s (50 pmoles) y BKMB 3a (12,5 pmoles). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 3. La reacción se realizó usando 1-2 µl de DNA genómico en un termociclador (BIOMETRA). El protocolo de amplificación fue el siguiente: 2 min a 93 °C, seguidos de 35 ciclos de amplificación cada uno de ellos consistente en 30 seg de desnaturalización a 93 °C, 30 seg de renaturalización a 58 °C y 45 seg de polimerización a 72 °C. Posteriormente las muestras se incubaron 10 min a 72 °C y finalmente se mantuvieron a 4 °C hasta que se analizó su resultado mediante la visualización de los productos de la reacción en gel de agarosa. Con los oligonucleótidos BKMB 11s y BKMB 3a se detectó el fragmento silvestre, de 719 pb. En cambio, la ausencia del gen de la subunidad β<sub>1</sub> generó un fragmento de 372 pb, detectado por los oligonucleótidos BKMB 11s y BKMB 17s.

**Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones knock-out para la subunidad β<sub>1</sub>.**

Nombre	Secuencia (5' a 3')
<b>BKMB 11s</b>	GCTGAAACTCTGAAGCTACTC
<b>BKMB 17s</b>	GCTATGAGGCAACTAAACAGG
<b>BKMB 3a</b>	CACAGCTGATACATTGACCC

### II.8. Western blot.

Para este tipo de experimentos los cardiomiocitos neonatales de rata se sembraron en placas de cultivo de 6 cm de diámetro con una confluencia aproximada de un 80 %. Tras los distintos tratamientos experimentales las placas fueron lavadas con

PBS frío a pH 7,4 y las células recogidas y centrifugadas durante 5 min a 1.000 rpm a 4 °C. El pellet de células resultante fue resuspendido en un tampón de extracción de proteínas con la siguiente composición: 50 mM HEPES pH 7,3 (ajustado con KOH), 5 mM EDTA pH 8, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, y 0,2 % NP-40. Justo antes de la extracción de proteínas el tampón fue suplementado con un cocktail de inhibidores de proteínas (SIGMA) a una concentración final de 1/100, y ortovanadato sódico ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM. Tras 5 min en hielo las muestras se homogenizaron y centrifugaron a velocidad máxima (13.000 rpm) a 4°C durante 15 min. La concentración de proteína que contenía el sobrenadante resultante o el extracto total de proteínas fue posteriormente cuantificado por el método de Lowry, utilizando el kit DC Protein Assay (BIORAD) siguiendo las instrucciones del fabricante.

50  $\mu\text{g}$  de proteína total de los lisados de células se desnaturalizaron posteriormente mediante hervido durante 5 min, y se sometieron a electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando el sistema Mini-protean (BIORAD). La electroforesis se realizó en un tampón de electroforesis Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1 % a un voltaje de 150 mV.

Los geles se transfirieron a membranas de PVDF previamente activadas con metanol en una sistema de transferencia semi-seca (SIGMA) durante 2 h y utilizando una solución de transferencia Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v). El amperaje en miliamperios se escogió en base al área en  $\text{cm}^2$  de la membrana y multiplicando este valor por un factor de 1,2.

Posteriormente se procedió al bloqueo de la membrana, que se realizó en PBS suplementado con Tween-20 al 0,05 % (PBTween-20) y leche desnatada en polvo al 5 %. Tras 2 h de bloqueo las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en solución bloqueante con el anticuerpo primario a la dilución óptima (Tabla 5). En el caso de los primarios de  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -actina la incubación del anticuerpo primario se realizó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se lavaron 4 veces en PBTween-20 durante 5 min e incubaron 1 h a temperatura ambiente en solución bloqueante con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a la dilución óptima (Tabla 5). Tras 4 lavados de 5 min en PBTween-20 se procedió al revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL PLUS Western Blot Detection System (GE HEALTHCARE).

Tabla 5: Anticuerpos utilizados para el análisis de proteínas mediante Western-blot.

Tipo de anticuerpo	Proteína detectada	Casa comercial	Dilución óptima
primario	HIF-1 $\alpha$	CAYMAN	1:500
primario	HIF-2 $\alpha$	ABCAM	1:1.000
primario	$\alpha$ -tubulina	SIGMA	1:10.000
primario	$\beta$ -actina	ABCAM	1:5.000
secundario	IgG conejo	PIERCE	1:10.000
secundario	IgG ratón	AMERSHAM	1:10.000

### II.9. Interferencia por RNA.

La interferencia por RNA es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional que constituye un mecanismo de defensa frente a virus de doble cadena en las células eucariotas. Se describió por primera vez en plantas e invertebrados (Fire et al., 1998), aunque también está presente en mamíferos. Se trata por lo tanto de un mecanismo de aparición ancestral que se ha conservado en la evolución; pese a su reciente descubrimiento se piensa que apareció antes de que ocurriera la divergencia entre plantas y animales.

El proceso general de interferencia en plantas e invertebrados se inicia con la activación de la endonucleasa Dicer (Bernstein et al., 2001), que reconoce como extraño al RNA del virus que infecta la célula al presentar doble cadena. Esta enzima corta el dúplex de RNA en fragmentos de 21 a 23 pb, los RNAi (RNA de interferencia) o siRNA (*small interfering RNA*), que son reconocidos por un complejo protéico denominado complejo silenciador inducido por RNA ó RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Este complejo, formado por helicasas y nucleasas, separa las cadenas de los siRNA, los hibrida con el mRNA diana de secuencia complementaria a los siRNA y corta selectivamente dicho mRNA. Éste posteriormente es degradado completamente por otras nucleasas celulares. El proceso puede amplificarse gracias a la actividad polimerasa de la enzima Dicer, que puede generar nuevos RNA de mayor longitud y de doble cadena a partir de los siRNA, haciendo que el silenciamiento del transcrito diana sea altamente eficiente.

En células diferenciadas de mamífero los RNA de 21 a 23 pb cumplen una función reguladora de la transcripción de numerosos genes, produciendo generalmente represión de los mismos. Dichos RNA se transcriben de forma policistrónica en los denominados microRNAs (miRNA), que posteriormente son procesados hasta los RNA

funcionales. Una vez generados inducen la formación del complejo RISC y el consiguiente silenciamiento génico. Este proceso de interferencia por RNA específico de secuencia se puede activar mediante la introducción exógena de siRNA sintéticos, los cuales inducen la formación del complejo proteico RISC. Gracias a este hecho en la actualidad el uso de estos siRNA sintéticos para producir silenciamiento génico se ha convertido en una potente herramienta en biología molecular.

### **II.9.1. Procedimiento.**

Para el tratamiento con siRNA los cardiomiocitos de rata se sembraron a una confluencia aproximada del 80 %. En la tabla 6 se detallan las secuencias de los oligos sentido y antisentido que anillados conforman los siRNA utilizados para silenciar los genes de HIF-1 $\alpha$  (AMBION), HIF-2 $\alpha$  (SIGMA) y la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K (AMBION).

El método utilizado para transfectar las células fue la lipofección, para la cual se utilizó el reactivo lipofectamina RNAiMAX (INVITROGEN), específico para interferencia con RNA. La composición del medio de cultivo fue modificada en este tipo de experimentos: a fin de reducir la proliferación de fibroblastos en los cultivos se redujo a la mitad la cantidad de suero (5 % de HS y 2,5 % de FBS) y se eliminó el antibiótico, el cual inhibe el proceso de lipofección.

Siguiendo las especificaciones del fabricante, se optimizaron las cantidades de lipofectamina y de siRNA para cada gen a silenciar, así como el tiempo de interferencia. De esta manera se determinó que la cantidad óptima de lipofectamina era 1  $\mu$ l por cada ml de medio final y el tiempo de transfección era de entre 24 y 48 h, siendo las 24 h donde se alcanzaba para todos los siRNA el máximo nivel de interferencia. Las concentraciones finales de los siRNA utilizados fueron 25 nM para silenciar HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  y 50 nM para la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K. Como control negativo de interferencia se utilizó un siRNA de secuencia aleatoria (*scramble*), proporcionado por AMBION.

Tras el tratamiento con siRNA las células se lisaron y se procedió a la extracción de RNA o proteínas totales. Los niveles de los mRNA de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , VEGF y la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K se cuantificaron utilizando la técnica de PCR en tiempo real y la cantidad de proteína HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  se analizó por *Western blot*.

**Tabla 6: Oligonucleótidos de RNA utilizados para el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K.**

(S) Sentido; (AS) Antisentido.

Nombre	Gen a silenciar	Secuencia (5' a 3')
HIF-1 $\alpha$ -S	HIF-1 $\alpha$	GCUUGCUCaucAGUUGCCAtt
HIF-1 $\alpha$ -AS	HIF-1 $\alpha$	UGGCAACUGAUGAGCAAGCtt
HIF-2 $\alpha$ -S	HIF-2 $\alpha$	GGCCAAACAUGGAGGAUAUtt
HIF-2 $\alpha$ -AS	HIF-2 $\alpha$	AUAUCCUCCAUGUUUGGCCtt
$\beta_1$ -S	subunidad $\beta_1$	CCUUGGUUGAUGUGAAGAAtt
$\beta_1$ -AS	subunidad $\beta_1$	UUCUUCACAUCAACCAAGGtt

### **II.10. Doble híbrido.**

El estudio de las posibles interacciones de la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K con otras proteínas se llevó a cabo utilizando una variante del ensayo de doble híbrido de levaduras con el que es posible estudiar interacciones de proteínas de membrana. El sistema "Dual membrane" (DUAL SYSTEMS) es una adaptación del "ubiquitin-based split protein sensor" desarrollado por Johnsson y Varshavsky en 1994. Se basa en las propiedades de la ubiquitina, proteína que marca a otras proteínas para proceder a su degradación. La ubiquitina puede ser cortada en dos mitades, amino (Nub) y carboxilo (Cub). Cada una de las dos mitades mantiene su afinidad por la mitad complementaria, de forma que se pueden ensamblar para formar la denominada "split-ubiquitin". Al igual que la ubiquitina nativa, la "split-ubiquitin" es reconocida por proteasas específicas en el citoplasma de las células. La introducción de una mutación en la mitad Nub (NubG) reduce la afinidad por la mitad Cub, de forma que ambas proteínas ya no se reasocian cuando se coexpresan en una misma célula. El sistema "DUAL membrane" utiliza este sistema como base para detectar interacciones entre proteínas, tanto integrales como citosólicas. La proteína "cebo", en este caso la subunidad  $\beta_1$  del canal maxi-K, se expresa como proteína de fusión unida a la mitad Cub ligada, a su vez, un factor de transcripción artificial. Las proteínas "presa" se expresan como proteínas de fusión a Nub mutado. La interacción entre las proteínas cebo y presa, acerca Cub a Nub mutado (NubG) y facilita la reconstitución de la "split-ubiquitin", la cual es reconocida por la proteasa específica. Esta proteasa corta a la proteína Cub liberando el factor de transcripción, el cual difunde al núcleo para activar la transcripción de un grupo de genes "chivatos". Por tanto, la expresión de los genes chivatos se utiliza como prueba

de la interacción entre dos proteínas. A diferencia del sistema del doble híbrido de levaduras, el sistema “DUAL membrane” no depende de la localización en el núcleo de las proteínas a estudiar. Con él se puede analizar la interacción entre proteínas ya sean integrales o periféricas de membrana.

### **III. TRATAMIENTOS CELULARES Y ADITIVOS UTILIZADOS.**

#### ***III.1. Exposición a hipoxia.***

Para los tratamientos en condiciones de hipoxia, los cardiomiocitos de rata y ratón neonatal dispersos se mantuvieron en un incubador (*Oxygen Control*; FORMASCIENTIFIC) con una atmósfera constante de 5 % CO<sub>2</sub>, y 1 ó 3 % de O<sub>2</sub>.

Por otro lado, para el tratamiento de animales completos en hipoxia se utilizaron ratas macho adultas de 1 a 2,5 meses de edad, que se sometieron a una atmósfera del 10 % de O<sub>2</sub> en una cámara especial para animales (COY) durante tiempos variables. En este tipo de experimentos existieron dos grupos control de animales: un grupo de ratas que permanecieron en sus jaulas en un ambiente normóxico y otro grupo de ratas que permanecieron en la cámara de animales bajo una atmósfera normóxica.

#### ***III.2. Condición alto potasio extracelular.***

La concentración de potasio en el medio control se aumentó mediante la adición de cloruro de potasio (KCl) (SIGMA) hasta una concentración final de 40 mM. La adición de KCl al medio de cultivo produce un aumento en la osmolaridad de dicho medio, que pasa de aproximadamente 300 mOsmolar (mOsm) a 380 mOsm. Como condiciones control de aumento de la osmolaridad en el medio se añadió cloruro de sodio (NaCl) (SIGMA) hasta una concentración final de 40 mM a una placa y sacarosa hasta una concentración 80 mM a otra placa, debido a que esta molécula no se disocia en solución acuosa.

#### ***III.3. Condición cero calcio nominal.***

Para los experimentos realizados en la condición cero calcio el medio de cultivo control, mezcla de DMEM y M199, se reemplazó por un medio DMEM (GIBCO) formulado en ausencia de calcio. Este medio se suplementó con piruvato sódico y L-glutamina hasta alcanzar el mismo nivel de nutrientes existentes en el medio control

DMEM más M199. Los sueros bovino fetal y de caballo también fueron eliminados del medio, debido a que este ión está presente en ambos tipos de suero. Para las condiciones control se utilizó este medio modificado y se añadió calcio a la concentración que tiene este ión en el medio DMEM más M199 (1,23 mM).

#### ***III.4. Compuestos que mimetizan la hipoxia.***

El  $\text{CoCl}_2$  (SIGMA) se usó a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  y el DMOG o dimetiloxalilglicina (FRONTIER SCIENTIFIC) a una concentración final de 1 mM. Ambos compuestos se añadieron al medio de cultivo en condiciones de normoxia.

#### ***III.5. Compuestos que inhiben la transcripción y la traducción celular.***

Para el bloqueo de la transcripción celular se usaron Actinomicina D y DRB (dichloro-1-beta-D-ribofuranosil benzamidazol D) (SIGMA) a una concentración de 0,3  $\mu\text{g/ml}$  y 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estos compuestos son bloqueantes no específicos de las RNA polimerasas. Ambos se añadieron al medio de cultivo 30 min antes del estímulo hipóxico.

Para el bloqueo de la traducción celular se usó Cicloheximida 10  $\mu\text{M}$  (SIGMA), añadiéndose, de nuevo, 30 min antes del estímulo hipóxico.

#### ***III.6. Condición cero glucosa.***

En esta condición experimental el medio de cultivo control, mezcla de DMEM y M199 fue sustituido por un medio DMEM (GIBCO) sin glucosa en su formulación. Este medio se suplementó con piruvato sódico y L-glutamina hasta alcanzar el mismo nivel de nutrientes existentes en el medio control DMEM más M199. Además, para las condiciones control fue suplementado con glucosa a una concentración de 18 mM, debido a que ésta es la concentración de glucosa presente en el medio control DMEM más M199. Ya que la adición de glucosa generó un choque ligeramente hipertónico, en la condición cero glucosa el medio fue suplementado con sacarosa a la misma concentración.

#### **IV. ENSAYOS FUNCIONALES.**

##### ***IV.1. Isquemia simulada.***

Los experimentos de isquemia simulada se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Vander Heide y Armstrong con algunas modificaciones (Armstrong et al., 1994; Vander Heide et al., 1990). Tras dos días de cultivo y el determinado tratamiento experimental (con una duración de entre 24 y 48 h) los cardiomiocitos de rata y de ratón neonatales fueron dispersados de la placa usando tripsina (BIOWHITTAKER) a una concentración de 0,05 % (p/v) y centrifugados en tubos de 15 ml con 5 ml de medio de cultivo a 1.000 rpm durante 5 min. Posteriormente el medio de cultivo fue eliminado y el precipitado de células resultante fue resuspendido en 500  $\mu$ l de PBS a pH 7,4 para lavar las células. Tras una segunda centrifugación el PBS fue eliminado hasta dejar una fina película de no más de un tercio del volumen del precipitado, sobre la cual se añadieron 400  $\mu$ l de aceite mineral para evitar el intercambio gaseoso entre el precipitado de células y el aire contenido en el tubo. Los precipitados así obtenidos fueron incubados a 30 °C en baño sin agitación durante 3 h, en el caso de los cardiomiocitos procedentes de rata neonatal, ó 3,5 h y en el caso de los cardiomiocitos procedentes de ratón.

##### ***IV.2. Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul tripán y cuantificación del número de células.***

Este método se basa en que las células viables son impermeables a ciertos colorantes mientras que las células no viables permiten que entre el colorante y tiña su contenido (Altschuld et al., 1980). 1  $\mu$ l de células tomadas directamente del precipitado de células sometidas a isquemia simulada se mezclaron con 50  $\mu$ l de una solución comercial de azul tripán (SIGMA) diluida en agua hasta conseguir osmolaridad de 85 mOsm. Pasados 3-4 min de choque hipoosmótico en presencia del colorante, 10  $\mu$ l de la suspensión celular se usaron para cuantificación celular en una cámara de Neubauer. Seguidamente, se determinó el porcentaje de células no teñidas (viables) y teñidas (no viables), contando entre 250 y 300 células.

#### **V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los datos se analizaron usando el test *t de Student* cuando se trataba de comparar dos grupos independientes. Cuando se trabajó con más de dos grupos de estudio, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de *Tukey* o del test

*Student-Newman-Keuls*. Los análisis se realizaron con el programa SigmaStat 2.0. Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Cuando el nivel de significación (P) obtenido en cada test fue menor de 0,05 las diferencias obtenidas se han considerado estadísticamente significativas.



## BIBLIOGRAFÍA



- Aaronson, P.I. 2006. TRPC Channel upregulation in chronically hypoxic pulmonary arteries: the HIF-1 bandwagon gathers steam. *Circ Res.* 98:1465-7.
- Adelman, J.P., K.Z. Shen, M.P. Kavanaugh, R.A. Warren, Y.N. Wu, A. Lagrutta, C.T. Bond, y R.A. North. 1992. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron.* 9:209-16.
- Altschuld, R., L. Gibb, A. Ansel, C. Hohl, F.A. Kruger, y G.P. Brierley. 1980. Calcium tolerance of isolated rat heart cells. *J Mol Cell Cardiol.* 12:1383-95.
- Amberg, G.C., y L.F. Santana. 2003. Downregulation of the BK channel  $\beta_1$  subunit in genetic hypertension. *Circ Res.* 93:965-71.
- An, J., S.G. Varadarajan, E. Novalija, y D.F. Stowe. 2001. Ischemic and anesthetic preconditioning reduces cytosolic  $[Ca^{2+}]$  and improves  $Ca^{2+}$  responses in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H1508-23.
- Armstrong, S., J.M. Downey, y C.E. Ganote. 1994. Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor. *Cardiovasc Res.* 28:72-7.
- Asemu, G., F. Papousek, B. Ostadal, y F. Kolar. 1999. Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial  $K_{ATP}$  channel. *J Mol Cell Cardiol.* 31:1821-31.
- Baker, J.E., P. Holman, y G.J. Gross. 1999. Preconditioning in immature rabbit hearts: role of  $K_{ATP}$  channels. *Circulation.* 99:1249-54.
- Basu, S., A. Nozari, X.L. Liu, S. Rubertsson, y L. Wiklund. 2000. Development of a novel biomarker of free radical damage in reperfusion injury after cardiac arrest. *FEBS Lett.* 470:1-6.
- Baxter, G.F., F.M. Goma, y D.M. Yellon. 1997. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol.* 92:159-67.
- Beekman, R.E., C. van Hardeveld, y W.S. Simonides. 1990. Thyroid status and  $\beta$ -agonistic effects on cytosolic calcium concentrations in single rat cardiac myocytes activated by electrical stimulation or high- $K^+$  depolarization. *Biochem J.* 268:563-9.
- Berchner-Pfannschmidt, U., F. Petrat, K. Doege, B. Trinidad, P. Freitag, E. Metzen, H. de Groot, y J. Fandrey. 2004. Chelation of cellular calcium modulates hypoxia-inducible gene expression through activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem.* 279:44976-86.

## Bibliografía

- Bernhardt, W.M., C. Warnecke, C. Willam, T. Tanaka, M.S. Wiesener, y K.U. Eckardt. 2007. Organ protection by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Methods Enzymol.* 435:221-45.
- Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, y G.J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363-6.
- Berra, E., E. Benizri, A. Ginouves, V. Volmat, D. Roux, y J. Pouyssegur. 2003. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *Embo J.* 22:4082-90.
- Birnbaum, Y., y R.A. Kloner. 1996. Myocardial viability. *West J Med.* 165:364-71.
- Blondel, B., I. Roijen, y J.P. Cheneval. 1971. Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia.* 27:356-8.
- Bolli, R. 1992. Myocardial 'stunning' in man. *Circulation.* 86:1671-91.
- Bolli, R. 2000. The late phase of preconditioning. *Circ Res.* 87:972-83.
- Bolli, R., K. Shinmura, X.L. Tang, E. Kodani, Y.T. Xuan, Y. Guo, y B. Dawn. 2002. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc Res.* 55:506-19.
- Brayden, J.E., y M.T. Nelson. 1992. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science.* 256:532-5.
- Brenner, R., T.J. Jegla, A. Wickenden, Y. Liu, y R.W. Aldrich. 2000. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel  $\beta$  subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem.* 275:6453-61.
- Brunelle, J.K., E.L. Bell, N.M. Quesada, K. Vercauteren, V. Tiranti, M. Zeviani, R.C. Scarpulla, y N.S. Chandel. 2005. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 1:409-14.
- Brusselmans, K., F. Bono, P. Maxwell, Y. Dor, M. Dewerchin, D. Collen, J.M. Herbert, y P. Carmeliet. 2001. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem.* 276:39192-6.
- Budev, M.M., A.C. Arroliga, H.P. Wiedemann, y R.A. Matthay. 2003. Cor pulmonale: an overview. *Semin Respir Crit Care Med.* 24:233-44.
- Bunn, H.F., y R.O. Poyton. 1996. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* 76:839-85.
- Cai, Z., D.J. Manalo, G. Wei, E.R. Rodriguez, K. Fox-Talbot, H. Lu, J.L. Zweier, y G.L. Semenza. 2003. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or

- erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 108:79-85.
- Cai, Z., H. Zhong, M. Bosch-Marce, K. Fox-Talbot, L. Wang, C. Wei, M.A. Trush, y G.L. Semenza. 2008. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 $\alpha$ . *Cardiovasc Res*. 77:463-70.
- Cain, B.S., D.R. Meldrum, X. Meng, B.D. Shames, A. Banerjee, y A.H. Harken. 1998. Calcium preconditioning in human myocardium. *Ann Thorac Surg*. 65:1065-70.
- Cancherini, D.V., B.B. Queliconi, y A.J. Kowaltowski. 2007. Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel activity in isolated heart mitochondria. *Cardiovasc Res*. 73:720-8.
- Cao, C.M., Q. Xia, Q. Gao, M. Chen, y T.M. Wong. 2005. Calcium-activated potassium channel triggers cardioprotection of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 312:644-50.
- Carmeliet, E. 1999. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev*. 79:917-1017.
- Carmeliet, P., Y. Dor, J.M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C.J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R.K. Jain, D. Collen, y E. Keshert. 1998. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 394:485-90.
- Cave, A.C., y D.J. Hearse. 1992. Ischaemic preconditioning and contractile function: studies with normothermic and hypothermic global ischaemia. *J Mol Cell Cardiol*. 24:1113-23.
- Compernelle, V., K. Brusselmans, T. Acker, P. Hoet, M. Tjwa, H. Beck, S. Plaisance, Y. Dor, E. Keshet, F. Lupu, B. Nemery, M. Dewerchin, P. Van Veldhoven, K. Plate, L. Moons, D. Collen, y P. Carmeliet. 2002. Loss of HIF-2 $\alpha$  and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*. 8:702-10.
- Conforti, L., y D.E. Millhorn. 1997. Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in rat PC12 cells by hypoxia. *J Physiol*. 502 (Pt 2):293-305.
- Conrad, C.H., R.G. Mark, y O.H. Bing. 1983. Outward current and repolarization in hypoxic rat myocardium. *Am J Physiol*. 244:H341-50.
- Cox, D.H., y R.W. Aldrich. 2000. Role of the  $\beta_1$  subunit in large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity. *J Gen Physiol*. 116:411-32.

## Bibliografía

- Crawford, R.M., S. Jovanovic, G.R. Budas, A.M. Davies, H. Lad, R.H. Wenger, K.A. Robertson, D.J. Roy, H.J. Ranki, y A. Jovanovic. 2003. Chronic mild hypoxia protects heart-derived H9c2 cells against acute hypoxia/reoxygenation by regulating expression of the SUR2A subunit of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem.* 278:31444-55.
- da Silva, R., T. Grampp, T. Pasch, M.C. Schaub, y M. Zaugg. 2004. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology.* 100:59-69.
- Dann, C.E., 3rd, R.K. Bruick, y J. Deisenhofer. 2002. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15351-6.
- Date, T., S. Mochizuki, A.J. Belanger, M. Yamakawa, Z. Luo, K.A. Vincent, S.H. Cheng, R.J. Gregory, y C. Jiang. 2005. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288:C314-20.
- Dawn, B., y R. Bolli. 2005. HO-1 induction by HIF-1: a new mechanism for delayed cardioprotection? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H522-4.
- Debska, G., A. Kicinska, J. Dobrucki, B. Dworakowska, E. Nurowska, J. Skalska, K. Dolowy, y A. Szewczyk. 2003. Large-conductance K<sup>+</sup> channel openers NS1619 and NS004 as inhibitors of mitochondrial function in glioma cells. *Biochem Pharmacol.* 65:1827-34.
- Del Toro, R., K.L. Levitsky, J. Lopez-Barneo, y M.D. Chiara. 2003. Induction of T-type calcium channel gene expression by chronic hypoxia. *J Biol Chem.* 278:22316-24.
- Delpiano, M.A., y J. Hescheler. 1989. Evidence for a PO<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channel in the type-I cell of the rabbit carotid body. *FEBS Lett.* 249:195-8.
- Depre, C., S.J. Kim, A.S. John, Y. Huang, O.E. Rimoldi, J.R. Pepper, G.D. Dreyfus, V. Gaussin, D.J. Pennell, D.E. Vatner, P.G. Camici, y S.F. Vatner. 2004. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium. *Circ Res.* 95:433-40.
- Deutsch, N., y J.N. Weiss. 1993. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel modification by metabolic inhibition in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 465:163-79.
- Diaz, R.J., y G.J. Wilson. 2006. Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models. *Cardiovasc Res.* 70:286-96.
- Douglas, R.M., J.C. Lai, S. Bian, L. Cummins, E. Moczydlowski, y G.G. Haddad. 2006. The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is

- present in the inner mitochondrial membrane of rat brain. *Neuroscience*. 139:1249-61.
- Ebert, B.L., y H.F. Bunn. 1998. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol*. 18:4089-96.
- Eckle, T., D. Kohler, R. Lehmann, K. El Kasmi, y H.K. Eltzschig. 2008. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation*. 118:166-75.
- Eisen, A., E.Z. Fisman, M. Rubenfire, D. Freimark, R. McKechnie, A. Tenenbaum, M. Motro, y Y. Adler. 2004. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis*. 172:201-10.
- Eltzschig, H.K., P. Abdulla, E. Hoffman, K.E. Hamilton, D. Daniels, C. Schonfeld, M. Loffler, G. Reyes, M. Duszenko, J. Karhausen, A. Robinson, K.A. Westerman, I.R. Coe, y S.P. Colgan. 2005. HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. *J Exp Med*. 202:1493-505.
- Ema, M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger, y Y. Fujii-Kuriyama. 1999. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 $\alpha$  in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J*. 18:1905-14.
- Ema, M., S. Taya, N. Yokotani, K. Sogawa, Y. Matsuda, y Y. Fujii-Kuriyama. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4273-8.
- Essop, M.F. 2007. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol*. 584:715-26.
- Fearon, I.M., y S.T. Brown. 2004. Acute and chronic hypoxic regulation of recombinant hNa<sub>v</sub>1.5  $\alpha$  subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 324:1289-95.
- Fernandez-Fernandez, J.M., M. Tomas, E. Vazquez, P. Orio, R. Latorre, M. Senti, J. Marrugat, y M.A. Valverde. 2004. Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *J Clin Invest*. 113:1032-9.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, y C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-11.

## Bibliografía

- Fischbach, P.S., A. White, T.D. Barrett, y B.R. Lucchesi. 2004. Risk of ventricular proarrhythmia with selective opening of the myocardial sarcolemmal versus mitochondrial ATP-gated potassium channel. *J Pharmacol Exp Ther.* 309:554-9.
- Flamme, I., T. Frohlich, M. von Reutern, A. Kappel, A. Damert, y W. Risau. 1997. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev.* 63:51-60.
- Flitter, W.D. 1993. Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br Med Bull.* 49:545-55.
- Forsythe, J.A., B.H. Jiang, N.V. Iyer, F. Agani, S.W. Leung, R.D. Koos, y G.L. Semenza. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 16:4604-13.
- Franco-Obregon, A., y J. Lopez-Barneo. 1996. Low PO<sub>2</sub> inhibits calcium channel activity in arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 271:H2290-9.
- Franco-Obregon, A., J. Urena, y J. Lopez-Barneo. 1995. Oxygen-sensitive calcium channels in vascular smooth muscle and their possible role in hypoxic arterial relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4715-9.
- Fryer, R.M., A.K. Hsu, J.T. Eells, H. Nagase, y G.J. Gross. 1999. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels. *Circ Res.* 84:846-51.
- Fu, X.W., C.A. Nurse, Y.T. Wang, y E. Cutz. 1999. Selective modulation of membrane currents by hypoxia in intact airway chemoreceptors from neonatal rabbit. *J Physiol.* 514 (Pt 1):139-50.
- Ganformina, M.D., y J. Lopez-Barneo. 1991. Single K<sup>+</sup> channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2927-30.
- Garlid, K.D., y P. Paucek. 2003. Mitochondrial potassium transport: the K<sup>+</sup> cycle. *Biochim Biophys Acta.* 1606:23-41.
- Gebremedhin, D., P. Bonnet, A.S. Greene, S.K. England, N.J. Rusch, J.H. Lombard, y D.R. Harder. 1994. Hypoxia increases the activity of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in cat cerebral arterial muscle cell membranes. *Pflugers Arch.* 428:621-30.
- Goldberg, M.A., y T.J. Schneider. 1994. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem.* 269:4355-9.
- Graier, W.F., M. Frieden, y R. Malli. 2007. Mitochondria and Ca<sup>2+</sup> signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch.* 455:375-96.

- Greenwood, I.A., L.J. Miller, S. Ohya, y B. Horowitz. 2002. The large conductance potassium channel  $\beta$ -subunit can interact with and modulate the functional properties of a calcium-activated chloride channel, CLCA1. *J Biol Chem.* 277:22119-22.
- Grifka, R.G. 1999. Cyanotic congenital heart disease with increased pulmonary blood flow. *Pediatr Clin North Am.* 46:405-25.
- Grover, G.J., y K.D. Garlid. 2000. ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol.* 32:677-95.
- Gruber, M., C.J. Hu, R.S. Johnson, E.J. Brown, B. Keith, y M.C. Simon. 2007. Acute postnatal ablation of Hif-2 $\alpha$  results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:2301-6.
- Guo, Y., W.K. Jones, Y.T. Xuan, X.L. Tang, W. Bao, W.J. Wu, H. Han, V.E. Laubach, P. Ping, Z. Yang, Y. Qiu, y R. Bolli. 1999. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11507-12.
- Guzy, R.D., B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. Liu, K.D. Mansfield, M.C. Simon, U. Hammerling, y P.T. Schumacker. 2005. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 1:401-8.
- Ha, T.S., M.S. Heo, y C.S. Park. 2004. Functional effects of auxiliary  $\beta_4$ -subunit on rat large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. *Biophys J.* 86:2871-82.
- Haddad, G.G., y C. Jiang. 1993. O<sub>2</sub> deprivation in the central nervous system: on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Prog Neurobiol.* 40:277-318.
- Halestrap, A.P. 1999. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp.* 66:181-203.
- Halestrap, A.P., S.J. Clarke, y I. Khaliulin. 2007. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta.* 1767:1007-31.
- Hammarstrom, A.K., y P.W. Gage. 2002. Hypoxia and persistent sodium current. *Eur Biophys J.* 31:323-30.
- Hanouz, J.L., A. Yvon, M. Massetti, O. Lepage, G. Babatasi, A. Khayat, H. Bricard, y J.L. Gerard. 2002. Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria *in vitro*. *Anesthesiology.* 97:33-41.
- Hartness, M.E., S.P. Brazier, C. Peers, A.N. Bateson, M.L. Ashford, y P.J. Kemp. 2003. Post-transcriptional control of human maxi-K potassium channel activity and acute oxygen sensitivity by chronic hypoxia. *J Biol Chem.* 278:51422-32.

## Bibliografía

- Hashimoto, T., R. Hussien, S. Oommen, K. Gohil, y G.A. Brooks. 2007. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *Faseb J.* 21:2602-12.
- Heusch, G., R. Schulz, y S.H. Rahimtoola. 2005. Myocardial hibernation: a delicate balance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H984-99.
- Hewitson, K.S., L.A. McNeill, M.V. Riordan, Y.M. Tian, A.N. Bullock, R.W. Welford, J.M. Elkins, N.J. Oldham, S. Bhattacharya, J.M. Gleadle, P.J. Ratcliffe, C.W. Pugh, y C.J. Schofield. 2002. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem.* 277:26351-5.
- Hoffman, E.C., H. Reyes, F.F. Chu, F. Sander, L.H. Conley, B.A. Brooks, y O. Hankinson. 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science.* 252:954-8.
- Holmuhamedov, E.L., S. Jovanovic, P.P. Dzeja, A. Jovanovic, y A. Terzic. 1998. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol.* 275:H1567-76.
- Honda, H.M., P. Korge, y J.N. Weiss. 2005. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci.* 1047:248-58.
- Hu, C.J., L.Y. Wang, L.A. Chodosh, B. Keith, y M.C. Simon. 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 23:9361-74.
- Hurtado, A. 1960. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med.* 53:247-58.
- Huss, J.M., F.H. Levy, y D.P. Kelly. 2001. Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes: a mechanism for O<sub>2</sub>-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 276:27605-12.
- Ikonomidis, J.S., L.C. Tumati, R.D. Weisel, D.A. Mickle, y R.K. Li. 1994. Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia. *Cardiovasc Res.* 28:1285-91.
- Ivan, M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J.M. Asara, W.S. Lane, y W.G. Kaelin, Jr. 2001. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* 292:464-8.
- Iyer, N.V., L.E. Kotch, F. Agani, S.W. Leung, E. Laughner, R.H. Wenger, M. Gassmann, J.D. Gearhart, A.M. Lawler, A.Y. Yu, y G.L. Semenza. 1998. Cellular and

- developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev.* 12:149-62.
- Jaakkola, P., D.R. Mole, Y.M. Tian, M.I. Wilson, J. Gielbert, S.J. Gaskell, A. Kriegsheim, H.F. Hebestreit, M. Mukherji, C.J. Schofield, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, y P.J. Ratcliffe. 2001. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 292:468-72.
- Jain, S., E. Maltepe, M.M. Lu, C. Simon, y C.A. Bradfield. 1998. Expression of ARNT, ARNT2, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev.* 73:117-23.
- Jennings, R.B., y K.A. Reimer. 1991. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 42:225-46.
- Jennings, R.B., H.M. Sommers, G.A. Smyth, H.A. Flack, y H. Linn. 1960. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 70:68-78.
- Jiang, H., R. Guo, y J.A. Powell-Coffman. 2001. The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7916-21.
- Jiang, Z., M. Wallner, P. Meera, y L. Toro. 1999. Human and rodent Maxi-K channel  $\beta$ -subunit genes: cloning and characterization. *Genomics.* 55:57-67.
- Johnson, B.S., B.A. Brooks, H. Reyes, E.C. Hoffman, y O. Hankinson. 1992. An MspI RFLP in the human ARNT gene, encoding a subunit of the nuclear form of the Ah (dioxin) receptor. *Hum Mol Genet.* 1:351.
- Ju, Y.K., D.A. Saint, y P.W. Gage. 1996. Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 497 (Pt 2):337-47.
- Jurgensen, J.S., C. Rosenberger, M.S. Wiesener, C. Warnecke, J.H. Horstrup, M. Grafe, S. Philipp, W. Griethe, P.H. Maxwell, U. Frei, S. Bachmann, R. Willenbrock, y K.U. Eckardt. 2004. Persistent induction of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *Faseb J.* 18:1415-7.
- Kaelin, W.G., Jr. 2005. ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metab.* 1:357-8.
- Kietzmann, T., A. Krones-Herzig, y K. Jungermann. 2002. Signaling cross-talk between hypoxia and glucose via hypoxia-inducible factor 1 and glucose response elements. *Biochem Pharmacol.* 64:903-11.
- Kim, J.S., L. He, y J.J. Lemasters. 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 304:463-70.
- Kimura, H., A. Weisz, Y. Kurashima, K. Hashimoto, T. Ogura, F. D'Acquisto, R. Addeo, M. Makuuchi, y H. Esumi. 2000. Hypoxia response element of the human

- vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*. 95:189-97.
- Kojima, I., T. Tanaka, R. Inagi, H. Kato, T. Yamashita, A. Sakiyama, O. Ohneda, N. Takeda, M. Sata, T. Miyata, T. Fujita, y M. Nangaku. 2007. Protective role of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 18:1218-26.
- Kolar, F., y B. Ostadal. 2004. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res*. 53 Suppl 1:S3-13.
- Kong, X., J.S. Tweddell, G.J. Gross, y J.E. Baker. 2001. Sarcolemmal and mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels mediate cardioprotection in chronically hypoxic hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 33:1041-5.
- Kopecky, M., y S. Daum. 1958. [Adaptation of the myocardium to altitude anoxia.]. *Cesk Fysiol*. 7:218-9.
- Laderoute, K.R., J.M. Calaoagan, C. Gustafson-Brown, A.M. Knapp, G.C. Li, H.L. Mendonca, H.E. Ryan, Z. Wang, y R.S. Johnson. 2002. The response of c-jun/AP-1 to chronic hypoxia is hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  dependent. *Mol Cell Biol*. 22:2515-23.
- Lai, I.R., M.C. Ma, C.F. Chen, y K.J. Chang. 2004. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. *Transplantation*. 77:1004-8.
- Lamping, K.A., y G.J. Gross. 1985. Improved recovery of myocardial segment function following a short coronary occlusion in dogs by nicorandil, a potential new antianginal agent, and nifedipine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 7:158-66.
- Lando, D., D.J. Peet, J.J. Gorman, D.A. Whelan, M.L. Whitelaw, y R.K. Bruick. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 16:1466-71.
- Langer, P., S. Grunder, y A. Rusch. 2003. Expression of Ca<sup>2+</sup>-activated BK channel mRNA and its splice variants in the rat cochlea. *J Comp Neurol*. 455:198-209.
- Lasley, R.D., G.M. Anderson, y R.M. Mentzer, Jr. 1993. Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart. *Cardiovasc Res*. 27:565-70.
- Lee, P.J., B.H. Jiang, B.Y. Chin, N.V. Iyer, J. Alam, G.L. Semenza, y A.M. Choi. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem*. 272:5375-81.

- Lemasters, J.J., J.M. Bond, E. Chacon, I.S. Harper, S.H. Kaplan, H. Ohata, D.R. Trollinger, B. Herman, y W.E. Cascio. 1996. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *Exs.* 76:99-114.
- Lemasters, J.J., A.L. Nieminen, T. Qian, L.C. Trost, S.P. Elmore, Y. Nishimura, R.A. Crowe, W.E. Cascio, C.A. Bradham, D.A. Brenner, y B. Herman. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1366:177-96.
- Li, G.C., J.A. Vasquez, K.P. Gallagher, y B.R. Lucchesi. 1990. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation.* 82:609-19.
- Lippiat, J.D., N.B. Standen, I.D. Harrow, S.C. Phillips, y N.W. Davies. 2003. Properties of BK<sub>Ca</sub> channels formed by bicistronic expression of hSlo $\alpha$  and  $\beta$ 1-4 subunits in HEK293 cells. *J Membr Biol.* 192:141-8.
- Liu, G.S., J. Thornton, D.M. Van Winkle, A.W. Stanley, R.A. Olsson, y J.M. Downey. 1991. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 84:350-6.
- Liu, Q., U. Moller, D. Flugel, y T. Kietzmann. 2004. Induction of plasminogen activator inhibitor I gene expression by intracellular calcium via hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 104:3993-4001.
- Liu, X., X. Wu, L. Cai, C. Tang, y J. Su. 2003. Hypoxic preconditioning of cardiomyocytes and cardioprotection: phosphorylation of HIF-1 $\alpha$  induced by p42/p44 mitogen-activated protein kinases is involved. *Pathophysiology.* 9:201-205.
- Liu, Y., y J.M. Downey. 1992. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol.* 263:H1107-12.
- Liu, Y., T. Sato, B. O'Rourke, y E. Marban. 1998. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* 97:2463-9.
- Loor, G., y P.T. Schumacker. 2008. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell Death Differ.* 15:686-90.
- Lopez-Barneo, J., R. del Toro, K.L. Levitsky, M.D. Chiara, y P. Ortega-Saenz. 2004. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl Physiol.* 96:1187-95; discussion 1170-2.
- Lopez-Barneo, J., J.R. Lopez-Lopez, J. Urena, y C. Gonzalez. 1988. Chemotransduction in the carotid body: K<sup>+</sup> current modulated by PO<sub>2</sub> in type I chemoreceptor cells. *Science.* 241:580-2.
- Lopez-Barneo, J., R. Pardal, y P. Ortega-Saenz. 2001. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol.* 63:259-87.
- Lucas, D.T., y L.I. Szweda. 1998. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:510-4.

## Bibliografía

- Mahon, P.C., K. Hirota, y G.L. Semenza. 2001. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 15:2675-86.
- Makino, Y., R. Cao, K. Svensson, G. Bertilsson, M. Asman, H. Tanaka, Y. Cao, A. Berkenstam, y L. Poellinger. 2001. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature.* 414:550-4.
- Manalo, D.J., A. Rowan, T. Lavoie, L. Natarajan, B.D. Kelly, S.Q. Ye, J.G. Garcia, y G.L. Semenza. 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* 105:659-69.
- Mansfield, K.D., R.D. Guzy, Y. Pan, R.M. Young, T.P. Cash, P.T. Schumacker, y M.C. Simon. 2005. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation. *Cell Metab.* 1:393-9.
- Mattheussen, M., B.F. Rusy, H. Van Aken, y W. Flameng. 1993. Recovery of function and adenosine triphosphate metabolism following myocardial ischemia induced in the presence of volatile anesthetics. *Anesth Analg.* 76:69-75.
- Maxwell, P.H., M.S. Wiesener, G.W. Chang, S.C. Clifford, E.C. Vaux, M.E. Cockman, C.C. Wykoff, C.W. Pugh, E.R. Maher, y P.J. Ratcliffe. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 399:271-5.
- Maynard, M.A., H. Qi, J. Chung, E.H. Lee, Y. Kondo, S. Hara, R.C. Conaway, J.W. Conaway, y M. Ohh. 2003. Multiple splice variants of the human HIF-3 $\alpha$  locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem.* 278:11032-40.
- Meera, P., M. Wallner, y L. Toro. 2000. A neuronal  $\beta$  subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5562-7.
- Meerson, F.Z., O.A. Gomzakov, y M.V. Shimkovich. 1973. Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol.* 31:30-4.
- Meerson, F.Z., E.E. Ustinova, y E.H. Orlova. 1987. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Clin Cardiol.* 10:783-9.
- Meugnier, E., S. Rome, y H. Vidal. 2007. Regulation of gene expression by glucose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 10:518-22.

- Michiels, C. 2004. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol.* 164:1875-82.
- Miura, T., T. Ogawa, T. Iwamoto, K. Shimamoto, y O. Iimura. 1992. Dipyridamole potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning. *Circulation.* 86:979-85.
- Montoro, R.J., J. Urena, R. Fernandez-Chacon, G. Alvarez de Toledo, y J. Lopez-Barneo. 1996. Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol.* 107:133-143.
- Morita, T., M.A. Perrella, M.E. Lee, y S. Kourembanas. 1995. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:1475-9.
- Morote-Garcia, J.C., P. Rosenberger, J. Kuhlicke, y H.K. Eltzschig. 2008. HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. *Blood.* 111:5571-80.
- Mortimer, E.A., Jr., R.R. Monson, y B. MacMahon. 1977. Reduction in mortality from coronary heart disease in men residing at high altitude. *N Engl J Med.* 296:581-5.
- Murry, C.E., R.B. Jennings, y K.A. Reimer. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74:1124-36.
- Narravula, S., y S.P. Colgan. 2001. Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  expression during hypoxia. *J Immunol.* 166:7543-8.
- Natarajan, R., F.N. Salloum, B.J. Fisher, R.C. Kukreja, y A.A. Fowler, 3rd. 2006. Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res.* 98:133-40.
- Natarajan, R., F.N. Salloum, B.J. Fisher, E.D. Ownby, R.C. Kukreja, y A.A. Fowler, 3rd. 2007. Activation of hypoxia-inducible factor-1 via prolyl-4 hydroxylase-2 gene silencing attenuates acute inflammatory responses in postischemic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H1571-80.
- Navarro-Antolin, J., K.L. Levitsky, E. Calderon, A. Ordonez, y J. Lopez-Barneo. 2005. Decreased expression of maxi-K<sup>+</sup> channel  $\beta_1$ -subunit and altered vasoregulation in hypoxia. *Circulation.* 112:1309-15.
- Neckar, J., O. Szarszoi, L. Kotten, F. Papousek, B. Ost'adal, G.J. Grover, y F. Kolar. 2002. Effects of mitochondrial K<sub>ATP</sub> modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res.* 55:567-75.
- Ngumbela, K.C., M.N. Sack, y M.F. Essop. 2003. Counter-regulatory effects of incremental hypoxia on the transcription of a cardiac fatty acid oxidation enzyme-encoding gene. *Mol Cell Biochem.* 250:151-8.

## Bibliografía

- Noma, A. 1983. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature*. 305:147-8.
- O'Rourke, J.F., Y.M. Tian, P.J. Ratcliffe, y C.W. Pugh. 1999. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*. 274:2060-71.
- Ohya, S., Y. Kuwata, K. Sakamoto, K. Muraki, y Y. Imaizumi. 2005. Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289:H1635-42.
- Oktaç, Y., E. Dioum, S. Matsuzaki, K. Ding, L.J. Yan, R.G. Haller, L.I. Szewda, y J.A. Garcia. 2007. Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates expression of the mitochondrial aconitase chaperone protein frataxin. *J Biol Chem*. 282:11750-6.
- Opie, L.H. 1990. Myocardial ischemia--metabolic pathways and implications of increased glycolysis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 4 Suppl 4:777-90.
- Orio, P., P. Rojas, G. Ferreira, y R. Latorre. 2002. New disguises for an old channel: Maxi-K channel  $\beta$ -subunits. *News Physiol Sci*. 17:156-61.
- Ostadal, B., I. Ostadalova, y N.S. Dhalla. 1999. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev*. 79:635-59.
- Panchenko, M.V., H.W. Farber, y J.H. Korn. 2000. Induction of heme oxygenase-1 by hypoxia and free radicals in human dermal fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278:C92-C101.
- Papandreou, I., R.A. Cairns, L. Fontana, A.L. Lim, y N.C. Denko. 2006. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 3:187-97.
- Pardal, R., U. Ludewig, J. Garcia-Hirschfeld, y J. Lopez-Barneo. 2000. Secretory responses of intact glomus cells in thin slices of rat carotid body to hypoxia and tetraethylammonium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:2361-6.
- Peng, J., L. Zhang, L. Drysdale, y G.H. Fong. 2000. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:8386-91.
- Piao, L., J. Li, M. McLerie, y A.N. Lopatin. 2007. Cardiac IK1 underlies early action potential shortening during hypoxia in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 43:27-38.
- Piper, H.M., Y. Abdallah, y C. Schafer. 2004. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 61:365-71.

- Pluger, S., J. Faulhaber, M. Furstenau, M. Lohn, R. Waldschutz, M. Gollasch, H. Haller, F.C. Luft, H. Ehmke, y O. Pongs. 2000. Mice with disrupted BK channel  $\beta_1$  subunit gene feature abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res.* 87:E53-60.
- Polinger, I.S. 1970. Separation of cell types in embryonic heart cell cultures. *Exp Cell Res.* 63:78-82.
- Poupa, O., K. Krofta, J. Prochazka, y Z. Turek. 1966. Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc.* 25:1243-6.
- Rahimtoola, S.H. 1985. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation.* 72:V123-35.
- Rahimtoola, S.H. 1989. The hibernating myocardium. *Am Heart J.* 117:211-21.
- Ralph, G.S., S. Parham, S.R. Lee, G.L. Beard, M.H. Craigon, N. Ward, J.R. White, R.D. Barber, W. Rayner, S.M. Kingsman, C.R. Mundy, N.D. Mazarakis, y D. Krige. 2004. Identification of potential stroke targets by lentiviral vector mediated overexpression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in a primary neuronal model of hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24:245-58.
- Ramanathan, K., T.H. Michael, G.J. Jiang, H. Hiel, y P.A. Fuchs. 1999. A molecular mechanism for electrical tuning of cochlear hair cells. *Science.* 283:215-7.
- Ratcliffe, P.J. 2007. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest.* 117:862-5.
- Razeghi, P., M.E. Young, S. Abbasi, y H. Taegtmeyer. 2001. Hypoxia *in vivo* decreases peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -regulated gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 287:5-10.
- Rizvi, A., X.L. Tang, Y. Qiu, Y.T. Xuan, H. Takano, A.K. Jadoon, y R. Bolli. 1999. Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning. *Am J Physiol.* 277:H874-84.
- Robitaille, R., M.L. Garcia, G.J. Kaczorowski, y M.P. Charlton. 1993. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron.* 11:645-55.
- Roscoe, A.K., J.D. Christensen, y C. Lynch, 3rd. 2000. Isoflurane, but not halothane, induces protection of human myocardium via adenosine A1 receptors and adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology.* 92:1692-701.

## Bibliografía

- Ruiz-Ceretti, E., P. Ragault, N. Leblanc, y A.Z. Ponce Zumino. 1983. Effects of hypoxia and altered K<sup>0</sup> on the membrane potential of rabbit ventricle. *J Mol Cell Cardiol.* 15:845-54.
- Ruiz-Petrich, E., F. de Lorenzi, y D. Chartier. 1991. Role of the inward rectifier IK1 in the myocardial response to hypoxia. *Cardiovasc Res.* 25:17-26.
- Ryan, H.E., J. Lo, y R.S. Johnson. 1998. HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J.* 17:3005-15.
- Salnikow, K., T. Kluz, M. Costa, D. Piquemal, Z.N. Demidenko, K. Xie, y M.V. Blagosklonny. 2002. The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Mol Cell Biol.* 22:1734-41.
- Sato, T., T. Saito, N. Saegusa, y H. Nakaya. 2005. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation.* 111:198-203.
- Schott, R.J., S. Rohmann, E.R. Braun, y W. Schaper. 1990. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 66:1133-42.
- Scortegagna, M., K. Ding, Y. Oktay, A. Gaur, F. Thurmond, L.J. Yan, B.T. Marck, A.M. Matsumoto, J.M. Shelton, J.A. Richardson, M.J. Bennett, y J.A. Garcia. 2003a. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1<sup>-/-</sup> mice. *Nat Genet.* 35:331-40.
- Scortegagna, M., K. Ding, Q. Zhang, Y. Oktay, M.J. Bennett, M. Bennett, J.M. Shelton, J.A. Richardson, O. Moe, y J.A. Garcia. 2005. HIF-2 $\alpha$  regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood.* 105:3133-40.
- Scortegagna, M., M.A. Morris, Y. Oktay, M. Bennett, y J.A. Garcia. 2003b. The HIF family member EPAS1/HIF-2 $\alpha$  is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood.* 102:1634-40.
- Semenza, G.L. 1999a. Perspectives on oxygen sensing. *Cell.* 98:281-4.
- Semenza, G.L. 1999b. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:551-78.
- Semenza, G.L. 2004. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* 19:176-82.
- Semenza, G.L., M.K. Nejfelt, S.M. Chi, y S.E. Antonarakis. 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5680-4.

- Shi, Y., M.T. Jiang, J. Su, W. Hutchins, E. Konorev, y J.E. Baker. 2007. Mitochondrial big conductance  $K_{Ca}$  channel and cardioprotection in infant rabbit heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 50:497-502.
- Shiki, K., y D.J. Hearse. 1987. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol.* 253:H1470-6.
- Shipston, M.J. 2001. Alternative splicing of potassium channels: a dynamic switch of cellular excitability. *Trends Cell Biol.* 11:353-8.
- Shizukuda, Y., R.T. Mallet, S.C. Lee, y H.F. Downey. 1992. Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. *Cardiovasc Res.* 26:534-42.
- Shohet, R.V., y J.A. Garcia. 2007. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med.* 85:1309-15.
- Siemen, D., C. Loupatatzis, J. Borecky, E. Gulbins, y F. Lang. 1999.  $Ca^{2+}$ -activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 257:549-54.
- Silverman, H.S., S. Wei, M.C. Haigney, C.J. Ocampo, y M.D. Stern. 1997. Myocyte adaptation to chronic hypoxia and development of tolerance to subsequent acute severe hypoxia. *Circ Res.* 80:699-707.
- Solaini, G., y D.A. Harris. 2005. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J.* 390:377-94.
- Sommers, H.M., y R.B. Jennings. 1964. Experimental Acute Myocardial Infarction; Histologic And Histochemical Studies Of Early Myocardial Infarcts Induced By Temporary Or Permanent Occlusion Of A Coronary Artery. *Lab Invest.* 13:1491-503.
- Stowe, D.F., M. Aldakkak, A.K. Camara, M.L. Riess, A. Heinen, S.G. Varadarajan, y M.T. Jiang. 2006. Cardiac mitochondrial preconditioning by Big  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$  channel opening requires superoxide radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290:H434-40.
- Sumeray, M.S., y D.M. Yellon. 1998. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium. *Basic Res Cardiol.* 93:384-90.
- Tajima, M., D. Katayose, M. Bessho, y S. Isoyama. 1994. Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia. *Cardiovasc Res.* 28:312-9.
- Talks, K.L., H. Turley, K.C. Gatter, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, y A.L. Harris. 2000. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$ .

## Bibliografía

- and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 157:411-21.
- Tanaka, K., D. Weihrauch, L.M. Ludwig, J.R. Kersten, P.S. Pagel, y D.C. Warltier. 2003. Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology.* 98:935-43.
- Tanaka, Y., K. Koike, A. Alioua, K. Shigenobu, E. Stefani, y L. Toro. 2004.  $\beta_1$ -subunit of Maxi-K channel in smooth muscle: a key molecule which tunes muscle mechanical activity. *J Pharmacol Sci.* 94:339-47.
- Tian, H., R.E. Hammer, A.M. Matsumoto, D.W. Russell, y S.L. McKnight. 1998. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 12:3320-4.
- Tian, H., S.L. McKnight, y D.W. Russell. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11:72-82.
- Toller, W.G., E.R. Gross, J.R. Kersten, P.S. Pagel, G.J. Gross, y D.C. Warltier. 2000. Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology.* 92:1731-9.
- Toller, W.G., J.R. Kersten, P.S. Pagel, D.A. Hettrick, y D.C. Warltier. 1999. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology.* 91:1437-46.
- Tseng-Crank, J., N. Godinot, T.E. Johansen, P.K. Ahring, D. Strobaek, R. Mertz, C.D. Foster, S.P. Olesen, y P.H. Reinhart. 1996. Cloning, expression, and distribution of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel  $\beta$ -subunit from human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:9200-5.
- Turek, Z., K. Kubat, B.E. Ringnalda, y F. Kreuzer. 1980. Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude. *Basic Res Cardiol.* 75:544-54.
- Uebele, V.N., A. Lagrutta, T. Wade, D.J. Figueroa, Y. Liu, E. McKenna, C.P. Austin, P.B. Bennett, y R. Swanson. 2000. Cloning and functional expression of two families of  $\beta$ -subunits of the large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem.* 275:23211-8.

- Uecker, M., R. Da Silva, T. Grampp, T. Pasch, M.C. Schaub, y M. Zaugg. 2003. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology*. 99:138-47.
- Urena, J., A. Franco-Obregon, y J. Lopez-Barneo. 1996. Contrasting effects of hypoxia on cytosolic  $Ca^{2+}$  spikes in conduit and resistance myocytes of the rabbit pulmonary artery. *J Physiol*. 496 (Pt 1):103-9.
- Vahlhaus, C., R. Schulz, H. Post, J. Rose, y G. Heusch. 1998. Prevention of ischemic preconditioning only by combined inhibition of protein kinase C and protein tyrosine kinase in pigs. *J Mol Cell Cardiol*. 30:197-209.
- Valverde, M.A., P. Rojas, J. Amigo, D. Cosmelli, P. Orio, M.I. Bahamonde, G.E. Mann, C. Vergara, y R. Latorre. 1999. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit. *Science*. 285:1929-31.
- Vander Heide, R.S., D. Rim, C.M. Hohl, y C.E. Ganote. 1990. An *in vitro* model of myocardial ischemia utilizing isolated adult rat myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 22:165-81.
- Vleugels, A., J. Vereecke, y E. Carmeliet. 1980. Ionic currents during hypoxia in voltage-clamped cat ventricular muscle. *Circ Res*. 47:501-8.
- Voors, A.W., y W.D. Johnson. 1979. Altitude and arteriosclerotic heart disease mortality in white residents of 99 of the 100 largest cities in the United States. *J Chronic Dis*. 32:157-62.
- Wallner, M., P. Meera, y L. Toro. 1999. Molecular basis of fast inactivation in voltage and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels: a transmembrane  $\beta$ -subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:4137-42.
- Wang, G.L., y G.L. Semenza. 1993. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*. 82:3610-5.
- Wang, G.L., y G.L. Semenza. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 270:1230-7.
- Wang, J., M. Juhaszova, L.J. Rubin, y X.J. Yuan. 1997. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated  $K^+$  channel  $\alpha$  subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 100:2347-53.
- Wang, J., L. Weigand, W. Lu, J.T. Sylvester, G.L. Semenza, y L.A. Shimoda. 2006. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular  $Ca^{2+}$  in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res*. 98:1528-37.

## Bibliografía

- Wang, J., L. Weigand, W. Wang, J.T. Sylvester, y L.A. Shimoda. 2005. Chronic hypoxia inhibits Kv channel gene expression in rat distal pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288:L1049-58.
- Wang, L., G. Cherednichenko, L. Hernandez, J. Halow, S.A. Camacho, V. Figueredo, y S. Schaefer. 2001. Preconditioning limits mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  during ischemia in rat hearts: role of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280:H2321-8.
- Wang, X., P.W. Fisher, L. Xi, y R.C. Kukreja. 2008. Essential role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -activated and ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in sildenafil-induced late cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 44:105-13.
- Wang, Y., E. Kodani, J. Wang, S.X. Zhang, H. Takano, X.L. Tang, y R. Bolli. 2004. Cardioprotection during the final stage of the late phase of ischemic preconditioning is mediated by neuronal NO synthase in concert with cyclooxygenase-2. *Circ Res*. 95:84-91.
- Wartier, D.C., M.H. al-Wathiqui, J.P. Kampine, y W.T. Schmeling. 1988. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology*. 69:552-65.
- Weiger, T.M., M.H. Holmqvist, I.B. Levitan, F.T. Clark, S. Sprague, W.J. Huang, P. Ge, C. Wang, D. Lawson, M.E. Jurman, M.A. Glucksmann, I. Silos-Santiago, P.S. DiStefano, y R. Curtis. 2000. A novel nervous system  $\beta$  subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. *J Neurosci*. 20:3563-70.
- Weir, E.K., y S.L. Archer. 1995. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *Faseb J*. 9:183-9.
- Weiss, J.N., P. Korge, H.M. Honda, y P. Ping. 2003. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res*. 93:292-301.
- Weiss, J.N., N. Venkatesh, y S.T. Lamp. 1992. ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels and cellular  $\text{K}^+$  loss in hypoxic and ischaemic mammalian ventricle. *J Physiol*. 447:649-73.
- Wenger, R.H. 2002. Cellular adaptation to hypoxia:  $\text{O}_2$ -sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and  $\text{O}_2$ -regulated gene expression. *Faseb J*. 16:1151-62.
- Wiesener, M.S., H. Turley, W.E. Allen, C. Willam, K.U. Eckardt, K.L. Talks, S.M. Wood, K.C. Gatter, A.L. Harris, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, y P.H. Maxwell. 1998. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood*. 92:2260-8.
- Wu, H., S.B. Kanatous, F.A. Thurmond, T. Gallardo, E. Isotani, R. Bassel-Duby, y R.S. Williams. 2002. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*. 296:349-52.

- Xia, X.M., J.P. Ding, y C.J. Lingle. 1999. Molecular basis for the inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$ - and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J Neurosci.* 19:5255-64.
- Xia, X.M., J.P. Ding, y C.J. Lingle. 2003. Inactivation of BK channels by the NH<sub>2</sub> terminus of the  $\beta_2$  auxiliary subunit: an essential role of a terminal peptide segment of three hydrophobic residues. *J Gen Physiol.* 121:125-48.
- Xu, F.F., X.H. Liu, y L.R. Cai. 2004. [Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the prevention of cardiomyocyte injury induced by hypoxic preconditioning]. *Sheng Li Xue Bao.* 56:609-14.
- Xu, W., Y. Liu, S. Wang, T. McDonald, J.E. Van Eyk, A. Sidor, y B. O'Rourke. 2002. Cytoprotective role of  $\text{Ca}^{2+}$ - activated  $\text{K}^+$  channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science.* 298:1029-33.
- Yan, S.F., J. Lu, Y.S. Zou, J. Soh-Won, D.M. Cohen, P.M. Buttrick, D.R. Cooper, S.F. Steinberg, N. Mackman, D.J. Pinsky, y D.M. Stern. 1999. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem.* 274:15030-40.
- Yan, S.F., Y.S. Zou, Y. Gao, C. Zhai, N. Mackman, S.L. Lee, J. Milbrandt, D. Pinsky, W. Kisiel, y D. Stern. 1998. Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8298-303.
- Yang, Z.Z., y A.P. Zou. 2001. Transcriptional regulation of heme oxygenases by HIF-1 $\alpha$  in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F900-8.
- Yellon, D.M., y J.M. Downey. 2003. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 83:1113-51.
- Yoshida, T., N. Maulik, Y.S. Ho, J. Alam, y D.K. Das. 2001. H(mox-1) constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: A study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the Heme oxygenase-1 gene. *Circulation.* 103:1695-701.
- Youngson, C., C. Nurse, H. Yeger, y E. Cutz. 1993. Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature.* 365:153-5.
- Zarei, M.M., M. Eghbali, A. Alioua, M. Song, H.G. Knaus, E. Stefani, y L. Toro. 2004. An endoplasmic reticulum trafficking signal prevents surface expression of a voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel splice variant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10072-7.
- Zaugg, M., E. Lucchinetti, D.R. Spahn, T. Pasch, y M.C. Schaub. 2002. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of

## *Bibliografía*

- mitochondrial  $K_{ATP}$  channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology*. 97:4-14.
- Zaugg, M., E. Lucchinetti, M. Uecker, T. Pasch, y M.C. Schaub. 2003. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth*. 91:551-65.
- Zhu, W.Z., Y. Xie, L. Chen, H.T. Yang, y Z.N. Zhou. 2006. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 40:96-106.