

VNIVERSIDAD DE SEVILLA

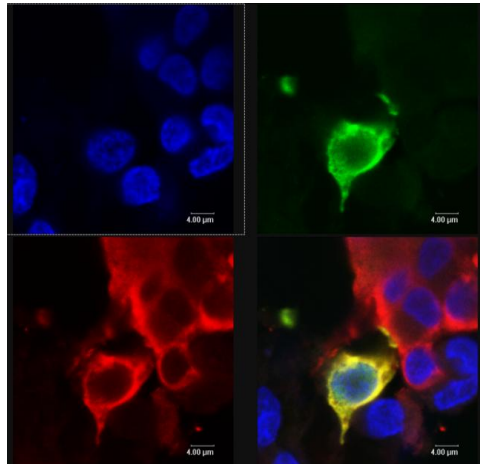
FACULTAD DE MEDICINA

Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica



**PARTICIPACIÓN DE HEMOPROTEÍNAS EN LA FUNCIÓN
QUIMIOSENSORIA DE CÉLULAS NEUROSECRETORAS**

TESIS DOCTORAL



María Teresa Marcos Almaraz

Sevilla, 2011

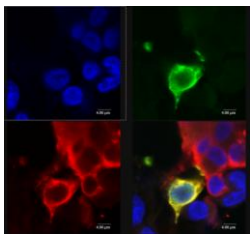


Figura de portada: Imagen por microscopía confocal de una tinción inmunohistoquímica de una rodaja de cuerpo carotídeo de rata infectada con el serotipo 5 de vectores virales adenoasociados. El color rojo representa el marcaje específico de la enzima tirosina hidroxilasa, característica de células glómicas; en verde, las células que transducen la proteína viral EGFP. La superposición de los dos canales de emisión evidencia que el serotipo 5 de virus adenoasociados es capaz de infectar eficientemente las células quimiosensoras del cuerpo carotídeo. El total de células se estimó mediante tinción con DAPI (color azul).

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica



**Participación de hemoproteínas en la función quimiosensora
de células neurosecretoras**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctora
por la Universidad de Sevilla

María Teresa Marcos Almaraz

Sevilla, 2011

JOSÉ LÓPEZ BARNEO, catedrático del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, y ALBERTO PASCUAL BRAVO, científico titular del CSIC,

CERTIFICAN:

que la memoria de trabajo titulada “Participación de hemoproteínas en la función quimiosensora de células neurosecretoras” elaborada por María Teresa Marcos Almaraz, licenciada en Biología, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Para que conste, firman la presente en Sevilla, a 7 de Junio de 2011.

Fdo.: JOSÉ LÓPEZ BARNEO

Fdo.: ALBERTO PASCUAL BRAVO

A pesar de mi reticencia inicial a escribir este apartado por considerarlo ajeno al ámbito exclusivamente académico de este trabajo, finalmente he querido reflejar, en pocas palabras, la experiencia personal que esta etapa formativa ha supuesto para mí.

En primer lugar, señalar a los "culpables" de mi afán por desarrollar una tesis en el campo de la fisiología animal. María, José Julián y Nacho no sólo supieron inculcarme un profundo interés por esta parte tan compleja de la biología sino que, con su gran labor docente, lo incrementaron más aún a medida que transcurrían los años de licenciatura. Y, en esta difícil tarea educadora, no sólo incluyo los conocimientos teóricos, sino también el ejemplo continuado de lo que se consigue trabajando en un grupo que, ante todo, se basa en el respeto y en intentar hacer una "buena ciencia", con todo lo que ello implica. Quiero agradecer especialmente a Nacho sus consejos, sus recomendaciones, su tiempo para escucharme y, en definitiva, su modo de ver la ciencia y de procurar mantenerla como una necesidad y un bien común, lejos de los intereses particulares y económicos que imperan en tantos grupos de investigación. También quiero expresar mi gratitud a María, por sus ánimos y los recuerdos de "sus olivos granáinos", que tantas veces me acompañaron en mis viajes hacia Sevilla, y que me ayudaron a disminuir, aunque sólo un poquito, la añoranza del campo charro.

Desde el punto de vista profesional, tengo que decir que me siento orgullosa de que ésta sea la primera tesis dirigida por Alberto, si bien es verdad que esta responsabilidad fue fruto de diversas casualidades. De él no sólo he aprendido una amplia variedad de técnicas metodológicas sino que también ha sido un gran ejemplo sobre cómo integrar, de una manera eficiente, la labor experimental y el trabajo intelectual en la investigación biomédica. Pero, más allá de la relación profesional que hemos mantenido, quiero agradecerle especialmente los momentos en los que, a nivel personal, me ha mostrado su apoyo. Quiero hacer extensiva esta gratitud a Pepe y a todos los compañeros que, de una manera u otra, han contribuido a la culminación de esta etapa de formación científica que, por otro

lado, tanto ha aportado a mi formación personal. Durante todo este tiempo he intentado aprovechar al máximo la oportunidad que ha supuesto pertenecer a un grupo de un prestigio científico tan alto sin olvidar, no obstante, que siempre quedará mucho por aprender y que las huellas del conocimiento no deben buscarse únicamente en los mejores datos curriculares pues, como todos sabemos, el éxito en ciencia depende en gran medida de un componente azaroso. Además de estas reflexiones, me gustaría dejar patente el respeto que, a lo largo de todos estos años, he manifestado hacia los animales de experimentación. Para alguien que pretende contribuir al avance biomédico y que tiene conocimiento sobre la fisiología del dolor, resulta imprescindible seguir, en todo momento, las directrices éticas que regulan la manipulación de la vida animal y que, de hecho, creo que deberían ser innatas en todos los que disponemos de esta "libertad".

Pero, sin duda, lo más difícil de una tesis es reflejar el agradecimiento hacia los tuyos en unas cuantas líneas. De hecho, me encuentro con que no es algo delicado, sino imposible. Así pues, tan sólo quiero expresar lo afortunada que me siento por estar rodeada de una familia y unos amigos que tan "cerca" han estado de mí durante todo el tiempo que ha durado este trabajo y, lo que es mejor, que aún permanecen a mi lado. No obstante, quiero tener un recuerdo especial para mi abuela María, dada la implicación que su ejemplo de voluntad, constancia y esfuerzo ha tenido para la consecución de esta tesis, y a la que siempre echaré de menos.

Fuentesauco, a 22 de Julio de 2011

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Apartado 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. BIOLOGÍA DE LA QUIMIORRECEPCIÓN	3
1.2. EL CUERPO CAROTÍDEO COMO ÓRGANO QUIMIORRECEPTOR	5
1.2.1. Modelo de quimiotransducción en el cuerpo carotídeo	7
1.2.2. Hipótesis sobre mecanismos de sensibilidad a O ₂	8
1.2.2.1. <i>Hipótesis del sensor acoplado a canales de la membrana</i>	8
1.2.2.2. <i>Hipótesis de sensores independientes</i>	10
1.2.3. Canales de K ⁺ regulados por O ₂	13
1.2.3.1. <i>Quimiosensibilidad de los canales de K⁺ tipo TASK (TWIK-1 related acid-sensitive K⁺ channel)</i>	14
1.3. LAS HEMOPROTEÍNAS COMO SENSORES METABÓLICOS CELULARES	17
1.3.1. Sensores de O ₂ bacterianos basados en la interacción con un grupo hemo	17
1.3.2. La hemoglobina como proteína modelo de interacción con el O ₂	18
1.3.3. Expresión y funcionalidad de la hemoglobina en células no eritroides	20
1.4. NUEVAS TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA LA BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS SENSORAS EN EL CUERPO CAROTÍDEO	24
Apartado 2: OBJETIVOS	29
Apartado 3: RESULTADOS	33
3.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS CANALES DE K⁺ TASK-1 Y TASK-3 EN CÉLULAS GLÓMICAS DE CUERPO CAROTÍDEO	35
3.1.1. Búsqueda de moléculas sensoras de O ₂ en organismos superiores por homología de secuencias	35
3.1.2. Generación de un ratón <i>knock-out</i> condicional de <i>Kcnk3</i>	36
3.1.2.1. <i>Construcción del transgén mediante el sistema CRE-loxP</i>	36
3.1.2.2. <i>Selección de clones de células madre embrionarias recombinantes</i>	37
3.1.2.3. <i>Generación de organismos quimera</i>	41

3.1.3.	Cuantificación de los niveles de mRNA de canales iónicos en el cuerpo carotídeo de ratones <i>knock-out</i> de <i>Kcnk3</i> y <i>Kcnk9</i> _____	42
3.1.4.	Caracterización histológica del cuerpo carotídeo de ratones <i>knock-out</i> de <i>Kcnk3</i> y de <i>Kcnk3</i> y <i>Kcnk9</i> _____	44
3.1.5.	Caracterización amperométrica de la respuesta a hipoxia del cuerpo carotídeo de ratones <i>knock-out</i> de <i>Kcnk3</i> y de <i>Kcnk3</i> y <i>Kcnk9</i> _____	46
3.2.	CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CADENAS DE HEMOGLOBINA EN CÉLULAS NEUROSECRETORAS _____	47
3.2.1.	Análisis de expresión de cadenas de hemoglobina en células de la línea simpatoadrenal _____	47
3.2.2.	Análisis de la presencia de las cadenas α y β en otras líneas celulares _	51
3.2.3.	Regulación del mRNA de la cadena α en células PC12 _____	52
3.2.3.1.	<i>Curso temporal en hipoxia</i> _____	52
3.2.3.2.	<i>Análisis de la dependencia de HIF</i> _____	53
3.2.3.3.	<i>Tratamiento con inhibidores de la transcripción y de la traducción</i> _	54
3.2.4.	Estudio funcional de la cadena α en células PC12 _____	56
3.2.4.1.	<i>Generación de clones de expresión estable de la cadena α de la hemoglobina (α-Hb) y de su proteína estabilizadora (AHSP)</i> _____	56
3.2.4.2.	<i>Análisis del crecimiento de los clones de expresión estable de α-Hb y de AHSP</i> _____	57
3.2.4.3.	<i>Análisis de la expresión de genes regulados por hipoxia en los clones de expresión estable de α-Hb y de AHSP</i> _____	58
3.2.4.4.	<i>Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno en los clones de expresión estable de α-Hb y de AHSP</i> _____	59
3.2.4.5.	<i>Análisis del proteoma de los clones de expresión estable de α-Hb y de AHSP</i> _____	60
3.2.4.6.	<i>Análisis de la actividad tirosina hidroxilasa en los clones de expresión estable de α-Hb y de AHSP</i> _____	63
3.3.	CARACTERIZACIÓN DEL TROPISMO DE VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS EN PREPARACIONES DE CUERPO CAROTÍDEO _____	65
3.3.1.	Análisis de la infección de los serotipos AAV-1, AAV-2 y AAV-5 en rodajas de tejido _____	66
3.3.2.	Análisis de la infección de los serotipos AAV-1, AAV-2 y AAV-5 en neuroesferas _____	67

Apartado 4: DISCUSIÓN _____

4.1. CONTRIBUCIÓN DE LOS CANALES DE K⁺ TASK-1 Y TASK-3 A LA FISIOLOGÍA DEL CUERPO CAROTÍDEO	73
4.1.1. Morfología y propiedades electrofisiológicas de las células glómicas de animales deficientes en TASK-1 y en TASK-1 y TASK-3	73
4.1.2. Actividad secretora en respuesta a la hipoxia en las células glómicas de animales deficientes en TASK-1 y en TASK-1 y TASK-3	75
4.1.3. Implicaciones de la ausencia de TASK-1 y de TASK-1 y TASK-3 en la sensibilidad a O ₂ del cuerpo carotídeo	77
4.2. FUNCIONES DE LA CADENA α DE LA HEMOGLOBINA EN CÉLULAS SIMPATOADRENALES	78
4.2.1. Expresión de cadenas de hemoglobina en células de la línea simpatoadrenal	78
4.2.2. Regulación de la expresión de cadenas de hemoglobina en células simpatoadrenales	80
4.2.2.1. <i>Regulación de la expresión de la cadena α de la hemoglobina en células PC12</i>	81
4.2.3. Implicación funcional de la cadena α de la hemoglobina en células PC12	84
4.2.4. Expresión de las cadenas α y β de la hemoglobina en las células glómicas del cuerpo carotídeo	89
4.3. UTILIZACIÓN DE VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS EN EL ESTUDIO DEL CUERPO CAROTÍDEO	90
Apartado 5: CONCLUSIONES	93
Apartado 6: METODOLOGÍA	97
6.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	99
6.1.1. Especies animales	99
6.1.2. Alojamiento y manipulación	100
6.2. EXTRACCIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS ANIMALES	100
6.2.1. Anestesia	101
6.2.2. Cirugía	101
6.2.2.1. <i>Cuerpo carotídeo y ganglio cervical superior</i>	101
6.2.2.2. <i>Médula adrenal</i>	102
6.2.2.3. <i>Tejido cardíaco, hepático y muscular</i>	103

6.2.2.4. Cerebro y embrión _____	103
6.3. CULTIVOS CELULARES DE ORIGEN ANIMAL _____	103
6.3.1. Cultivos primarios _____	104
6.3.1.1. <i>Dispersión de células de cuerpo carotídeo</i> _____	104
6.3.1.2. <i>Neuroesferas de cuerpo carotídeo</i> _____	105
6.3.1.3. <i>Rodajas de cuerpo carotídeo</i> _____	106
6.3.1.4. <i>Dispersión de células de médula adrenal</i> _____	106
6.3.1.5. <i>Dispersión de células de ganglio cervical superior</i> _____	107
6.3.2. Líneas celulares _____	107
6.3.2.1. <i>Células PC12 (Phaeochromocytoma Rat Cells)</i> _____	107
6.3.2.2. <i>Células BRL (Buffalo Rat Liver Cells)</i> _____	108
6.3.2.3. <i>Células ES (Embryonic Stem Cells)</i> _____	109
6.3.2.4. <i>Células HEK-293 (Human Embryonic Kidney Cells)</i> _____	110
6.3.2.5. <i>Células NIH3T3 (Mouse Embryonic Fibroblasts)</i> _____	111
6.3.2.6. <i>Células EOMA (Mouse Hemangioendothelioma Endothelial Cells)</i> _____	111
6.3.2.7. <i>Células MAH (Adrenal-derived HNK-1⁺ Cells)</i> _____	111
6.3.3. Tratamientos celulares _____	111
6.3.3.1. <i>Tratamiento con actinomicina D</i> _____	111
6.3.3.2. <i>Tratamiento con cicloheximida</i> _____	112
6.3.3.3. <i>Tratamiento con DMOG</i> _____	112
6.3.3.4. <i>Tratamiento con KCl</i> _____	112
6.3.3.5. <i>Tratamiento con CdCl₂</i> _____	112
6.3.3.6. <i>Tratamiento con m-hidroxibencilhidracina</i> _____	112
6.3.4. Modificación genética de células _____	113
6.3.4.1. <i>Electroporación</i> _____	113
6.3.4.2. <i>Lipofección</i> _____	114
6.3.4.3. <i>Transducción con virus adenoasociados</i> _____	114
6.3.4.3.1. <i>Rodajas de cuerpo carotídeo</i> _____	114
6.3.4.3.2. <i>Neuroesferas de cuerpo carotídeo</i> _____	115
6.3.5. Separación de células por citometría de flujo _____	115
6.3.5.1. <i>Células glómicas de cuerpo carotídeo</i> _____	115
6.3.5.2. <i>Células cromafines de la médula adrenal y neuronas simpáticas del ganglio cervical superior</i> _____	117
6.3.6. Medida de la proliferación celular _____	117
6.3.6.1. <i>Hemocitómetro</i> _____	117
6.3.6.2. <i>“Cell proliferation Kit”</i> _____	118

6.4. HISTOLOGÍA	118
6.4.1. Análisis de expresión de proteínas por inmunohistoquímica	118
6.4.1.1. Fijación e inclusión de la muestra	118
6.4.1.2. Obtención de secciones de tejido	119
6.4.1.3. Inmunohistoquímica de fluorescencia	119
6.4.1.4. Inmunohistoquímica con diaminobencidina (DAB)	120
6.4.2. Morfometría: estimación volumétrica de órganos animales	120
6.5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	120
6.5.1. Cultivos de bacterias y producción de fagos	120
6.5.1.1. Medios de cultivo	121
6.5.1.1.1. Medio sólido	121
6.5.1.1.2. Medio líquido	121
6.5.1.2. Infección por bacteriófagos	122
6.5.1.3. Transformación de bacterias	123
6.5.2. DNA	124
6.5.2.1. Extracción y purificación del DNA	124
6.5.2.1.1. DNA genómico de muestras de tejidos o de células animales	124
6.5.2.1.2. DNA plasmídico de bacterias	125
6.5.2.1.3. Lisado de bacteriófagos	126
6.5.2.1.4. Purificación de fragmentos de DNA amplificados por PCR o digeridos enzimáticamente	126
6.5.2.1.5. Extracción y purificación de fragmentos de DNA a partir de un gel de agarosa	126
6.5.2.2. Amplificación de DNA	126
6.5.2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa convencional	127
6.5.2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	127
6.5.2.2.3. Cultivos bacterianos: miniprep y midiprep	128
6.5.2.3. Precipitación de DNA	128
6.5.2.4. Manipulación enzimática del DNA	129
6.5.2.4.1. Inserción de DNA en vectores de clonación de tipo plasmídico	129
6.5.2.4.2. Mutagénesis dirigida	129
6.5.2.5. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación con sondas radiactivas	129

6.5.2.5.1.	<i>Detección de secuencias de DNA genómico de bacterias</i>	130
6.5.2.5.2.	<i>Detección de secuencias de DNA genómico de células animales (Southern Blot)</i>	130
6.5.2.6.	<i>Secuenciación de DNA</i>	131
6.5.3.	RNA	131
6.5.3.1.	<i>Extracción de RNA</i>	131
6.5.3.1.1.	<i>RNA total</i>	131
6.5.3.1.2.	<i>RNA mensajero</i>	131
6.5.3.2.	<i>Transcripción reversa de RNA</i>	132
6.6.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	132
6.6.1.	Extracción y procesado de la muestra proteica	132
6.6.1.1.	<i>Extracción de proteínas</i>	132
6.6.1.2.	<i>Fraccionamiento de proteínas</i>	132
6.6.1.3.	<i>Purificación y cuantificación de proteínas</i>	133
6.6.2.	Análisis y cuantificación de la expresión por métodos moleculares y bioquímicos	134
6.6.2.1.	<i>Western Blot</i>	134
6.6.2.2.	<i>Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)</i>	135
6.7.	DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS	136
6.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	137
6.9.	PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS	137

ANEXO (Metodología) **139**

-	Tabla A-1: Soluciones enzimáticas para la dispersión de órganos y tejidos	141
-	Tabla A-2: Medios de cultivo primario	141
-	Tabla A-3: Medios de cultivo de líneas celulares	142
-	Tabla A-4: Plásmidos de origen comercial	142
-	Tabla A-5: Plásmidos construidos	143
-	Tabla A-6: Oligonucleótidos para PCR convencional	143

- Tabla A-7: Condiciones de reacción para la amplificación de DNA por PCR convencional _____	144
- Tabla A-8: Oligonucleótidos para PCR en tiempo real _____	144
- Tabla A-9: Anticuerpos _____	145
- Tabla A-10: Programas bioinformáticos _____	145

Apartado 7: BIBLIOGRAFÍA _____ **147**

ÍNDICE DE ABREVIATURAS _____ **167**

Apartado 1:

INTRODUCCIÓN



1.1. **BIOLOGÍA DE LA QUIMIORRECEPCIÓN**

Los diversos niveles de organización biológica precisan una intercomunicación basada en la capacidad de detección de determinadas sustancias químicas y en las reacciones derivadas de esta sensibilidad. Desde un punto de vista evolutivo, la quimiorrecepción es un proceso conservado y de aparición temprana. Todos los organismos, desde el más primitivo hasta los vertebrados superiores, son capaces de percibir las señales químicas del medio ambiente. Así, aquéllos que no poseen un sistema nervioso organizado, utilizan esta capacidad sensorial para localizar el alimento y para aparearse. En bacterias, también es una característica esencial que les permite detectar y responder a sustancias específicas de su entorno, tal como demuestra el comportamiento quimiotáctico (movimiento según gradientes químicos). A lo largo de la evolución, se ha pasado desde una respuesta simple de atracción o rechazo en organismos unicelulares a un sistema muy sensible y especializado de receptores químicos en los animales más complejos.

La quimiosensibilidad no sólo está presente en la comunicación célula/animal-medio, sino también entre los distintos órganos del individuo, haciendo posible la regulación de la actividad celular y, en último término, de la homeostasis.

Las sustancias químicas son captadas por órganos quimiorreceptores, que contienen células sensoriales especializadas en la adquisición de información sobre el ambiente y en convertir dicho estímulo en una respuesta eléctrica que pueda ser procesada por las neuronas del sistema nervioso. Se diferencian dos grandes categorías de quimiorreceptores. Por un lado, existen “quimiorreceptores externos”, localizados en la superficie del cuerpo para obtener información acerca del ambiente exterior y, por otro, “quimiorreceptores internos”, inmersos en la estructura de los órganos para responder a cambios fisiológicos de las condiciones internas y accionar mecanismos homeostáticos. Entre los primeros, se encuentran los receptores “gustativos”, que responden a sustancias químicas disueltas próximas y cuyo umbral de estimulación es relativamente alto. Desde el punto de vista evolutivo, este tipo de quimiorreceptores fue el primero en aparecer, siendo el único presente en los animales más primitivos; en vertebrados, se encuentra generalmente en el área bucal, jugando un papel importante en el comportamiento alimenticio. También existen quimiorreceptores “olfativos”, especializados en responder a agentes químicos externos procedentes de una fuente distante, por lo que son mucho más sensibles y específicos que los anteriores. Estos receptores intervienen en pautas de comportamiento complejas (agresión, migración, cortejo,...). Por último, los quimiorreceptores “internos” responden a estímulos químicos dentro del organismo, controlando aspectos de su composición química que resultan esenciales. Entre ellos, se encuentran los receptores de glucosa del hipotálamo, los quimiorreceptores de presión osmótica del encéfalo y las células sensoras de los cuerpos aórticos y carotídeos (Figura 1), encargadas de detectar niveles sanguíneos de oxígeno (O₂), dióxido de carbono (CO₂) y protones (H⁺). La sensibilidad de estos dos últimos órganos al pH y, sobre

todo, a los gases respiratorios, hace que intervengan de manera notable en la regulación de la respiración.

El objetivo de la respiración es mantener las concentraciones adecuadas de O_2 , CO_2 y H^+ en los tejidos, asegurando así el correcto funcionamiento del metabolismo celular. El exceso de CO_2 o de H^+ estimula fundamentalmente las neuronas del centro respiratorio del encéfalo. Sin embargo, el O_2 no tiene un efecto directo sobre el sistema nervioso central, sino que es detectado casi exclusivamente por quimiorreceptores periféricos situados en los cuerpos aórticos y carotídeos, capaces de transmitir la información del estímulo en forma de señales electrofisiológicas hasta las terminaciones del centro respiratorio, que dictaminará a los efectores las respuestas reguladoras pertinentes. Las células que forman parte de los quimiorreceptores periféricos son células neurosecretoras eléctricamente excitables, que poseen una actividad tónica a los niveles normales de la presión parcial de O_2 (PO_2) sanguínea (~ 90 - 100 mm Hg) y que empiezan a incrementar su grado de activación incluso a niveles moderados de hipoxia (< 50 - 60 mm Hg).

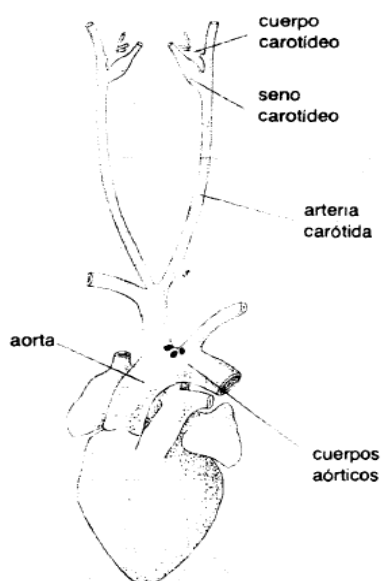


Figura 1. Localización de los cuerpos carotídeos y aórticos en mamíferos. Los primeros se encuentran situados de forma bilateral en la bifurcación de la arteria carótida, mientras que los quimiorreceptores aórticos se disponen a lo largo del cayado aórtico.

En vista de que el O_2 es esencial en el mantenimiento de la actividad celular, el estudio de la sensibilidad a variaciones en los niveles normales de esta molécula se convierte en un campo de investigación muy sugerente y de gran valor médico y biológico.

Incluso organismos poco evolucionados, como las bacterias, han desarrollado mecanismos de defensa para paliar los efectos deletéreos de la falta de O₂ expresando diferentes grupos de genes que regulan la expresión de proteínas a nivel transcripcional (1). En animales con altos valores metabólicos, como los mamíferos, la supervivencia ante un episodio de hipoxia aguda (< 50-60 mm Hg) requiere ajustes respiratorios y cardiovasculares inmediatos para garantizar la llegada de O₂ a los órganos más vulnerables, como el cerebro o el corazón. La respuesta ventilatoria se inicia en los cuerpos carotídeos; los aórticos juegan un papel secundario (2-5).

La reacción del organismo ante un descenso repentino en los niveles de O₂ depende, principalmente, de canales iónicos que median cambios adaptativos en la excitabilidad celular y en la actividad secretora, a diferencia de lo que ocurre frente a una exposición crónica a hipoxia, cuyas respuestas obedecen a la modulación de factores de transcripción que determinan la expresión de numerosos genes (6, 7) y que, por tanto, son más lentas que las anteriores.

Además de los cuerpos aórticos y carotídeos, existen tejidos especializados con células eléctricamente excitables que responden de manera aguda a la disminución de O₂, tales como los cuerpos neuroepiteliales del pulmón (8, 9), las arterias fetoplacentales (10, 11) o las células cromafines de la médula adrenal (MA) de animales neonatos (12-17). La vasoconstricción de la arteria pulmonar (18, 19) y el cierre del *ductus arteriosus* tras el nacimiento para separar la sangre arterial de la venosa (4) son también respuestas celulares agudas a los descensos en la PO₂ arterial. En conjunto, todos ellos constituyen el “sistema homeostático sensor de la hipoxia”, que permite la adaptación de los seres vivos, y en especial de los mamíferos superiores, a las condiciones permanentemente cambiantes del ambiente.

1.2. EL CUERPO CAROTÍDEO COMO ÓRGANO QUIMIORRECEPTOR

A pesar de su pequeño tamaño, el cuerpo carotídeo (CC) tiene una compleja estructura anatómica y bioquímica (20, 21). Se trata de un órgano que funciona como un quimiorreceptor arterial que se activa preferentemente por la disminución de la tensión de O₂ de la sangre (hipoxemia) y por el aumento del CO₂ (hipercapnia) o la acidosis extracelular. También es sensible a variaciones de presión, osmolaridad y temperatura, a hormonas circulantes, a agentes farmacológicos y a la disminución de glucosa. Todo ello lo convierte en un órgano sensor polimodal (4, 13, 22-24). Actuando sobre neuronas de los centros respiratorios y vasomotor del tronco del encéfalo, la estimulación carotídea resulta en hiperventilación y en una activación simpática (taquicardia y aumento de la presión arterial), contribuyendo de este modo a la compensación de la hipoxemia y la hipercapnia. En algunas especies de mamíferos (entre ellas, el hombre), la capacidad de los CCs para detectar cambios en la PO₂ se encuentra muy atenuada

en los primeros días de vida y es sólo tras una maduración postnatal (en la rata, de unos 8-10 días), cuando los mecanismos de quimiorrecepción están completamente maduros para procesar con eficacia las variaciones arteriales de O₂ (25-28).

Durante el desarrollo embrionario, la cresta neural da origen a múltiples tipos celulares, entre los cuales se incluyen la MA o el ganglio cervical superior (GCS). El CC deriva de progenitores que emigran desde el GCS formando islotes celulares (glomérulos), separados entre sí por tejido conectivo. Estos acúmulos constituyen la organización histológica básica y la unidad funcional del órgano (Figura 2B). Entre la diversidad celular que se encuentra en el CC, cabe destacar dos tipos principales. Por un lado, están las células tipo I o glómicas, que son las que desempeñan la función quimiosensora y, por otro, las células tipo II, de origen glial, y a las que clásicamente se ha adscrito una función de soporte bioquímico y estructural (29, 30). Recientemente, se ha demostrado que las células tipo II (o, al menos, una subpoblación de las mismas) son progenitores multipotentes que permiten la plasticidad estructural del órgano (31). Para llevar a cabo su función sensorial, las células glómicas contienen abundantes neurotransmisores, generalmente empaquetados en vesículas secretoras, (caso de aminas biógenas como dopamina, acetilcolina, serotonina, histamina y norepinefrina, de neuropéptidos como sustancia P, endotelina y angiotensina II y de aminoácidos como GABA y ATP) (32, 33). Estas células expresan una amplia variedad de canales iónicos dependientes de ligando y de voltaje, así como canales de K⁺ que contribuyen al mantenimiento del potencial de membrana en reposo (32).

El CC recibe la inervación sensorial aferente por el nervio del seno carotídeo (NSC), que es una rama del IX par craneal (Figura 2A). Las células glómicas hacen sinapsis con estas fibras nerviosas que penetran en el órgano, generando potenciales de acción debido a la activación de canales iónicos dependientes de potencial (29). También existe una inervación vegetativa eferente que termina principalmente en las células de los vasos sanguíneos que irrigan el tejido.

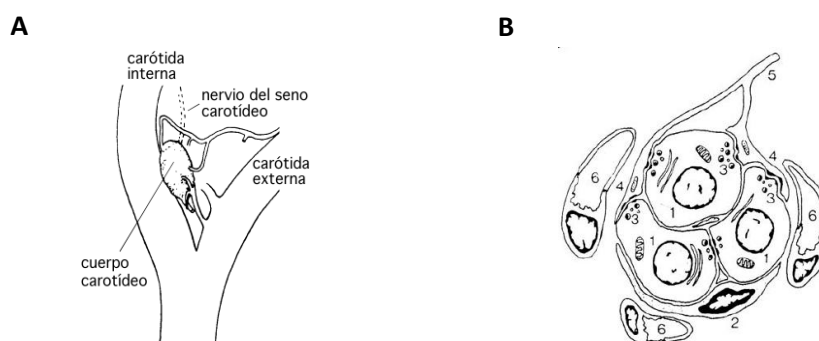


Figura 2. A. Localización del CC en la bifurcación de la arteria carótida. B. Esquema de un glomérulo de CC (tomada de 34). 1, célula glómica; 2, célula sustentacular; 3,

vesículas sinápticas en las células glómicas; 4 y 5, terminaciones y fibra sensorial; 6, capilares sanguíneos.

1.2.1. Modelo de quimiotransducción en el cuerpo carotídeo

En base al descubrimiento en las células glómicas de canales de K^+ cuya actividad se inhibe de forma reversible y selectiva por la hipoxia (35-38), se ha postulado un modelo de quimiotransducción que implica un aumento de la excitabilidad (despolarización) de las células como consecuencia del cierre de estos canales. Ello conduciría al flujo transmembranario de Ca^{2+} por la apertura de canales voltaje-dependientes, así como al aumento de las concentraciones citoplasmáticas de este ión (39, 40) y a la liberación de neurotransmisores por exocitosis (39, 41), los cuales activarían las fibras sensoriales aferentes que conducen la información al sistema nervioso central (Figura 3). Es probable que sean la acetilcolina y el ATP quienes lleven a cabo esta activación sensorial (42).

Posteriormente, se encontraron canales de K^+ con propiedades similares en otros tejidos con respuestas neurosecretoras ante la hipoxia aguda (3, 9, 14, 17-19, 43-45).

La cascada de transducción de señales en las células del CC ocasionada por el descenso repentino en la tensión arterial de O_2 es un modelo muy establecido (46-48). Sin embargo, aún se desconoce la molécula, o el conjunto de las mismas, causantes de la detección del estímulo, así como el mecanismo por el que se desencadena la disminución de la probabilidad de apertura de los canales de K^+ . Es más, ni siquiera se ha definido aún la naturaleza de estos canales de K^+ sensibles a O_2 , aunque los datos disponibles sugieren que existe más de un tipo.

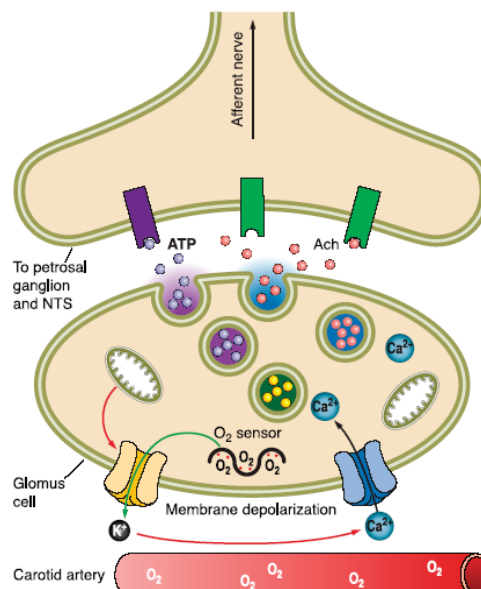


Figura 3: Modelo de transducción del estímulo hipóxico en las células glómicas (tomada de 49). El descenso en la tensión arterial de O_2 es detectado por la célula, provocando la inhibición selectiva de un canal de K^+ y la consiguiente despolarización de la membrana. La apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de potencial incrementan el flujo del ión hacia el interior de la célula, lo cual desencadena la liberación de vesículas con neurotransmisores que activan las fibras aferentes que inervan el CC, principalmente a través de ATP y acetilcolina. De este modo, la información es enviada al sistema nervioso central, que modulará una respuesta de activación simpática (taquicardia y aumento de la presión arterial) e hiperventilación.

1.2.2. Hipótesis sobre los mecanismos de sensibilidad a O_2

Respecto a la cuestión anterior en torno a la molécula que actúa como sensor de hipoxia en el CC, existen varias teorías, que implican una interacción directa del O_2 con canales iónicos o, por el contrario, una modulación indirecta por parte de hemoproteínas u otro tipo de moléculas, que actuarían como elementos sensores (4, 46, 49). Es lo que se conoce, en términos globales, como “hipótesis del sensor acoplado a canales de la membrana” e “hipótesis de sensores independientes”, respectivamente (Figura 4). No obstante, dada la diversidad de canales de K^+ sensibles a hipoxia encontrados en diferentes especies animales, no se descarta la posibilidad de que coexistan en la misma célula varias moléculas que, actuando de manera conjunta, detecten agudamente las variaciones en la tensión arterial de O_2 .

1.2.2.1. Hipótesis del sensor acoplado a canales de la membrana

El estudio detallado de la interacción del O_2 con los canales de K^+ indica que la disminución de la probabilidad de apertura en condiciones de hipoxia se debe a modificaciones de propiedades cinéticas bien definidas (50), lo que sugiere que la tensión de O_2 influye en la conformación de dominios específicos de la molécula. Los cambios en la PO_2 podrían regular el estado *redox* de determinados residuos localizados en la molécula del canal o en un sensor asociado que forme parte de la misma estructura oligomérica (Figura 4A).

En ensayos electrofisiológicos, algunos canales iónicos son capaces de reproducir la despolarización inducida por la hipoxia en configuraciones de parche escindido (que implican la separación del área de membrana sellada del resto de la célula) (51-55), sugiriendo que el sensor podría estar íntimamente ligado a la estructura del canal, bien asociado a la subunidad formadora del poro o como parte de una subunidad auxiliar. Sin embargo, esta inhibición de la corriente no se mantiene en el tiempo de exposición a hipoxia, insinuando que la sensibilidad a O_2 sería un proceso delimitado a la membrana pero que requiere, en primer lugar, factores citosólicos cuando el estímulo se prolonga en el tiempo, lo que pone en duda el modelo de sensor acoplado a canales de la membrana. También la expresión

heteróloga de subunidades recombinantes de canales de K⁺ regulados por hipoxia presenta una variabilidad en el registro de la respuesta no sólo cuando se analizan diferentes tipos celulares, sino también entre preparaciones idénticas (54-59), aludiendo nuevamente a la existencia de un elemento esencial que interactúe con estos canales para reproducir la sensibilidad a O₂ que presentan normalmente en las células.

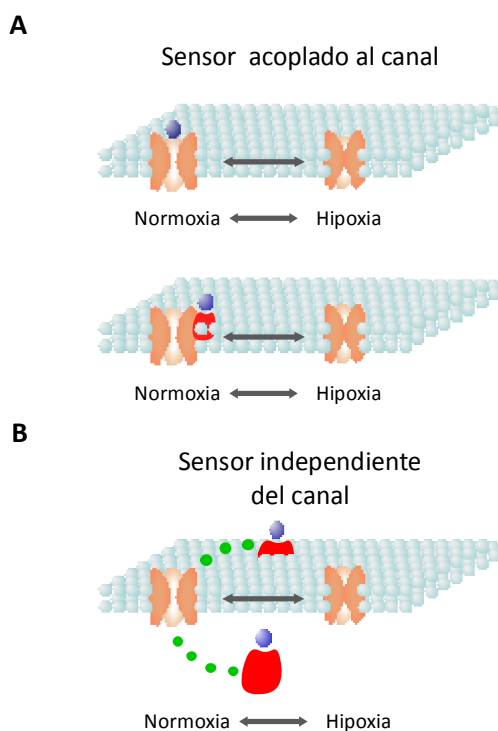


Figura 4. Representación esquemática de las diferentes hipótesis para explicar la modulación de los canales de K⁺ por los cambios en la PO₂ arterial (modificada de 60). A. Sensor acoplado al canal: el canal posee un dominio sensor (panel superior), o existe un sensor que interactúa directamente con el canal (panel inferior). B. Sensor independiente del canal: el sensor está localizado en el interior celular o en la membrana plasmática. En azul se representa el O₂ y en verde la modulación de la actividad del canal.

En base a esta hipótesis, el mecanismo de sensibilidad a hipoxia en el CC podría sustentarse sobre un modelo en el cual el O₂ actúe como un ligando sobre la molécula detectora, produciendo en ella un efecto alostérico que le permita desempeñar su función. El O₂ podría ligarse reversiblemente a complejos de coordinación formados por metales unidos a la proteína, como ocurre en otras moléculas (61). Según esto, se ha postulado que el sensor podría ser un canal que una hemo, dada la capacidad de este grupo prostético para enlazar reversiblemente el O₂, tal como sucede en las cadenas de hemoglobina de las células eritroides. Este tipo de sensores basados en el grupo hemo provocarían

cambios conformacionales en los canales gracias a las propiedades termodinámicas del O_2 para unirse reversiblemente y formar una unión Fe- O_2 . Cuatro de los seis enlaces de coordinación del átomo de Fe del grupo hemo lo mantienen anclado al anillo porfirínico, y el quinto es generalmente ocupado por un residuo His (la parte apoproteica de la heteroproteína). El último enlace puede permanecer vacío, o bien ser ocupado por otro residuo His o, tal como sucede en los sensores de este tipo, unir una molécula de O_2 como ligando (1). La sencillez de esta alternativa radica en que, ante un descenso repentino en los niveles de O_2 , el sensor liberaría rápidamente el mismo para cederlo al metabolismo celular y, en esta conformación deoxigenada, activaría los mecanismos secretores (Figura 5). Este modelo de sensor es también plausible separado del canal (apartado 1.2.2.2), conduciendo en ese caso a la activación de un efector.

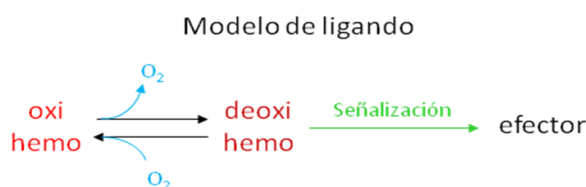


Figura 5. Modelo de ligando propuesto como mecanismo sensor de O_2 en las células glómicas. La conformación deoxigenada del sensor, inducida por un episodio de hipoxia, activaría los efectores para producir la liberación de neurotransmisores que activen las fibras aferentes del NSC.

El monóxido de carbono (CO) también parece bloquear el efecto de la hipoxia en canales de K^+ sensibles a O_2 en células glómicas de conejo (62), lo que supone un argumento más para pensar en sensores basados en grupo hemo.

1.2.2.2. Hipótesis de sensores independientes

1.2.2.2.1. Al igual que en el apartado anterior, moléculas con capacidad para unir grupo hemo serían candidatos a ser sensores en el CC. La enzima antioxidante hemo oxigenasa-2 (HO-2), por ejemplo, cumple una serie de requisitos que han llevado a considerarla el elemento responsable de la sensibilidad a hipoxia en las células glómicas, a pesar de tener una expresión constitutiva en el organismo. Su actuación para catabolizar el grupo hemo en biliverdina, hierro (Fe^{3+}) y CO depende por completo de O_2 (63) y, además, se ha comprobado en experimentos de expresión heteróloga que inmunoprecipita conjuntamente con canales de K^+ tipo maxi- K^+ (ver apartado 1.2.3), cuya modulación por O_2 es abolida en presencia de RNA de interferencia (siRNA) para la enzima (64, 65). Otro punto a tener en cuenta es que, tanto el grupo hemo como la nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato (NADPH), ambos sustratos de la enzima, potencian la actividad de los canales maxi- K^+ , tal como demuestran los experimentos de *patch clamp*. La

hipótesis propuesta en torno al mecanismo de acción de la HO-2 como sensor de O₂, sería que el CO producido activaría directamente los canales maxi-K⁺ (63, 65, 66) a través de una interacción aún desconocida (Figura 4B). No obstante, la medida de secreción de vesículas catecolaminérgicas en respuesta al estímulo hipóxico realizada en preparaciones de CC de animales *knock-out* para la HO-2, no confirmó esta teoría (67, 68). Además, el bloqueo específico con iberiotoxina de la corriente de canales maxi-K⁺ mantenía la respuesta secretora en la célula glómica ante la bajada de O₂, poniendo de manifiesto que estos canales de K⁺ no son un elemento imprescindible en la sensibilidad a hipoxia, si bien contribuyen al potencial de membrana de las células del CC (67).

En una amplia variedad de células, incluyendo organismos procariotas, las hemoproteínas funcionan como sensores metabólicos (apartado 1.3) por lo que, dentro de esta hipótesis, una atractiva posibilidad sería la utilización de la hemoglobina para enlazar O₂ en la célula glómica y, en base a esta unión, modular indirectamente la actividad del canal iónico. Recientemente, se ha descrito la expresión de hemoglobina en diversos tipos celulares no eritroides (69, 70-74), aunque aún no se ha analizado su presencia en las células sensoras del CC (ver apartado 1.3). No obstante, como respaldo a esta alternativa, existen evidencias de que, en condiciones de hipoxia, los eritrocitos son capaces de regular su metabolismo mediante el anclaje de la hemoglobina a un dominio específico del intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ (banda III), que desencadena la activación de enzimas glicolíticos (75, 76). También en estas células se ha estudiado la implicación de la hemoglobina en la regulación dependiente de O₂ de transportadores iónicos (77, 78).

1.2.2.2.2. Otra hipótesis plantea que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) en la célula pueda modificar el estado *redox* de moléculas implicadas en rutas de señalización y alterar la conformación de los canales iónicos de membrana (que, a su vez, contienen numerosos residuos susceptibles de modificación *redox*), desencadenando el mecanismo de quimiotransducción expuesto anteriormente (79) (Figura 4B). La hipótesis se fundamenta en que los agentes reductores producen efectos similares a la hipoxia sobre los canales de K⁺ sensibles a O₂ (79-82).

Aunque la producción de ROS es inespecífica, los sitios postulados como posibles sensores de O₂ en las células glómicas son, por un lado, la mitocondria y, por otro, la enzima NADPH oxidasa, que se encuentra unida a la membrana plasmática. El modo de actuación de esta enzima para detectar las variaciones de O₂ sería mediante el cambio de la tasa de producción de anión superóxido (O₂⁻) en proporción a la PO₂ detectada. La conversión de este radical a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) oxidaría, entre otras moléculas, los canales iónicos de membrana, modificando su conformación (83). Sin embargo, registros electrofisiológicos realizados en ratones *knock-out* y la inhibición farmacológica específica de la enzima, no muestran una pérdida de la respuesta frente al

estímulo hipóxico en preparaciones de CC (13, 84-88). Todo ello parece indicar que la hipoxia produce un aumento de los niveles de ROS en estas células, principalmente a través de la NADPH oxidasa, lo cual modula (incrementa) la probabilidad de apertura de canales de K^+ , aunque no hay una relación directa con la sensibilidad al O_2 (49).

La propuesta de que la mitocondria sea el sitio de detección del estímulo hipóxico se fundamenta en el hecho de que fármacos inhibidores de la cadena transportadora de electrones, así como desacoplantes mitocondriales, son capaces de incrementar la concentración de Ca^{2+} citosólico y reducir la permeabilidad al K^+ de canales de fuga en las células sensoras del CC (89, 90). Así pues, se plantea que este orgánulo, en condiciones de hipoxia, pueda generar señales que alteren la conductancia iónica de los canales de membrana, bien a través de una modificación *redox* (tal como ocurre en otros sistemas neurosecretores) (79) o bien mediante la reducción de los niveles citosólicos de ATP. Algunos autores han sugerido que el estado *redox* celular es independiente del mecanismo de sensibilidad a O_2 en la célula glómica (91). El descenso intracelular de ATP podría provocar el cierre de canales de fuga de K^+ regulados por este nucleótido (92), o inducir la activación de la enzima AMP quinasa, la cual modularía los canales iónicos causando la despolarización de la membrana (93). No obstante, el bloqueo selectivo de cada uno de los cuatro complejos mitocondriales (94), así como la presencia inducida de altas concentraciones de ATP en el interior celular, no impiden que el mecanismo de respuesta a hipoxia se desencadene normalmente (36, 39). Una aproximación más precisa a la hipótesis mitocondrial implica a la subunidad D de la enzima succinato deshidrogenasa (SDHD) del complejo II, dada su relación directa con la aparición de tumores en el CC (paragangliomas) que conllevan una elevada secreción de vesículas catecolaminérgicas y cuya principal característica es un defecto en la sensibilidad a las variaciones ambientales del gas (95-98). En el modelo de ratón heterocigoto *SDHD*^{+/-}, la sensibilidad al Ca^{2+} de canales maxi- K^+ (ver apartado 1.2.3) está disminuída, aunque el incremento en la liberación de catecolaminas inducida por hipoxia no es significativo (99). Todo ello sugiere que la mitocondria no participa directamente en la respuesta a la bajada en los niveles arteriales de O_2 , si bien no se descarta que pueda modificar el metabolismo celular produciendo alteraciones en los canales iónicos de membrana y, por tanto, modular la actividad de la célula glómica.

El óxido nítrico (NO) se ha postulado como posible elemento sensor por su capacidad para unirse al complejo IV mitocondrial y reducir la afinidad y el consumo de O_2 de la citocromo c oxidasa, lo que llevaría a la célula a reajustar su metabolismo ante la escasez de O_2 (100). En vista de que el NO disminuye la descarga aferente del NSC, se comprobó experimentalmente el efecto de la inhibición de la NO sintasa-1 (NOS-1, la isoforma presente en el CC), resultando un incremento de la respuesta a hipoxia en la célula glómica (101, 102). El análisis realizado en ratones *NOS-1*^{-/-} reveló un resultado similar (103). Sin embargo, el papel de este gas en la función secretora del CC parece simplemente modulador, --

sin una implicación directa en la misma (102, 104-107).

Otra hipótesis en torno a la naturaleza del sensor está basada en las prolil/asparragil hidroxilasas, enzimas que, en ausencia de O₂, permiten la actuación del factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1, del inglés *hypoxia inducible factor 1*), responsable de la regulación de numerosos genes implicados en las respuestas del organismo frente a la hipoxia (108-110). En condiciones normóxicas, HIF es hidroxilado por estas moléculas para su degradación en el proteosoma. Dado que la actividad prolil hidroxilasa sucede en cuestión de escasos minutos, es admisible que estas enzimas puedan modular, mediante hidroxilación de otras proteínas, los canales iónicos y ser las causantes de la sensibilidad al O₂ (111, 112). Sin embargo, la incubación de rodajas de CC con dimetiloxalilglicina (DMOG), un inhibidor de las hidroxilasas que permite la estabilización de HIF y que, por tanto, mimetiza las condiciones de hipoxia en la célula (113, 114), no anula el patrón típico de la respuesta secretora, lo que, en principio, hace descartar estas moléculas del abanico de posibles sensores, así como al propio HIF (68).

Recientemente, se ha relacionado a otra molécula gaseosa, el sulfuro de hidrógeno (H₂S) con la respuesta secretora en las células glómicas, debido a la presencia de la enzima que la sintetiza, la cistationina- γ -liasa (CSE), y cuya actividad se ve potenciada en situaciones de hipoxia. De hecho, la supresión génica de esta proteína, así como inhibidores farmacológicos de la misma, provocan una marcada reducción de la actividad aferente del CC ante el estímulo hipóxico. Además, la generación de H₂S inducida por la escasez de O₂ parece estar inversamente relacionada con la HO-2, dado que el CO que produce se uniría a residuos específicos de la CSE, provocando la inhibición de esta enzima (115).

1.2.3. Canales de K⁺ regulados por O₂

En cuanto a la naturaleza del canal de K⁺ cuya corriente iónica es inhibida por la hipoxia, en el año 1988 se obtuvo un primer resultado en preparaciones de CC de conejo, donde los canales implicados estaban regulados por voltaje (36, 116). Desde entonces, los estudios llevados a cabo han sido numerosos y, aún hoy día, no existe un acuerdo demostrable entre las distintas alternativas planteadas. De hecho, los canales de K⁺ sensibles a hipoxia difieren entre especies animales, incluso entre los distintos tipos de células neurosecretoras. Aún así, esta diversidad no cuestiona el modelo de quimiotransducción de la señal.

Actualmente, se puede hablar de tres categorías principales de estos canales de K⁺ en las células tipo I del CC (49). Por un lado, aquéllos que están regulados por el potencial de membrana, denominados “canales K_v”, que se activan por despolarización, y cuya familia comprende hasta nueve miembros (desde el K_v1 hasta el K_v9), con una amplia variedad de isoformas de cada uno de ellos (117). Por otro lado, existen canales de K⁺ de gran conductancia que se activan tanto por voltaje como por los niveles intracelulares de Ca²⁺; son los canales “maxi-K⁺”,

también conocidos como $K_{Ca^{2+}}$ o canales BK_{Ca} (118). Por último, se incluyen los canales K_{2P} , de descubrimiento relativamente reciente (119-121), caracterizados por presentar una estructura con cuatro segmentos transmembrana y dos dominios formadores de poro (Figura 6B). Estos canales, a diferencia de los anteriores, no dependen del voltaje para su activación, sino que conducen una corriente continua de iones de K^+ a potenciales negativos, contribuyendo así al mantenimiento del potencial de membrana en reposo (< -60 mv). Debido a este flujo basal, también se les denomina “canales de fuga”. En células glómicas de rata, solamente se han encontrado representantes de estas dos últimas familias de canales de K^+ regulados por O_2 (118).

Datos experimentales realizados en rodajas de CC de rata mostraban una respuesta idéntica de secreción con bloqueantes farmacológicos específicos de los canales tipo maxi- K^+ , sugiriendo una participación activa de los mismos en el inicio de la cascada de señalización ante descensos arteriales de O_2 (122). Sin embargo, el hecho de que la medida secretora de catecolaminas en ratones $HO-2^{-/-}$ manifestara unos valores normales (apartado 1.2.2.2), sugiere que estos canales no son imprescindibles para la misma, ya que se encuentran regulados positivamente por sustratos de la enzima (49, 67). Además, tienden a activarse a potenciales de membrana más positivos que los observados para las células tipo I por lo que, para contribuir al inicio de la respuesta quimiosensora, tendrían que abrirse a valores próximos al potencial de membrana en reposo de la célula glómica (49). Por otro lado, el mantenimiento de la sensibilidad a O_2 en presencia de iberiotoxina demostró que estos canales maxi- K^+ no eran esenciales para desencadenar el mecanismo de secreción (67).

A nivel mecánico, los canales de fuga de K^+ se mantienen activos en un amplio rango de voltaje. Por ello, se han convertido en los principales elementos de estudio en el campo de la sensibilidad a la hipoxia aguda.

1.2.3.1. *Quimiosensibilidad de los canales de K^+ tipo TASK (TWIK-1-related acid-sensitive K^+ channel)*

La familia de canales K_{2P} comprende varios subtipos. Todos ellos comparten la característica común de contribuir a las corrientes de fuga que mantienen el potencial de reposo de la célula. No obstante, cada uno es modulado por determinados agentes fisiológicos (pH, glucosa) y farmacológicos, lo que los convierte en canales iónicos polimodales (123). Aunque todas las subunidades tienen la misma estructura de cuatro segmentos transmembrana y dos dominios de poro (P1 y P2) dispuestos en tándem, con el filtro de selectividad iónica entre el primer segmento y el dominio P1 (Figura 6B), la secuencia aminoacídica es diferente. Dentro de los distintos subgrupos se puede distinguir alguno como el de los canales TWIK (del inglés, *tandem of P domains in weak inward rectifier K^+ channels*) o el de los TASK (Figura 6A). En este último, los miembros más relevantes son el TASK-1 (también llamado $K_{2P3.1}$) y el TASK-3 ($K_{2P9.1}$) (123).

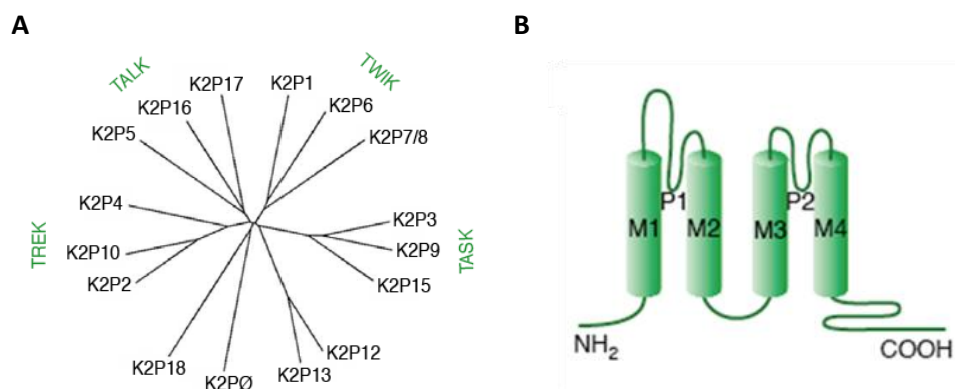


Figura 6. A. Familia de canales K_{2P}, que comprende una amplia variedad de miembros, cada uno con distintas propiedades farmacológicas y funcionales, aunque todos comparten la particularidad de mantenerse activos a potenciales de membrana en reposo. Los canales pertenecientes a la subfamilia TASK son inhibidos a pH ácidos y activados por determinados agentes anestésicos, como el halotano. B. Estructura básica de un canal K_{2P}, con cuatro segmentos transmembrana (M1-M4) y dos dominios de poro dispuestos en tándem (P1-P2). Los extremos amino y carboxilo se disponen en la parte citosólica.

Las propiedades biofísicas que presentan estos canales de membrana, así como su estimulación por anestésicos volátiles o su inhibición por determinadas sustancias, los han incluido dentro del grupo de moléculas quimiosensoras.

Los canales K_{2P} no sólo se encuentran en las células tipo I del CC, sino también en las neuronas de los centros respiratorios del cerebro (124-127), en los cuerpos neuroepiteliales (128), en los miocitos de la arteria pulmonar (129, 130), en las neuronas de la raíz dorsal del ganglio (131-133), en las células de las papilas gustativas (134, 135) y en las neuronas de orexina del hipotálamo (136, 137). En las células glómicas, se han registrado el TASK-1, el TRAAK (K_{2P}4.1), el TASK-3 y el TASK-2 (K_{2P}5.1) (138) (Figura 6A).

Estudios realizados en el año 2000 (139, 140) en torno a la corriente iónica implicada en el inicio de respuesta secretora a la hipoxia en el CC de rata, hacían referencia a una corriente de K⁺ sensible a O₂ y también a compuestos ácidos. Además, se trataba de una actividad basal en la célula, independiente del tiempo y del voltaje, y que resistía al efecto de los bloqueantes clásicos de los canales de K⁺ (40). En definitiva, concordaba con muchas de las características de los canales tipo TASK (140). Un claro ejemplo de la implicación de esta corriente en la sensibilidad a O₂ es el efecto estimulante que el halotano ejerce sobre la misma y que conlleva una disminución de la respuesta ventilatoria (140).

La funcionalidad de estos canales requiere que formen dímeros, incluso entre subunidades distintas, como ocurre en el caso TASK-1/TASK-3. En las células tipo I

de rata, se han registrado heterodímeros funcionales sensibles a hipoxia de estas dos subunidades, a pesar de que comparten tan sólo un 54% de identidad en su secuencia (141-144). De hecho, parecen representar la contribución máxima al mantenimiento del potencial de reposo en estas células respecto a otros canales K_{2P} (145, 146) por lo que, en un principio, estos dímeros TASK-1/TASK-3 serían un nuevo candidato a dirigir la respuesta de la célula glómica frente a la hipoxia. Sin embargo, los datos obtenidos por Trapp *et al.* (147) a partir de un ratón *knock-out* para los genes de ambos canales, $Kcnk3^{-/-}$; $Kcnk9^{-/-}$, indicaban que tan sólo el TASK-1 ($Kcnk3$) era importante para la transducción de la respuesta ventilatoria ante una exposición a hipoxia, lo que contradecía lo publicado en el caso de la rata. Una explicación a estos resultados contradictorios podría radicar en que, en el caso del ratón, las secuencias aminoacídicas de ambos genes difieren en un 11%; esta divergencia corresponde, principalmente, al extremo C-terminal (146).

El canal TASK-1 se caracteriza, en particular, por poseer un dominio de poro con una débil rectificación hacia fuera de la corriente de K^+ . Algunos autores lo presentan como un firme candidato a dirigir la respuesta de la célula glómica frente a la hipoxia (123, 147-149). En la línea celular HEK293 (del inglés, *human embryonic kidney 293*) con expresión estable del gen de TASK-1 ($Kcnk3$) también se ha observado sensibilidad a O_2 (150); sin embargo, en células cromafines inmortalizadas, la corriente de TASK-1 no presenta variaciones significativas frente a este mismo estímulo (151), lo que hace suponer nuevamente que el sensor sea una molécula independiente del canal iónico que, además, podría expresarse sólo en determinados tipos celulares. En este sentido, la modulación de la corriente TASK podría deberse a diferentes mecanismos, entre los cuales cabe destacar dos propuestas:

- 1) Se ha comprobado que, en parches de membrana escindidos, la corriente TASK disminuye rápidamente, pero la adición intracelular de ATP hace que recupere su actividad (152, 153). El efecto del ATP podría estar mediado por un mecanismo de fosforilación, implicando a una proteína quinasa que estuviese íntimamente asociada al canal, de manera que, en condiciones normóxicas, permitiese la formación de compuestos fosfatados (por ejemplo, el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) que modularan positivamente el flujo de iones a través del canal.
- 2) Considerando la posibilidad de que el sensor esté localizado a nivel de la membrana plasmática, existe una isoforma de la enzima NADPH oxidasa, la NADPH oxidasa-4 (NOX4) que aparece co-localizada en la membrana de las células glómicas junto con el TASK-1 (154). Los niveles de mRNA de esta enzima se inducen frente al estímulo hipóxico (155). Además, la inhibición del gen mediante siRNA insensibiliza al canal de K^+ ante los descensos de O_2 y, de forma análoga, en las mismas condiciones, su sobre-expresión potencia la inhibición del canal (154).

1.3. LAS HEMOPROTEÍNAS COMO SENSORES METABÓLICOS CELULARES

Desde bacterias hasta células de mamíferos existen muchos ejemplos de enzimas sensibles al O₂ que contienen un grupo prostético hemo. Un ejemplo real de este tipo de mecanismo se encuentra en eritrocitos, en los que existe una hemoglobina anclada a proteínas de membrana implicada en la regulación dependiente de O₂ de transportadores de iones (156, 157). También en bacterias facultativas anaerobias se han descrito hemoproteínas que actúan como sensores de O₂. Estos sistemas bacterianos están ampliamente estudiados y podrían ofrecer una aproximación al mecanismo sensor presente en mamíferos.

1.3.1. Sensores de O₂ bacterianos basados en la interacción con un grupo hemo

En general, en los sensores biológicos en los que se encuentra implicado un dominio de unión a un grupo hemo, éste actúa como un elemento regulador sobre una región efectora (histidinas quinasa, fosfodiesterasas, diguanilato ciclasas,...), dentro de la misma proteína, que se encarga de transducir la señal del estímulo captado por la interacción del ligando con el grupo hemo (158, 159). Se conocen cuatro familias de este tipo de proteínas sensoras, clasificadas según el tipo de dominio de unión a hemo: 1) las que presentan un dominio PAS (*Per-ARNT-Sim*, del inglés *Period, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator and single-minded*); 2) los sensores acoplados a globina (GCS, del inglés *globin-coupled-sensor*); 3) las proteínas CooA; y 4) las que unen NO (HNOB, del inglés *heme-NO-binding*).

Los sensores que contienen dominios hemo-PAS responden, específicamente, a O₂ o CO (160). Son muy versátiles, de manera que son capaces de mediar respuestas adaptativas a través de una modificación química de proteínas, controlando los niveles de segundos mensajeros intracelulares o regulando interacciones macromoleculares (161-165).

En bacterias, se han identificado sensores con dominio PAS (presente en el extremo N-terminal) en proteínas como FixL, *EcDos* y *AxPDEA1*. La proteína FixL aparece en bacterias fijadoras de nitrógeno, y lleva asociada una actividad histidina quinasa en el extremo carboxilo (163, 164, 166-170) de manera que, en ausencia de O₂, este dominio transmisor se autofosforila (171) y activa la unidad reguladora, que permite la expresión de genes diana (172). En cambio, cuando el O₂ se une al átomo de Fe del grupo hemo, la actividad quinasa se inhibe rápidamente (173). La fosfodiesterasa-1 de *Acetobacter xylinium* (*AxPDEA1*) requiere enlazar O₂ para regular de manera eficiente la excreción de celulosa al medio (174), una función muy alejada de especies como *Escherichia coli* o *Vibrio* que, sin embargo, presentan moléculas con secuencias homólogas a la región enzimática de *AxPDEA1* (175). De hecho, la proteína *EcDos* (del inglés, *E. coli direct oxygen sensor*) no sólo comparte esa zona fosfodiesterasa con *AxPDEA1* sino que la homología se extiende a otras regiones de la secuencia (161, 175). Además de actuar como sensor de O₂, es capaz de enlazar otras moléculas como CO y NO, que también impulsan la

actividad fosfodiesterasa localizada en la región C-terminal (176). Incluso *EcDos* parece detectar también los niveles *redox* intracelulares (1, 177). Sin embargo, la detección de CO y NO en condiciones fisiológicas es muy débil (175), a diferencia de lo que sucede en el caso del O₂.

Dentro de la secuencia PAS, solamente nueve residuos se encuentran altamente conservados. El resto, son indicativos de las funciones sensoras específicas de cada proteína. Así, en los sensores de O₂ bacterianos, estas regiones incluyen los contactos directos con el grupo hemo y los ligandos del mismo, correspondientes a una His proximal y residuos distales alineados a la región de unión del ligando, respectivamente. Dependiendo de la relación filogenética de los organismos, el grado de identidad entre estas secuencias de sensores bacterianos es muy variable (160, 161, 165).

Las proteínas bacterianas HemATs se incluyen dentro de los sensores de O₂ acoplados a un motivo globina. Su descubrimiento demostró que no sólo este tipo de dominios funcionaban como transportadores del ligando sino que también ejercían una función reguladora (178). Además, se observó una cierta homología con la secuencia N-terminal de la mioglobina de vertebrados tan evolucionados como el cachalote, sugiriendo que, tal vez, podrían estar implicadas también en el almacenamiento de O₂. La familia HemATs incluye hasta treinta miembros diferentes, en los que se conserva el dominio tipo globina de unión a hemo. Este dominio sensor aparece acoplado a diversos transmisores implicados en la regulación de segundos mensajeros (179, 180).

1.3.2. La hemoglobina como proteína modelo de interacción con el O₂

La hemoglobina es una de las moléculas más estudiadas y caracterizadas, dada su importancia biológica para transportar el O₂ y el CO₂ dentro del torrente sanguíneo. Se trata de una proteína tetramérica, constituida por cuatro cadenas polipeptídicas globulares (diferentes según la ontogenia). Cada monómero de globina lleva asociado un grupo prostético hemo. En mamíferos, tras los primeros meses de vida, la hemoglobina mayoritaria (> 95%) es la hemoglobina A (HbA o HbA1), formada por dos cadenas α y dos β ($\alpha_2\beta_2$); el resto es HbA2, en la cual las cadenas β han sido sustituidas por δ -globinas ($\alpha_2\delta_2$). Además, pueden existir diversas especies de HbA, debidas a modificaciones postraduccionales de la hemoglobina con determinados azúcares. La hemoglobina fetal (HbF) consta de dos cadenas γ y dos α ($\alpha_2\gamma_2$), y se caracteriza por su especial capacidad para fijar el O₂ en el ambiente uterino, mayor que en el caso de la HbA. Esta HbF es el componente mayoritario en el recién nacido. Las hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) y Portland ($\zeta_2\gamma_2$) son embrionarias, y sólo aparecen durante los primeros meses de gestación (181); al parecer, las cadenas ϵ y ζ se sintetizan en el saco vitelino y, paulatinamente, son reemplazadas por las cadenas β , γ y δ (182).

Cada uno de los monómeros de globina cuenta con genes propios. Los genes α y β

son independientes y se ubican en cromosomas distintos. En humanos, el grupo α se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 (en rata, en el cromosoma 10) y, además de dos copias del gen α que se expresan durante las fases fetal y adulta, contiene los codificadores de la cadena ζ y dos pseudogenes no funcionales (183). El grupo β se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11 (cromosoma 1, en el caso de rata), e incluye los genes de las cadenas γ , δ y ϵ . Dentro de cada una de estas dos familias, los genes se activan e inactivan de modo coordinado durante los diferentes estadios del desarrollo del individuo. Cuando se completa el proceso traduccional, la cadena de la globina se separa del ribosoma y, rápidamente, forma dímeros $\alpha\beta$ y tetrámeros funcionales $\alpha_2\beta_2$. Los estudios realizados acerca de la regulación de estos genes, condujeron al descubrimiento de un gen que se expresaba en altos niveles en los eritroblastos (precursores eritroides en los que se sintetiza la hemoglobina) que codifica una proteína chaperona denominada, indistintamente, AHSP (del inglés, *alpha hemoglobin stabilizing protein*) o ERAF (del inglés, *erythroid-associated factor*) (184, 185). Esta proteína se une de manera específica a las cadenas α cuando aún no se han formado los dímeros con la β globina; de este modo, se impide que precipiten y formen inclusiones citoplasmáticas (cuerpos de Heinz) que afectarían a la membrana y conducirían a la lisis del hematíe.

La síntesis del grupo hemo es ubicua, aunque más acusada en la médula ósea y el hígado, debido a la necesidad de incorporarlo a la hemoglobina y a los citocromos, respectivamente. Este grupo prostético es un factor fundamental en la regulación de la tasa de síntesis de la globina (186). Su principal efecto lo ejerce en el inicio de la traducción, donde bloquea la acción de un inhibidor de la producción de la cadena peptídica (187).

Las hemoglobinas están presentes en todos los reinos de la naturaleza, con determinadas especializaciones según las necesidades de cada organismo (181, 188, 189). Uno de los ejemplos más llamativos de la importancia vital de esta proteína en los sistemas biológicos se encuentra en los eritrocitos, donde participa en el intercambio de O_2 y CO_2 entre los pulmones y los tejidos. De hecho, cuando es necesario transportar eficientemente O_2 a tejidos con intensa actividad respiratoria, la hemoglobina se sintetiza en grandes cantidades. También se generan cantidades pequeñas de proteínas como la mioglobina y la hemoglobina no simbiótica de las plantas cuando se requiere un sistema intracelular rápido de liberación de O_2 , como sucede en la mitocondria y el cloroplasto (188). Si, al igual que en bacterias, el sistema de transporte de electrones no está separado del compartimento intracelular, las hemoglobinas pueden utilizarse, bajo condiciones hipóxicas, para ceder O_2 como aceptor final de electrones. Por tanto, existe una conexión evolutiva entre las hemoglobinas que transportan O_2 , los citocromos que pasan electrones a través de la cadena respiratoria y la fotosíntesis, y las demás hemoproteínas que catalizan reacciones *redox* (190, 191, 192). Por otro lado, la hemoglobina es capaz de unir NO con el fin de regular los niveles de este mensajero biológico y sus derivados (189, 193, 194) y, al mismo tiempo, contribuye

al transporte de esta molécula hacia los tejidos para producir vasodilatación en respuesta a una disminución en los niveles de O₂ (195, 196). También en invertebrados (artrópodos, anélidos y nematodos) se han encontrado hemoglobinas que, claramente, están relacionadas con la hemoglobina de vertebrados. Todo ello hace suponer la existencia de un gen ancestral común de la hemoglobina que precede a la divergencia de procariontas y eucariotas (188, 192, 197-199).

Recientemente se han descubierto dos nuevas globinas en ratones y humanos, denominadas neuroglobina (NGB) y citoglobina (Cygb) (200). El porcentaje de identidad entre las dos especies se sitúa en torno al 95% en ambos casos (200, 201), lo que sugiere que son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución. Las dos comparten las mismas propiedades estructurales y fisiológicas (202). La similitud con la hemoglobina es tan sólo de un 25% y, a diferencia de lo que ocurre en el resto de las globinas, en éstas todos los enlaces del átomo de Fe se encuentran coordinados (203). La hexacoordinación es un mecanismo que regula la unión del ligando con la hemoproteína, a través de una competición entre un ligando externo y una His distal de la globina. La NGB se expresa principalmente en el cerebro, aunque a niveles relativamente bajos (200), actuando como un monómero que une O₂ de forma reversible. Las funciones de esta proteína se han relacionado con el transporte de O₂ (facilitando su difusión a la mitocondria), con procesos enzimáticos (funcionando como NADH oxidasas) que promueven la generación glicolítica de ATP bajo condiciones semi anaerobias, como detoxificador de NO y como sensor de O₂ (202-208). Sus características espectrales de unión del O₂ son semejantes a las de la mioglobina de los vertebrados, lo que sugiere una función similar (suplemento de O₂) pero a nivel cerebral. Aún así, no hay consenso sobre la función fisiológica de esta proteína (209). A diferencia de lo que ocurre con la NGB, la Cygb tiene una expresión ubicua en vertebrados, y también se relaciona filogenéticamente con la mioglobina. Así, esta última parece ser una especialización muscular de una globina intracelular que tiene una amplia distribución tisular. Las funciones descritas para la Cygb son análogas a las propuestas para el caso de la NGB (202).

1.3.3. Expresión y funcionalidad de la hemoglobina en células no eritroides

A pesar de la amplia distribución de las hemoglobinas en la naturaleza, su expresión en animales vertebrados se ha restringido, clásicamente, a las células de la línea eritroide, esto es, glóbulos rojos y todos sus precursores, donde la producción de los dos tipos de cadenas polipeptídicas (α y β) es un proceso altamente coordinado. Sin embargo, en los últimos años se ha tenido constancia de que células completamente alejadas de este linaje, tales como los neumocitos tipo II, los macrófagos o las células mesangiales, entre otras, expresan determinadas cadenas polipeptídicas de la hemoglobina (69-74). Los estudios que se han llevado a cabo en este campo se centran, sobre todo, en el análisis de la expresión de estas globinas, mientras que los datos que se tienen acerca de la

funcionalidad de las mismas son escasos o poco precisos. En general, se tiende a considerar la hemoglobina no sólo en su actuación clásica de transporte de O₂, sino como una molécula de defensa contra las especies reactivas de O₂ y de N₂ que se generan en esas áreas concretas del organismo (192-194).

La primera evidencia de la expresión de cadenas de hemoglobina en células no eritroides se obtuvo en macrófagos de ratón. Estas células, activadas por citoquinas, representan un modelo establecido para la producción de NO, debido a la inducción de la NO sintasa (110, 210-214). Sorprendentemente, se vio que la expresión de la subunidad β^{minor} de la hemoglobina también se activaba por esa inducción celular (72). En eritrocitos, tal como su propio nombre indica, la expresión de esta cadena es minoritaria, ya que compete con la β^{major} , que es la que compone la HbA1 y que es mucho más activa (215). Ello hace suponer que, en estos macrófagos activados, la regulación transcripcional del gen de la β^{minor} es diferente a la que ocurre en las células eritroides. No obstante, la función de esta hemoglobina no está definida ya que, si en un principio se podría pensar en un rol protector frente a especies reactivas de N₂ (NOS), de un modo análogo a las flavohemoglobinas bacterianas, el consumo de NO no se ve alterado con la presencia de esta proteína (72).

El epitelio alveolar del pulmón se compone de dos tipos de células, AEC I (del inglés, *alveolar epithelial cells type I*) y AEC II. Éste último es el encargado de secretar el surfactante pulmonar, además de ser precursor del otro tipo celular (216-221). Se ha comprobado que los dos componentes proteicos de la HbA (cadenas α y β) están presentes, de manera exclusiva dentro del parénquima pulmonar, en estas células tipo II y en las células de Clara, localizadas estas últimas en los bronquiolos terminales (antes de llegar a los alvéolos). Dado que se encuentran próximas al aire atmosférico y a los vasos sanguíneos, se ha sugerido que la función de su hemoglobina estaría ligada a facilitar el transporte de O₂ por esa barrera ambiental. También se ha especulado con una actuación directa como sensor de O₂ y con la protección frente al estrés oxidativo y los derivados del NO, en cuyo caso esta hemoglobina pulmonar estaría eliminando O₂ y NO en el epitelio alveolar (70, 73).

Otro tipo celular en el que se han registrado las cadenas α y β son las células mesangiales del riñón (74). Además, de manera análoga a lo que ocurre en el tejido pulmonar, tan sólo estas células del mesangio contienen hemoglobina, a diferencia del resto de tipos celulares adyacentes. Sin embargo, aunque en un principio parecía que los cultivos primarios realizados desde estas mismas células conservaban la hemoproteína y, por tanto, corroboraban los resultados obtenidos, después de los primeros pases se perdía la expresión (83, 186, 197), si bien está comprobado que, en particular, el mantenimiento de un cultivo de células mesangiales termina afectando, de manera global, a los perfiles de expresión génica (222, 223). Las patologías renales convergen en una disminución de la cantidad de O₂ que recibe el órgano. En esta situación de hipoxia, Nishi *et al.* (74)

observaron una inducción de la expresión de esa hemoglobina renal. Desde el punto de vista conformacional, las cadenas polipeptídicas no sólo se presentaban como monómeros (17 kDa), sino que también se agrupaban en homodímeros y heterodímeros cuyo peso molecular correspondía al del tetrámero de la hemoglobina sanguínea (68 kDa) (181). Los estudios funcionales realizados concluyeron que estas globinas renales intervienen de manera activa en la defensa contra el estrés oxidativo de la célula a través de un mecanismo de detoxificación de compuestos altamente oxidantes. No obstante, aún se mantiene la cuestión de por qué, tal y como sucede en otras áreas del organismo, la hemoglobina se expresa de manera específica en determinados tipos celulares. En este contexto renal, se sabe que el estrés oxidativo inducido por la generación de radicales libres es el principal mecanismo desencadenante del fallo renal que conduce al daño celular, seguido de una proliferación de las células mesangiales, fibrosis y, en último término, esclerosis glomerular (224, 225). La exposición de estas células mesangiales a situaciones patológicas tales como la hiperglucemia, los ácidos grasos libres o, incluso, la angiotensina II, incrementan la producción de ROS (226-229) por lo que se especuló que, además de los sistemas antioxidantes clásicos (ácido úrico, glutatión, catalasa, superóxido dismutasas,...), la presencia exclusiva de la hemoglobina en estas células podría tener un papel fisiológico como proteína de defensa de los antioxidantes endógenos.

En estudios realizados en ratones, también se ha detectado la presencia de las cadenas α y β en determinadas áreas cerebrales, tales como las neuronas de la corteza, del hipocampo, del cerebelo y del estriado, situándose principalmente a lo largo del axón y en las dendritas (71). En estas zonas hay un aporte suplementario de O_2 , un efecto que se relaciona directamente con esta hemoglobina neuronal. Además, y al igual que ocurre en el torrente sanguíneo, la sobre-expresión de hormona eritropoyetina (EPO) en estas mismas células (230-232) ante episodios de hipoxia estimula la producción de hemoglobina, solucionando así los problemas de la falta de O_2 en estas zonas críticas, antes incluso de la respuesta compensatoria en la médula para la generación de precursores eritroides (233). El hecho de que la hemoglobina se exprese en células en las que también se localiza la NGB, ha llevado a pensar en un mecanismo de interacción que relacione ambas hemoproteínas, a pesar de que la distribución subcelular es diferente. Así, estos autores han propuesto un modelo según el cual la hemoglobina neuronal uniría el O_2 procedente de la circulación sanguínea y lo llevaría hasta el soma de la neurona, donde se encuentra la NGB (200), que sería el transportador final desde el cual el O_2 se repartiría a los lugares necesarios dentro de la célula para el correcto mantenimiento de la comunicación interneuronal.

El dato más reciente en relación a la expresión de hemoglobina en células no eritroides se debe a Biagioli *et al.* (69), que observaron que las neuronas A9 de la *substantia nigra* expresaban las dos cadenas polipeptídicas de la HbA1. Estas células se engloban en el conjunto del sistema mesencefálico dopaminérgico, la principal fuente de dopamina en el cerebro que incluye, además, otro tipo

neuronal (A10) situado en el área tegmental ventral (más conocida como VTA). Las neuronas A9 forman la vía nigroestriatal y están implicadas en la regulación del movimiento voluntario y reflejos posturales del organismo. Es por ello que la degeneración de estas células es el principal desencadenante de la enfermedad de Parkinson (234). Los experimentos de inmunohistoquímica realizados indicaban que las cadenas α y β de la hemoglobina aparecían mayoritariamente en las neuronas nigroestriatales, mientras que tan sólo un pequeño porcentaje (< 5%) de las células de la VTA eran positivas para el marcaje. También observaron el mismo patrón de expresión en oligodendrocitos y en los astrocitos de la corteza y del hipocampo, tal como ya demostraron Dominik *et al.* (71). El análisis se contrastó en roedores (rata y ratón) y en el cerebro humano (*post-mortem*) sugiriendo, pues, que la presencia de estas dos globinas en estas zonas está conservada entre diferentes especies (69). Sin embargo, desde el punto de vista transcripcional, el resultado era opuesto, apareciendo mRNA de α y β hemoglobina en un amplio porcentaje de neuronas A10 y tan sólo en unas pocas células del tipo A9. Esto planteó la posibilidad de que la hemoglobina se encuentre regulada a nivel post-transcripcional. Los estudios funcionales se llevaron a cabo mediante la sobre-expresión estable de ambas hemoproteínas en una línea celular murina (MN9D) que representa un modelo *in vitro* para el análisis fisiológico de células dopaminérgicas (235, 236). Los resultados de esta modificación genética indicaban que esta hemoglobina cerebral actúa sobre los principales elementos de la homeostasis del O₂, funcionando como una reserva del mismo que proporciona un mecanismo adaptativo ante una situación de anoxia, lo cual es especialmente necesario en las neuronas A9, dado su alto metabolismo energético y su elevada actividad mitocondrial (237-239). El hecho de que la expresión de hemoglobina en el cerebro se extienda a otros tipos celulares como los oligodendrocitos, podría deberse a su localización adyacente a las neuronas, proporcionándoles de este modo una provisión de O₂ suplementaria para el mantenimiento del metabolismo aerobio en condiciones de anoxia. Por otro lado, se vio que la sobre-expresión de las dos globinas afectaba considerablemente a los genes de las subunidades de los complejos mitocondriales, que se inducían ante la presencia de elevadas cantidades de hemoglobina. En vista de este resultado, cabe correlacionar la molécula de hemoglobina con la patología del Parkinson, puesto que está descrita la deficiencia en subunidades del complejo I mitocondrial en el sistema nervioso de pacientes (240), así como en modelos animales en los que se induce la enfermedad. Parece, pues, que la hemoglobina podría desempeñar un papel importante en el control de la función mitocondrial en condiciones normales y patológicas. Una célula sometida a una alta actividad mitocondrial suele sufrir, consecuentemente, estrés oxidativo. En este sentido, tal como sugerían publicaciones anteriores, la hemoglobina ejercería, además, una labor antioxidante (74) que, según los datos de expresión génica llevados a cabo en las células transfectadas de manera estable, estaría mediada por agentes detoxificantes (glutación peroxidasa, superóxido dismutasa -isoforma mitocondrial-, peroxirredoxina, tiorredoxina y tiorredoxina reductasa).

Todos estos resultados indican que la hemoglobina no se expresa de manera exclusiva en las células de la línea eritroide, tal como se creía desde hace décadas. Además, su localización parece ser muy específica incluso dentro de un mismo órgano o tejido, lo que hace aún más interesante el estudio de la funcionalidad de estas moléculas “no sanguíneas”. Parece, sin embargo, que todas ellas tienen el nexo común de proteger a la célula frente al daño oxidativo. No obstante, las propias publicaciones imperan la necesidad de ahondar en el conocimiento de la contribución de estas hemoglobinas a la fisiología celular.

1.4. NUEVAS TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA LA BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS SENSORAS EN EL CUERPO CAROTÍDEO

A pesar de los avances realizados en torno a la fisiología celular del CC, los mecanismos moleculares subyacentes a la sensibilidad a la tensión arterial de O₂ de la célula glómica son aún desconocidos.

Son muchos los grupos de investigación implicados en desentrañar este enigma, de ahí la variedad de hipótesis propuestas. Sin embargo, existe un inconveniente común a todos ellos que paraliza un avance más rápido en el conocimiento de la naturaleza de la/s molécula sensora, y es el pequeño tamaño de este órgano, que impide realizar determinados experimentos moleculares, bioquímicos y biofísicos. Asimismo, el hecho de que el estímulo sea gaseoso y, por tanto, fácilmente difusible a través de las membranas celulares, dificulta el mantenimiento estricto de las condiciones ambientales deseadas en las cámaras que se utilizan para los estudios *in vitro*. Por otro lado, las respuestas que las células glómicas aisladas generan ante la escasez o ausencia de O₂ en ensayos electrofisiológicos, se pierden frecuentemente debido al deterioro de la célula durante el tratamiento enzimático y mecánico previo al registro de *patch clamp* que, pese a ello, se requiere para su dispersión; además, estas técnicas analíticas son muy susceptibles a modificaciones debido a variables experimentales incontrolables, tales como la temperatura, la velocidad del flujo de la solución de registro, etc. Finalmente, algunos de los posibles mecanismos de sensibilidad a O₂ propuestos se han inferido a partir de tratamientos farmacológicos (por ejemplo, inhibidores de los complejos mitocondriales) que, sin embargo, podrían tener efectos inespecíficos sobre la fisiología celular (94, 241) y, en consecuencia, conducir a conclusiones erróneas.

En el año 2000, nuestro grupo de investigación desarrolló una nueva metodología en el estudio de la detección de los niveles de O₂ en el CC, con el objetivo de intentar mantener *in vitro* las condiciones fisiológicas en las que se encuentra la célula glómica y analizar su sensibilidad a diversos estímulos como la hipoxia o la hipoglucemia (122). Así, se estableció una preparación de secciones del órgano en forma de rodajas con un grosor de unos 150 µm que conservaba el ambiente fisiológico en el que está estructurado el CC (24, 122, 242). A partir de esta técnica

se podían obtener registros amperométricos de la cantidad de catecolaminas liberadas al espacio extracelular desde una única célula. Los datos obtenidos eran fácilmente reproducibles y con una dependencia directa de la intensidad del estímulo. Aunque inicialmente las preparaciones se realizaron en rata, más tarde se adaptaron a ratones, lo que ofreció la posibilidad de analizar la contribución de determinadas moléculas a la respuesta secretora del CC a partir de modelos animales modificados genéticamente (67, 99). No obstante, los ratones *knock-out* no deben considerarse infalibles a la hora de confirmar los resultados obtenidos, pues hay que tener en cuenta que la ausencia de determinados genes desde el desarrollo embrionario puede conllevar mecanismos compensatorios diferentes al verdadero proceso homeostático que se activaría en la vida adulta para la adaptación a los cambios repentinos del medio ambiente. Se impera, pues, la necesidad de nuevas técnicas experimentales de modificación genética que permitan obtener conclusiones inequívocas y relativamente rápidas de las investigaciones que se realicen en este campo.

En los últimos años, la terapia génica se ha enfocado en la búsqueda de nuevos vectores de transferencia de genes que tengan una mayor eficacia de expresión del transgén en la célula receptora. En este sentido, los vectores virales representan, hoy por hoy, un método efectivo y relativamente rápido para la modificación de la expresión génica de sistemas *in vitro* e *in vivo* y, por tanto, para la caracterización funcional de una determinada proteína, ya sea mediante la inhibición por interferencia (RNAi) del gen que la codifica y/o por la sobreexpresión de la misma. La utilización de estos métodos ofrece, incluso, la posibilidad de dirigir la transferencia génica a tejidos predeterminados, aprovechando la naturaleza de receptores de membrana específicos en la célula diana (tropismo). Además, se suelen incorporar genes de proteínas fluorescentes que se co-expresan en las células infectadas, actuando así como marcadores del proceso de transducción. Clásicamente, los sistemas víricos más utilizados han sido los retrovirus, los adenovirus, los herpesvirus y los virus adenoasociados (AAVs) (243). Cada uno de ellos presenta diversas ventajas e inconvenientes que los hacen apropiados para determinadas aplicaciones.

Así, los retrovirus son virus de RNA que tienen capacidad para albergar genes relativamente grandes y se integran de forma permanente en el genoma de las células infectadas. Dentro de la cápsida, contienen varias copias de la enzima transcriptasa reversa (retrotranscriptasa), que permite la síntesis de DNA complementario en la célula huésped utilizando como molde el RNA vírico. Como las proteínas del virus no son expresadas por la célula diana, no se genera respuesta inmunitaria. Es un sistema bien caracterizado y con un amplio uso en clínica e investigación (244). Sin embargo, su dependencia de la mitosis celular para entrar al núcleo restringe su utilización a células que se estén dividiendo. Este inconveniente no existe en el caso de los vectores lentivirales, pertenecientes a otro género de la misma familia y de descubrimiento posterior para fines terapéuticos, cuyo genoma es más complejo, ya que codifica proteínas para el

transporte del genoma viral (ya en forma de DNA de doble cadena) al núcleo de la célula y posterior integración (245). No obstante, la recombinación con el genoma es aleatoria, lo que supone el riesgo de producir mutagénesis insercional (246).

En los adenovirus, el genoma es DNA y, a diferencia de los anteriores, no se necesita la integración del mismo en el de la célula huésped. Por tanto, tampoco requieren que las células infectadas estén dividiéndose. La gran ventaja de este tipo de vectores es la alta eficacia de transducción y de expresión de la construcción génica. Sin embargo, esta expresión es transitoria, lo que obligaría a infecciones periódicas, un gran inconveniente dado que producen respuesta inmune celular e inflamatoria.

La propiedad de los herpesvirus para transducir únicamente neuronas limita mucho su uso en terapia génica. Además, mantienen en su genoma las secuencias que codifican para las proteínas líticas, lo que termina provocando la muerte de la célula.

Los vectores virales adenoasociados derivan de pequeños virus de DNA de cadena sencilla, no envueltos, de la familia *Parvoviridae* (subfam. *Parvovirinae*), que combinan las ventajas de los retrovirus y de los adenovirus. Así, pueden transducir tanto células en división como quiescentes y, además, no están implicados en ningún tipo de enfermedad humana, lo que facilita su manipulación. El mayor inconveniente es su reducida capacidad para el transgén, pese a la eliminación casi total del genoma viral para insertar ese DNA foráneo. Al no producir proteínas víricas, el riesgo de respuesta inmune en la célula diana está minimizado. Por sí solos, los AAVs son incapaces de replicarse. Para ello, necesitan la colaboración de otro virus (generalmente un adenovirus) que les proporcione las proteínas necesarias en el interior de la célula diana.

La tecnología de producción de AAVs recombinantes (AAVr) se basa en una triple transfección de tres plásmidos en células de la línea HEK293; uno de ellos, portador del transgén, y los otros dos con las secuencias de proteínas necesarias para la estructura y replicación del virión. Tras la infección de una célula con un AAVr, los eventos de integración ocurren con muy poca frecuencia; se mantienen como formas episomales dentro del núcleo. Ésta es una de las características más importantes de este tipo de vectores respecto a su utilización para la transferencia génica: su capacidad de persistir en la célula transducida en forma de molécula de DNA episomal transcripcionalmente activa. De este modo, se evita el riesgo de mutagénesis insercional.

Se han descrito más de cuarenta serotipos diferentes de este tipo de virus, los cuales tienen tropismo por diversos tejidos. Las diferencias antigénicas en las proteínas de la cápsida son las que dan lugar a esta variedad. El AAV-2, por ejemplo, presenta en la cápsida proteínas específicas que interaccionan con los proteoglicanos heparán sulfato de la superficie celular de neuronas (247). En el

sistema nervioso central, se han documentado altos niveles de expresión de AAV-2, AAV-1 y AAV-5 recombinantes durante largos períodos de tiempo, aunque con notables diferencias según las regiones (248).

En los últimos años, los AAVs han experimentado un intenso desarrollo encaminado a mejorar las ya de por sí ventajosas características que poseen. De hecho, el método convencional de producción de vectores recombinantes consistía en infectar un cultivo de células HEK293 con un adenovirus para proveer al AAV de las funciones de replicación. Posteriormente, se transfectaban con el plásmido con el transgén y con otro que proporcionaba los genes para proteínas no estructurales y proteínas de la cápsida. Más tarde, se consiguió sustituir la infección con el adenovirus por una transfección con un plásmido que portaba exclusivamente esas secuencias de replicación del “virus colaborador” que, además, incrementó notablemente el título de partículas virales (249, 250). También se ha conseguido paliar el inconveniente de la limitada capacidad del vector para el transgén, haciendo uso de la propia biología del virus, ya que su genoma es capaz de dimerizar y permanecer en la célula transducida como concatámero (251). Esto ha permitido transferir genes de mayor tamaño dividiéndolos en dos mitades para ser introducidos por sendos vectores (la parte del genoma viral que quedaría entre los dos segmentos del transgén se eliminaría introduciendo secuencias de *splicing*) (252, 253).

El uso de esta tecnología, aplicado al estudio de la sensibilidad a hipoxia en el CC, posibilita la generación de modelos *knock-down* en preparaciones de rodajas de tejido. Incluso, ofrecen la posibilidad de comprobar la reproducibilidad de la respuesta de la célula glómica frente al estímulo aplicado en esas mismas preparaciones interferidas (o provenientes de ratones *knock-out*) mediante vectores AAVr que impliquen una ganancia de función del gen en cuestión.

Recientemente, nuestro grupo de investigación descubrió que, dentro del CC, las células tipo II se comportaban como células madre desde las cuales se diferenciaban las células quimiosensoras (31). Así, en experimentos *in vitro*, se comprobó que esas células multipotentes eran capaces de proliferar hasta formar neuroesferas con una población heterogénea de células diferenciadas (tipo I) junto con otras que mantenían su capacidad proliferativa. A partir de datos amperométricos, se caracterizó la respuesta secretora de catecolaminas en presencia de estímulos como la hipoxia o la hipoglucemia, donde se vio que el patrón de secreción que mostraban estas neuroesferas era similar al de las rodajas de tejido. De este modo, se ha conseguido disponer de una nueva preparación de CC en la que analizar la contribución de determinadas moléculas a la sensibilidad a O₂.

En vista de la gran oportunidad que ofrecen hoy día los vectores virales y, en especial, los AAVs, sería muy útil aplicar esta técnica a las dos preparaciones disponibles aunque, en vista de la variedad de serotipos existentes, sería preciso

analizar previamente cuáles de ellos son los más eficientes para la transducción de células glómicas.

Apartado 2:

OBJETIVOS



2.1. OBJETIVOS GENERALES

El tema general de este trabajo se relaciona con la búsqueda de moléculas detectoras de los cambios en los niveles arteriales de O₂ en el CC, con el fin de determinar el mecanismo de quimiotransducción de la respuesta a hipoxia en las células sensoras. En particular, el estudio de la presente tesis está enfocado en moléculas que pudieran interactuar con el grupo hemo, debido a la capacidad de esta molécula para unir O₂.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En relación a ese estudio global se persiguieron, de manera más específica, los siguientes objetivos:

1. Estudio de la contribución de los canales iónicos de K⁺ TASK-1 y TASK-3 a la respuesta quimiosensora de las células glómicas del CC.
2. Análisis de la expresión y función de globinas en las células del CC y otros órganos simpatoadrenales.
3. Desarrollo de nuevas metodologías de manipulación genética, basadas en vectores virales, de las células tipo I del CC.

Apartado 3:

RESULTADOS



3.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS CANALES DE K⁺ TASK-1 Y TASK-3 EN LAS CÉLULAS GLÓMICAS DE CUERPO CAROTÍDEO

3.1.1. Búsqueda de moléculas sensoras de O₂ en organismos superiores por homología de secuencias

Desde el punto de vista evolutivo, la capacidad que presentan determinadas moléculas para detectar O₂ ha tenido una aparición temprana. De hecho, en la naturaleza existen moléculas bacterianas con dominios de unión a hemo que actúan como sensores de este gas (254, 255). Entre los diferentes tipos de esta unión, los dominios hemo-PAS constituyen uno de los más versátiles (160-165). Un ejemplo de ello es la proteína *EcDos* de *E. coli*, que detecta los niveles ambientales de O₂ mediante un grupo hemo. Así, en presencia de O₂, el residuo Met 95 de la molécula es desplazado de su unión con el átomo de Fe hacia una posición alternativa, induciendo un cambio conformacional que modifica la actividad del dominio catalítico (175).

Utilizando el programa BLAST, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas a la región sensora de *EcDos* en el genoma de rata. Como resultado, se encontró el canal de K⁺ TASK-1 con una homología baja. Cuando se analizó en detalle la distribución de la homología entre las dos secuencias, se observó que la identidad se encontraba dentro del extremo C-terminal de TASK-1. En concreto, esta región del canal corresponde con un lazo citoplasmático de función reguladora (256). La identidad entre las dos moléculas era de un 23% (Figura 7).

A partir de estudios electrofisiológicos, algunos autores han relacionado estrechamente este miembro de la familia TASK con la molécula sensora de O₂ en el CC (257, ver apartado 1.2.3.1). Incluso, dada la existencia de heterodímeros funcionales TASK-1/TASK-3, se ha especulado con la posibilidad de que ambos canales contribuyan de manera esencial a la sensibilidad a hipoxia que presenta la célula glómica (141-144). Sin embargo, el porcentaje de identidad de este segundo canal con la misma secuencia de *EcDos* fue tan sólo del 8%, que es la homología esperada entre secuencias no homólogas (Figura 7).

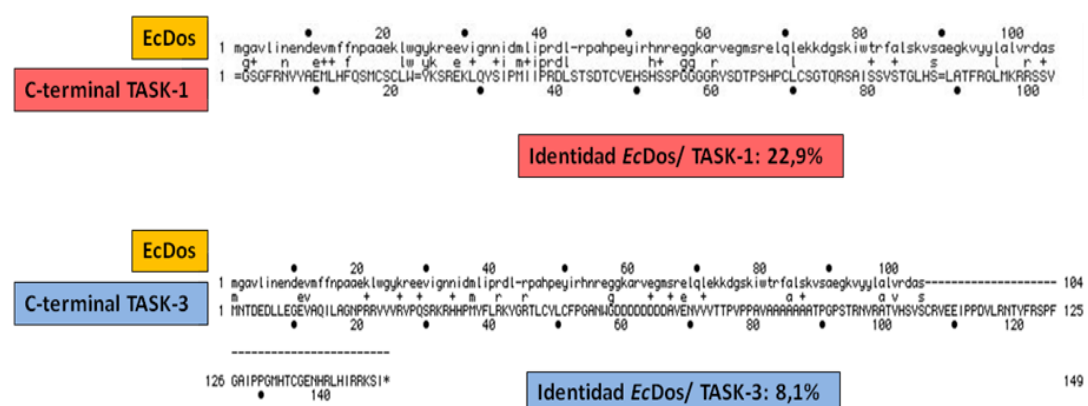


Figura 7. Comparación de secuencias aminoacídicas entre la región sensora de *EcDos* y los canales de K⁺ TASK-1 y TASK-3. El símbolo + indica similitud entre los dos aminoácidos.

TASK-1 y TASK-3 presentan entre sí una elevada similitud, excepto en esta región de función poco conocida, lo que parece indicar que existan regulaciones diferentes. Además, hay que tener en cuenta que la homología entre secuencias de proteínas pertenecientes a la familia de *EcDos* (todas bacterianas) se sitúa en torno a un 23%. Según esto, nos planteamos como hipótesis de trabajo que TASK-1 podría tener un motivo de unión a hemo similar al que presenta *EcDos*, que le permitiría enlazar O₂ reversiblemente y, en base a esta unión, modular su actividad.

Teniendo en cuenta estos datos, se planteó la generación de un ratón *knock-out* condicional del gen codificante de la proteína TASK-1 (*Kcnk3*) para determinar la contribución de este canal de K⁺ a los mecanismos detectores de O₂ en el CC.

3.1.2. Generación de un ratón *knock-out* condicional de *Kcnk3*

Para la generación de este animal se utilizó el sistema binario CRE/loxP, basado en la recombinación específica de sitio en el DNA a través de la enzima CRE (258). Esta recombinasa reconoce dos secuencias denominadas loxP, que se sitúan flanqueando el segmento del gen que se pretende escindir. La expresión de la enzima induce la recombinación entre los dos sitios loxP, que deben estar orientados en la misma dirección, provocando la escisión del DNA comprendido entre ambos y, por tanto, la delección génica deseada.

3.1.2.1. Construcción del transgén mediante el sistema CRE/loxP

El gen *Kcnk3* consta de tres exones (Figura 8A). Para la construcción génica, se decidió flanquear los extremos del segundo exón con secuencias loxP (Figuras 8B y 8C). El diseño del transgén incluyó, además, un gen marcador de resistencia al antibiótico neomicina (gen *Neo*) para facilitar la selección de células ES (del inglés, *embryonic stem cells*) de ratón donde introduciríamos la construcción por recombinación homóloga.

Así, a partir de una genoteca de DNA genómico de ratón en fagos λ , se realizó una búsqueda del fragmento del DNA correspondiente al exón 2 en bacterias mediante hibridación con dos sondas radiactivas, una para cada extremo de la secuencia, siguiendo las directrices del manual Sambrook *et al.* (259). Para la purificación del DNA vírico se utilizó el kit "Wizard® Lambda Preps DNA Purification System" (*Promega*). Durante este análisis por hibridación, se fueron comprobando en todo momento las secuencias génicas de los fagos seleccionados mediante PCR convencional. Una vez localizado el fragmento génico con el exón 2 de *Kcnk3*, la

extracción del mismo desde el DNA del fago se realizó mediante digestión con la endonucleasa de restricción *Sall* y se purificó a partir de la electroforesis en un gel de agarosa (Figura 8B). A continuación, se clonó en el vector plasmídico pBlueScript (pBS) (Tabla A-4 del Anexo), utilizando bacterias de *E. coli* de la estirpe DH5 α . La estrategia de clonación implicó la inserción a ambos lados del exón de las secuencias loxP, incluyendo el gen marcador adyacente al sitio loxP de la región 3', en la zona del intrón 2 de *Kcnk3* (Figura 8C). Estos tres fragmentos génicos se aislaron previamente a partir del vector comercial pGEM7-Neo-loxPII (Tabla A-4 del Anexo). La determinación de las moléculas recombinantes en cada paso se realizó mediante digestión enzimática del DNA plasmídico, extraído a partir de un cultivo bacteriano en medio líquido.

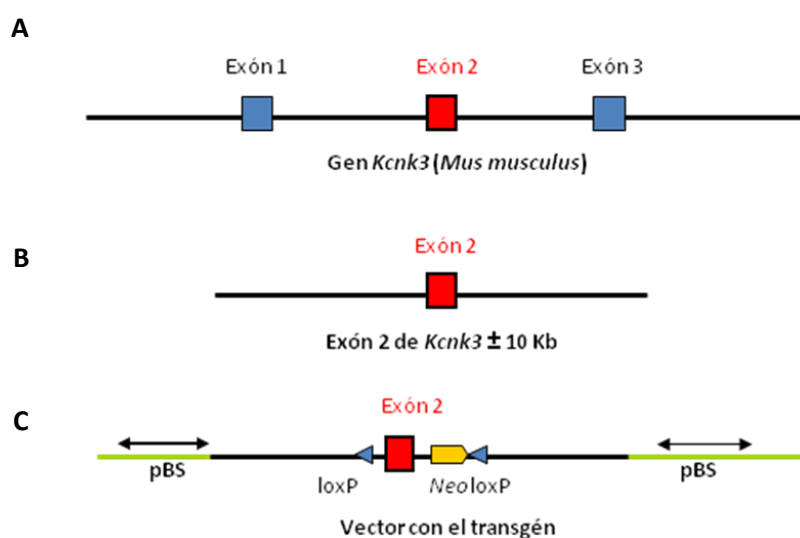


Figura 8. A. Esquema del locus *Kcnk3* de ratón. B. En una genoteca de fagos, se localizó el fragmento genómico que contenía el exón 2 (± 10 Kb) para su amplificación en bacterias. C. Esquema del plásmido pBS conteniendo el locus *Kcnk3* modificado. Las secuencias loxP flanquearon el exón 2 del gen, y se orientaron en la misma dirección para permitir la eliminación por recombinación del exón 2.

Una vez obtenido, el plásmido con el transgén fue amplificado en bacterias DH5 α y purificado a partir de cultivos en medio líquido LB (Luria Broth). Con el fin de eliminar sales que pudieran interferir en la entrada de este DNA en la célula ES, se dializaron unos 70 μ g del plásmido contra agua.

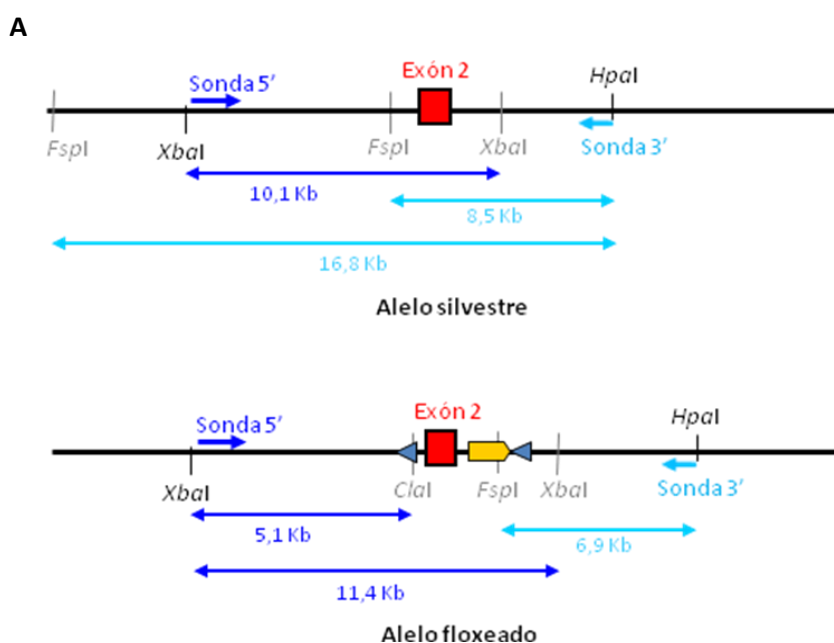
3.1.2.2. Selección de clones de células madre embrionarias recombinantes

En células ES de ratón de la estirpe 129SvJ, de rasgo agutí para el carácter color de pelo, se electroporaron unos 10 μ g del plásmido con el transgén. Estas células, que procedían de un cultivo confluyente en placa de 10 cm de diámetro, se

distribuyeron en sendas placas idénticas tras ser sometidas al pulso eléctrico. Transcurridas veinticuatro horas, el medio de crecimiento (Tabla A-3 del Anexo) se modificó por otro suplementado con neomicina, a una concentración de 200 µg/mL para comenzar así la selección de células que incorporaron el plásmido. A medida que la densidad celular se acercaba a la confluencia, se diluyeron hasta obtener un número total de diez placas. A partir de aquí, se mantuvieron en el mismo sustrato, cambiando el medio de cultivo cada vez que los nutrientes comenzaban a escasear. Transcurridos unos nueve-diez días, se empezaron a visualizar clones de células a simple vista. Aquéllos cuya morfología era característica de células indiferenciadas, se fueron aislando progresivamente hasta alcanzar un total de unos cuatrocientos. De todos ellos, se obtuvo una réplica idéntica en cultivo que se almacenó a -80°C.

Mediante *Southern blot*, se analizó el DNA genómico de cada uno de estos clones, utilizando sondas específicas (por separado) para los extremos 5' y 3' de la secuencia, previo tratamiento con las endonucleasas de restricción *Clal/XbaI* y *FspI/HpaI*, respectivamente (Figura 9). Este doble análisis permitió la selección de clones donde el transgén se había insertado por recombinación homóloga en el *locus Kcnk3*. El patrón de bandas correspondiente a los alelos silvestre y floxeado en los dos extremos de las secuencias fue el siguiente:

	Alelo silvestre	Alelo floxeado
Extremo 5'	10,1 Kb	11,4 Kb + 5,1 Kb
Extremo 3'	8,5 Kb	6,9 Kb



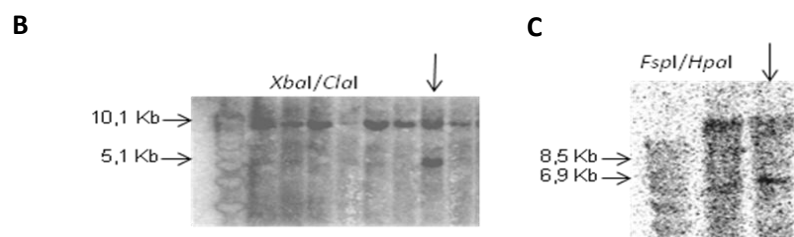
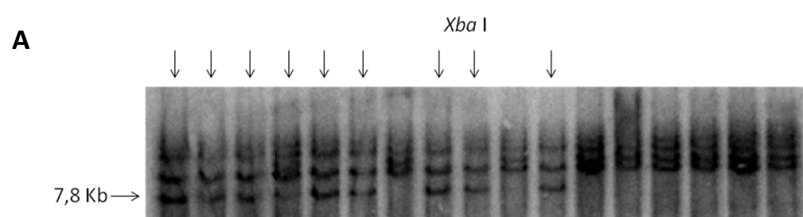


Figura 9. A. Representación esquemática de los fragmentos de DNA del alelo silvestre del gen de TASK-1 y del alelo floxeado resultantes tras la digestión enzimática con *XbaI/ClaI* y *FspI/HpaI* y su hibridación con sondas radiactivas específicas para los extremos 5'y 3', respectivamente. En color azul oscuro se representan las bandas correspondientes a la sonda 5' y, en azul claro, las generadas tras la hibridación con la sonda 3'. B y C. Análisis por *Southern blot* del DNA genómico de clones de ES. B. Hibridación con sonda radiactiva específica para el extremo 5' tras restricción con *XbaI/ClaI*. En todos los casos, se observó la banda de 10,1 Kb correspondiente al alelo silvestre pero, sólo en unos pocos, el otro alelo del gen *Kcnk3* fue recombinante. C. Hibridación con sonda radiactiva específica para el extremo 3' tras la digestión con *FspI/HpaI*. Aunque la resolución de la imagen es de baja calidad, se consigue apreciar el fragmento de 8,5 Kb correspondiente al alelo silvestre y, en el clon señalado, además, la banda específica (6,9 Kb) del alelo floxeado.

Los clones de células embrionarias en los que se había producido la recombinación homóloga de toda la secuencia del transgén con el *locus* silvestre tan sólo representaron el 1% del total de poblaciones analizadas. La réplica correspondiente a estos clones recombinantes se descongeló para su amplificación en placa. Llegadas a la confluencia, las células se congelaron nuevamente en crioviales estériles, para su transferencia a blastocistos.

Para comprobar la eficiencia del sistema CRE/loxP en nuestra construcción génica, se indujo la recombinación *in vitro* en aquellas células ES que integraron correctamente en su genoma el transgén. Para ello, se electroporaron con un plásmido que contenía el gen de la recombinasa y un marcador de selección frente al antibiótico puromicina (Tabla A-4 del Anexo). Después de ocho días de crecimiento en placa, se seleccionaron diecisiete clones según el mismo criterio morfológico que en el caso anterior y, tras digestión enzimática del DNA genómico con *XbaI*, se verificó la recombinación mediante *Southern blot* (Figura 10A). De este modo, se comprobó la delección de la secuencia del exón 2 de *Kcnk3* y del gen *Neo*, situado antes de la región loxP del extremo 3' (Figura 10B).



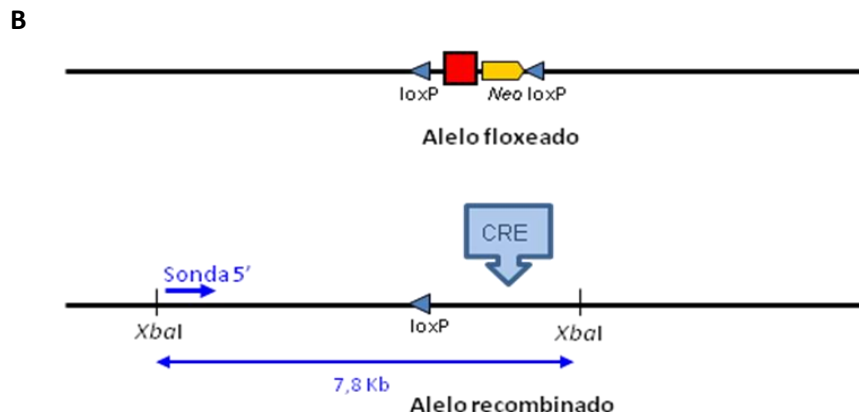


Figura 10. A. La hibridación con la sonda radiactiva para el extremo 5' tras la restricción con *XbaI*, daría un único fragmento de 7,8 Kb (flecha horizontal). Los clones positivos se muestran con flechas verticales. B. Acción de la enzima CRE sobre el alelo floxado. Como consecuencia de la recombinación, se deletiona el fragmento de DNA comprendido entre las secuencias loxP, impidiendo así la transcripción del gen *Kcnk3*.

A partir del DNA genómico de los clones que resultaron positivos para todos los análisis por *Southern blot* se comprobó, mediante PCR convencional (Tablas A-6 y A-7 del Anexo), si cada uno de los modelos obtenidos presentaba el patrón de bandas específico (Figura 11). Así, aquellas células en las que no se produjo la recombinación del transgén con el *locus* silvestre de *Kcnk3*, mantuvieron su genotipo original en ambos alelos, lo cual se visualizó en una banda de 317 bp. En cambio, en los clones que incorporaron la construcción correctamente, tan sólo se conservó intacto uno de los dos alelos (banda de 317 bp), mientras que el alelo floxado dio lugar a un amplicón de 436 bp. Utilizando los mismos oligonucleótidos, en la muestra de clones en los que se produjo la escisión del transgén por parte de la recombinasa CRE, apareció un patrón idéntico al genotipo silvestre, debido a la escisión del fragmento floxado. Por este motivo, se diseñaron cebadores específicos capaces de confirmar la delección génica (Tabla A-6 del Anexo), lo cual se reflejó en una sola banda de 627 bp (Figura 11).

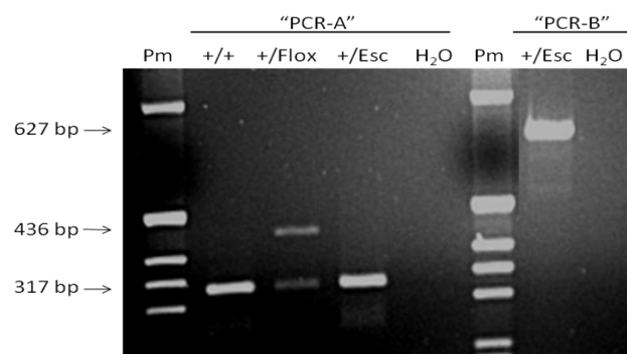


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del genotipado de clones de ES obtenido mediante PCR convencional. La PCR-A muestra los productos obtenidos a partir de los dos modelos transgenicos (+/F, +/Esc) y de un control silvestre (+/+). Los dos últimos carriles (PCR-B) corresponden a lo obtenido con oligonucleótidos específicos para el alelo escindido (+/Esc), una vez producida la recombinación por la enzima CRE. Pm: marcador de pesos moleculares. El tamaño de las bandas se indica con flechas.

3.1.2.3. *Generación de organismos quimera*

La microinyección en blastocistos de los clones positivos se realizó en el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla (CPYEA) por parte del Dr. Óscar Pintado, quien comprobó previamente la morfología de las células en cultivo, seleccionando las más idóneas para la transferencia. Seguidamente, los blastos se transplantaron a hembras pseudogestantes para completar la maduración de los mismos durante un período de diecinueveveintiun días.

De las hembras transferidas con las células recombinantes, nacieron animales quiméricos, con dos tipos celulares genéticamente diferentes: uno derivado del blastocisto original, y el otro de las ES recombinantes. El hecho de que las células ES pertenecieran a la estirpe 129SvJ, de pigmentación agutí, y los blastocistos procedieran de animales C57BL/6N, que desarrollan pelaje negro, permitió ver la doble coloración de las quimeras (Figura 12A). Sin embargo, estos animales mostraban un detrimento en el desarrollo, siendo considerablemente más pequeños que el resto de la camada con genotipo silvestre (color de pelaje negro) (Figura 12B).

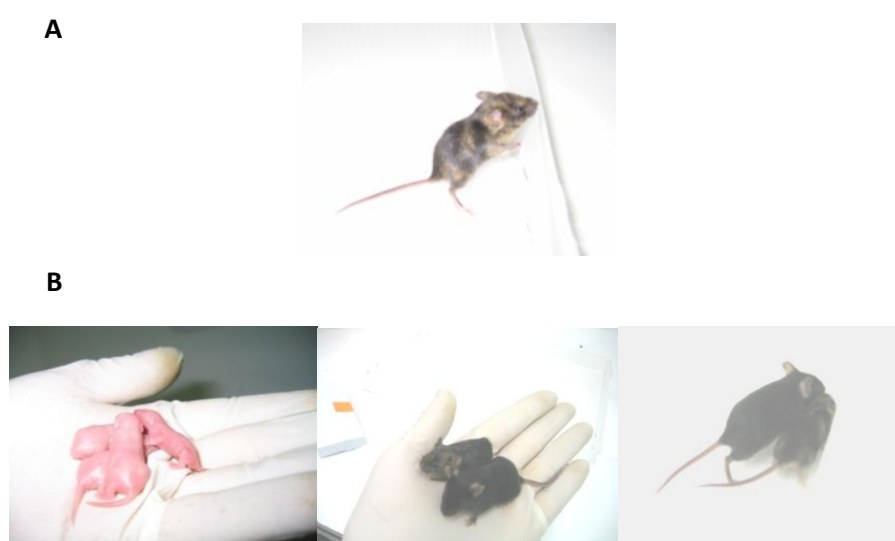


Figura 12. A. Organismo quimera generado por la transmisión del alelo floxeado de

Kcnk3. El color agutí indicó el porcentaje de la transferencia. B. En algunas camadas se observó una diferencia de tamaño entre los animales de genotipo silvestre y los mutantes.

La no transmisión del alelo floxeado por parte de los organismos quimeras se debió probablemente al mal estado de las células inyectadas tras su cultivo. La pérdida cromosómica durante el cultivo se asocia normalmente a un desarrollo defectuoso de las quimeras y a una baja transmisión en línea germinal.

La alternativa a este resultado habría sido realizar una nueva electroporación de la construcción génica en un vial diferente de células embrionarias. Sin embargo, otro grupo de investigación había generado recientemente un ratón *knock-out* completo de los canales de K^+ TASK-1 y TASK-3 (gen *Kcnk9*) simultáneamente (260). A pesar de que nuestro interés principal se centraba en modelos en los que inhibir la expresión del gen de forma aguda, se decidió reorientar el estudio de sensibilidad a O_2 en CC en este nuevo modelo.

3.1.3. Cuantificación de los niveles de mRNA de canales iónicos en el cuerpo carotídeo de ratones *knock-out* de *Kcnk3* y *Kcnk9*

A partir del ratón *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-}, cedido por la Dra. Isabel Aller (260), se generaron líneas aisladas de ratones *knock-out* de cada uno de estos canales, obteniendo tres modelos animales. Como controles del análisis del genotipado por PCR convencional (Tablas A-6 y A-7 del Anexo), se utilizaron organismos silvestres pertenecientes a la misma camada. En preparaciones de CC de estos modelos animales, se comprobó la ausencia de los genes codificantes de los canales TASK-1 y TASK-3 mediante RT-PCR convencional (Figura 13).

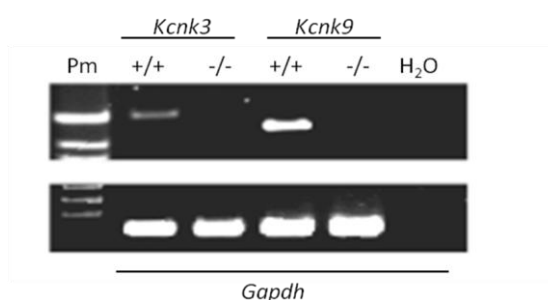


Figura 13. Análisis de expresión de los genes *Kcnk3* y *Kcnk9* en el CC de ratones *knock-out*. El gen codificante de la gliceraldehído-3P-deshidrogenasa (GAPDH) actuó como control de expresión en todos los casos. (*Kcnk3*, 515 bp; *Kcnk9*, 413 bp; *Gapdh*, 255 bp).

La ausencia en las células de estos canales que contribuyen a mantener el potencial de membrana en reposo podría dar lugar a un fenómeno de

compensación mediante la inducción de la expresión de otros canales de K⁺. Una primera aproximación a esta hipótesis se realizó en tejido cerebral de tres ratones *Kcnk3*^{-/-}, en los cuales se cuantificaron los niveles de mRNA codificante de la parte funcional (subunidad α) del canal Maxi-K⁺ (*Kcnma*) mediante PCR en tiempo real. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en relación a los controles silvestres (Figura 14).

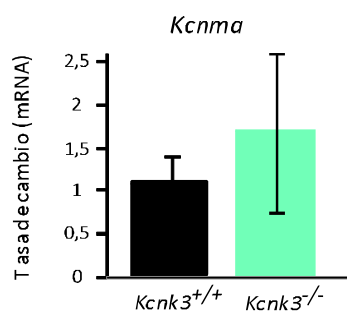


Figura 14. Análisis cuantitativo de la expresión de *Kcnma* en cerebro de ratones *knock-out* del gen *Kcnk3* en relación a controles de genotipo silvestre. El test *t*-Student reveló que las diferencias en los niveles de mRNA entre ambos tipos de animales no tenían significación estadística ($p = 0,49$). Los resultados se obtuvieron utilizando el gen de la ciclofilina (*Ppia*) como referencia ($n = 3$).

Datos electrofisiológicos obtenidos en nuestro laboratorio por el Dr. Levitsky en los dos modelos *knock-out* (*Kcnk3*^{-/-} y *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-}) indicaron que, en las células glómicas del CC, la amplitud de la corriente de K⁺ se mantenía intacta en el animal *Kcnk3*^{-/-}, mientras que en el doble mutante la densidad de la misma se reducía en torno a un 30% respecto a los correspondientes controles silvestres (261). Esta observación se vio apoyada por la tendencia a la disminución de la cantidad de mRNA codificante de la subunidad α del canal Maxi-K⁺ en preparaciones de CC del animal *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-}, aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 15A). En vista de que en este ratón las células glómicas presentaban una secreción basal de catecolaminas y una disminución de la corriente de Ca²⁺ en relación al genotipo silvestre e, incluso, al modelo deficiente en TASK-1 (261), era de esperar que el canal Maxi-K⁺, principal contribuyente a la corriente macroscópica de K⁺ en la célula, también estuviese regulado a la baja.

Por otro lado, se analizó la posibilidad de que determinados canales catiónicos de la subfamilia de los TRPC (del inglés, *transient receptor potential cation channel, subfamily C*), aparentemente implicados en el mantenimiento de una conductancia a Na⁺ en reposo y expresados en la membrana de las células glómicas (262), hubiesen alterado su expresión con el fin de compensar la ausencia de los dos canales tipo TASK. Así, se cuantificaron los niveles de mRNA de *Trpc6* (TRPC6) y de *Trpc7* (TRPC7), observándose una tendencia a la regulación a la baja en éste último (Figura 15C), mientras que la expresión del miembro 6 no se vio afectada (Figura

15B). Adicionalmente, se analizó si el canal TASK-5 (gen *Kcnk15*), relacionado estrechamente con TASK-1 y TASK-3 dentro de esta familia (123, 148), se encontraba de alguna manera modulado en el CC de ratones *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-}. Sin embargo, ni siquiera apareció significativamente expresado en este órgano (datos no ilustrados).

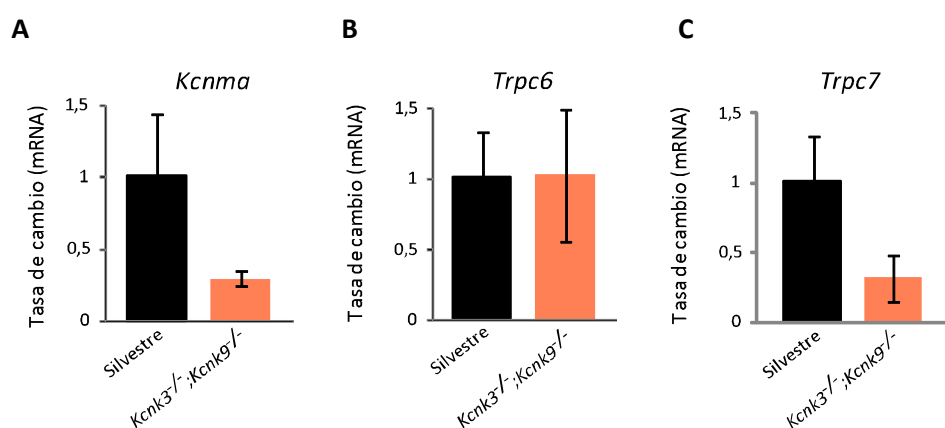


Figura 15. Análisis cuantitativo de la expresión del mRNA de *Kcnma* (A) y de los canales catiónicos *Trpc6* (B) y *Trpc7* (C) en CC de ratones *knock-out* de los genes de *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-} respecto a sus controles silvestres. A pesar de que el valor del test *t*-Student no fue significativo en ninguno de los tres casos (*Kcnma*, $p = 0,11$; *Trpc6*, $p = 0,97$; *Trpc7*, $p = 0,08$), se observó una marcada tendencia a la regulación a la baja del canal TRPC7 y de la subunidad α , mientras que el TRPC6 no se vio afectado por la falta de los dos canales TASK. En todas las comparaciones realizadas, la normalización se realizó frente al gen de la ciclofilina ($n = 4$).

Parece, pues, que la ausencia de TASK-1 y TASK-3 conlleva modificaciones en los parámetros electrofisiológicos de las células glómicas que implican una reorganización de las corrientes iónicas en el CC. Estos ajustes, sin embargo, no son suficientes para mantener la cantidad de corriente normal de estas células (261).

3.1.4. Caracterización histológica del cuerpo carotídeo de ratones *knock-out* de *Kcnk3* y de *Kcnk3* y *Kcnk9*

Con el fin de determinar si el CC de estos ratones *knock-out* presentaba alguna diferencia histológica respecto a los animales de genotipo silvestre, se llevaron a cabo marcajes inmunohistoquímicos de la bifurcación carotídea usando anticuerpos contra la enzima tirosina hidroxilasa (TH), tanto en el modelo doble mutante como en el ratón deficiente en TASK-1. Las observaciones realizadas no revelaron diferencias aparentes entre los dos tipos animales respecto a los controles. Además, tanto la morfología de las células glómicas como la cantidad de enzima presente en las mismas fueron similares. En todos los casos, se apreció la organización glomerular característica de estas células tipo I dentro del órgano (Fi-

gura 16).

Adicionalmente, la conformación de parche escindido en los experimentos de *patch clamp* (Dr. Levitsky) indicó que la capacitancia (C) en las células glómicas de los dos modelos mutantes ($Kcnk3^{-/-}$: $n = 29$: $C = 2,7 \text{ pF} \pm 0,1$; $Kcnk3^{-/-}; Kcnk9^{-/-}$: $n = 28$: $C = 2,9 \text{ pF} \pm 0,1$) era similar al tipo silvestre ($n = 25$: $C = 2,9 \text{ pF} \pm 0,1$), demostrando así que el tamaño de estas células no se vio afectado por la ausencia de los canales TASK-1 y 3.

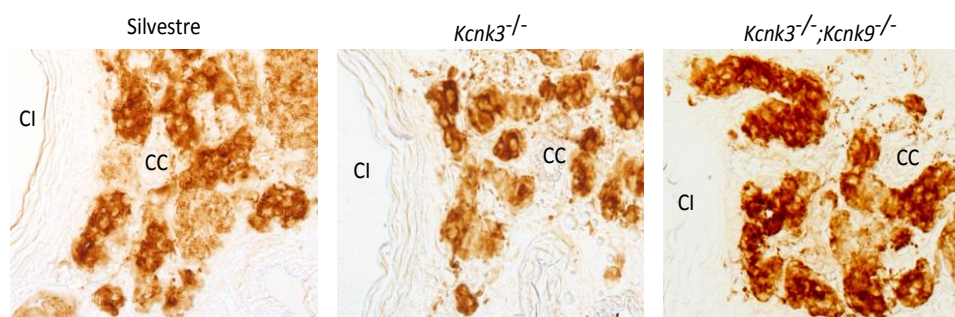


Figura 16. Inmunohistoquímica de TH en secciones de bifurcación carotídea (10 μm) de ratones control y deficientes en TASK-1 y en TASK-1 y TASK-3. En todos los casos, se apreció la estructura glomerular del CC y su localización, anexo a la arteria carótida interna (CI). El marcaje de las células tipo I reveló que no había diferencias evidentes en la cantidad de TH. Para cada condición experimental, se analizaron un total de tres animales.

Por otro lado, a partir de estas mismas secciones, se estimó el volumen del CC mediante conteo al microscopio (programa *Cast Grid*), considerando no sólo las células glómicas marcadas, sino también el tejido parenquimato asociado. Nuevamente, no se obtuvieron resultados que indicaran diferencias significativas entre los tres tipos de animales (Figura 17).

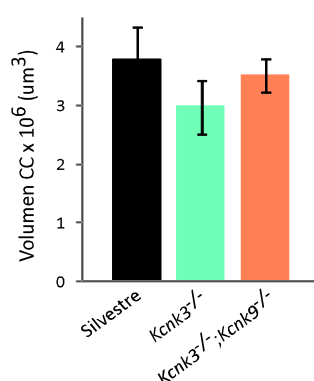


Figura 17. Estimación volumétrica (μm^3) del CC en los tres modelos animales a par-

tir de secciones de la bifurcación carotídea marcadas con un anticuerpo específico de la enzima TH (ver Figura 16). En ningún caso se observaron diferencias significativas que evidenciaran un carácter fenotípico en los dos modelos mutantes ($n = 3$).

3.1.5. Caracterización amperométrica de la respuesta a hipoxia del cuerpo carotídeo de ratones *knock-out* de *Kcnk3* y de *Kcnk3* y *Kcnk9*

La validación de nuestra hipótesis inicial sobre la naturaleza sensora del canal TASK-1 frente a la disminución de la tensión arterial de O_2 en el CC, se realizó en la línea de ratones deficientes en esta proteína, segregada a partir del doble mutante *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-}. Así, se llevaron a cabo registros de la secreción de catecolaminas en rodajas del tejido en respuesta a estímulos hipóxicos, utilizando para ello técnicas amperométricas. El estudio se completó con la caracterización del ratón deficiente en los dos canales TASK, lo cual determinaría, a su vez, la función de TASK-3 en la sensibilidad a hipoxia del CC. A pesar de que estos análisis fueron efectuados por la Dra. Ortega-Sáenz, perteneciente a nuestro grupo de trabajo, se decidió incluirlos en la presente exposición por ser un dato experimental clave para elucidar la hipótesis de partida en torno a este canal de K^+ .

Los resultados obtenidos demuestran que ninguno de los dos canales es imprescindible para la detección del estímulo hipóxico, pues la liberación de vesículas catecolaminérgicas en los dos modelos de ratones mutantes presenta el mismo patrón de respuesta que los correspondientes controles, siendo ésta mayor a medida que se incrementa el nivel de hipoxia en la solución de registro (Figura 18).

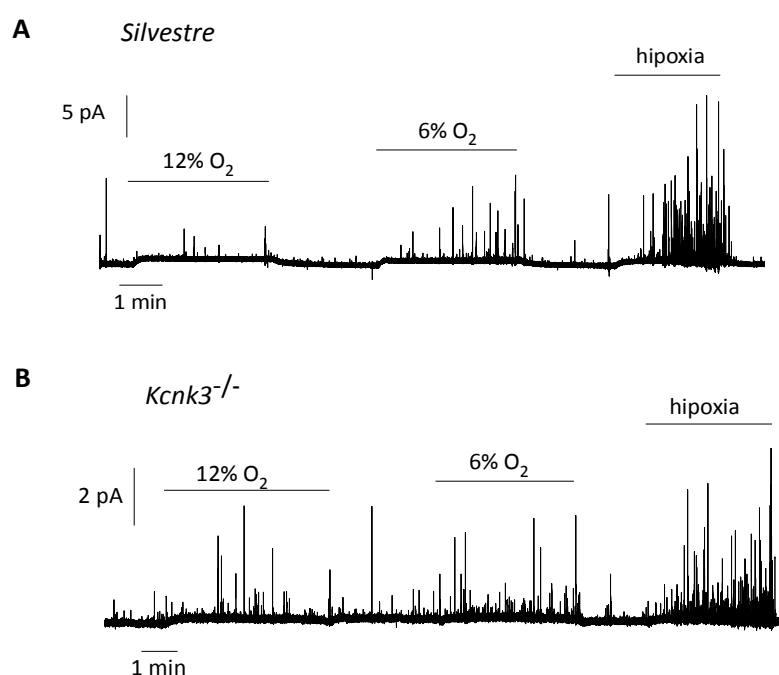


Figura 18. Registro amperométrico de la secreción de catecolaminas por parte de las células glómicas del CC inducida por un descenso en la tensión de O₂ (Control: 21% O₂, 145 mm Hg. Niveles de hipoxia: 12% O₂, 90 mm Hg; 6% O₂, 50 mm Hg; hipoxia grave, 15 mm Hg). La respuesta frente al estímulo hipóxico en el ratón deficiente en TASK-1 (B) fue similar a la observada en ratones silvestres (A), demostrando así que este canal no es el efector primario en la transducción de señales para la liberación de vesículas dopaminérgicas en este órgano.

No obstante, en situación basal, las células que carecen de los dos canales TASK presentan una tasa de secreción de catecolaminas más alta que la de animales silvestres y *Kcnk3*^{-/-} (Figura 19), indicando que se encuentran despolarizadas respecto a los valores normales. Parece, pues, que el TASK-3 contribuye de manera esencial al establecimiento del potencial de reposo de la célula glómica.

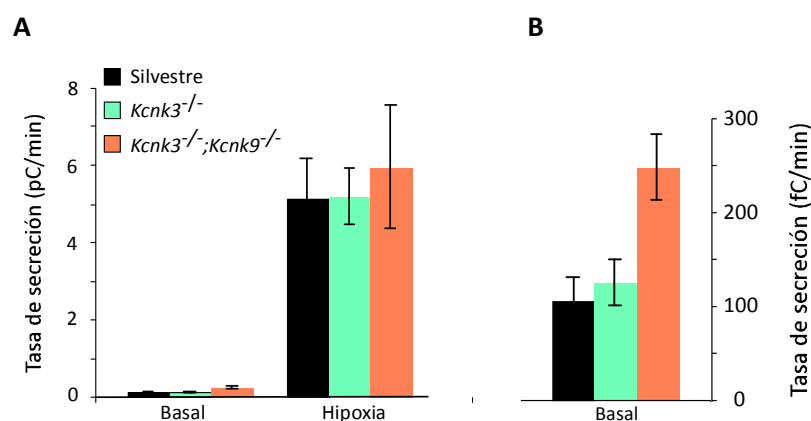


Figura 19. A. Cuantificación de la tasa de secreción de catecolaminas (pC/min) acumulada durante el estímulo hipóxico (15 mm Hg) en el CC de ratones *knock-out* de los dos canales TASK y de TASK-1, respecto a la situación basal en normoxia (145 mm Hg). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en ningún caso. B. Secreción basal de catecolaminas (fC/minuto) en condiciones normóxicas. Las células glómicas del ratón doblemente mutante presentaron contrastes significativos ($p < 0.05$) respecto a los valores de las células control, evidenciando una mayor liberación de vesículas en situación de reposo.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CADENAS DE HEMOGLOBINA EN CÉLULAS NEUROSECRETORAS

3.2.1. Análisis de expresión de cadenas de hemoglobina en células de la línea simpatoadrenal

La existencia en la naturaleza de una gran variedad de sensores de O₂ bacterianos basados en la interacción con un grupo hemo (158, 159), nos llevó a plantear si la hemoglobina, una molécula muy conservada en mamíferos y caracterizada por la

unión reversible de O₂, podría encontrarse en las células glómicas. La secreción del CC en respuesta a la hipoxia se caracteriza por depender de forma sigmoïdal de los niveles de O₂ (263, 264), un comportamiento que es similar a la cinética de unión de O₂ que presenta la hemoglobina.

Al igual que ocurre en humanos (182), la localización cromosómica de los genes de las cadenas de hemoglobina en rata (*Rattus norvegicus*) se divide en dos grupos. Por un lado, el conjunto de genes que dan lugar a la cadena γ y a las diferentes cadenas β y ϵ está ubicado en el cromosoma 1 y, por otro, los *loci* de las cadenas α y ζ se encuentran englobados en el cromosoma 10, junto con los pseudogenes de las globinas ϕ y $q1$ (Tabla 1B).

Mediante RT-PCR en tiempo en real, se comprobó si todos estos genes que dan lugar a las distintas clases de hemoglobina se expresaban en las células tipo I del CC de rata (Tabla 1A). Para lograr la especificidad y pureza de la muestra, estas células se aislaron mediante citometría de flujo tras marcaje con un anticuerpo específico de su membrana (apartado 6.3.5.1), y en ellas se analizó la presencia del mRNA de las diferentes globinas, previo tratamiento del mismo con DNAsa para evitar la amplificación de DNA genómico. Para cada gen, se dispuso de los controles de expresión adecuados. El resultado obtenido reveló que tan sólo las cadenas α y β , componentes de la hemoglobina mayoritaria en el organismo adulto (HbA), se expresaban en este tipo celular (Tabla 1B).

A

HEMOGLOBINA	COMPOSICIÓN	EXPRESIÓN
Hemoglobina A	$\alpha 2/\beta 2$	Adulto (97%)
Hemoglobina A2	$\alpha 2/\delta 2$	Adulto (2,5%)
Hemoglobina F	$\alpha 2/\gamma 2$	Feto
Hemoglobina Gower1	$\zeta 2/\epsilon 2$	Embrión
Hemoglobina Gower2	$\alpha 2/\epsilon 2$	Embrión
Hemoglobina Portland	$\zeta 2/\gamma 2$	Embrión

B

Gen (Cromosoma 1)	Células Tipo I
Hbb-b1 (Hemoglobina beta, <i>major form</i>)	Expresión
LOC100134871 (Hemoglobina beta, <i>minor form</i>)	No
Hbe1_predicted (Hemoglobina Epsilon 1)	No
Hbe2_predicted (Hemoglobina Epsilon 2)	No
Hbg1 (Hemoglobina Gamma 1)	No

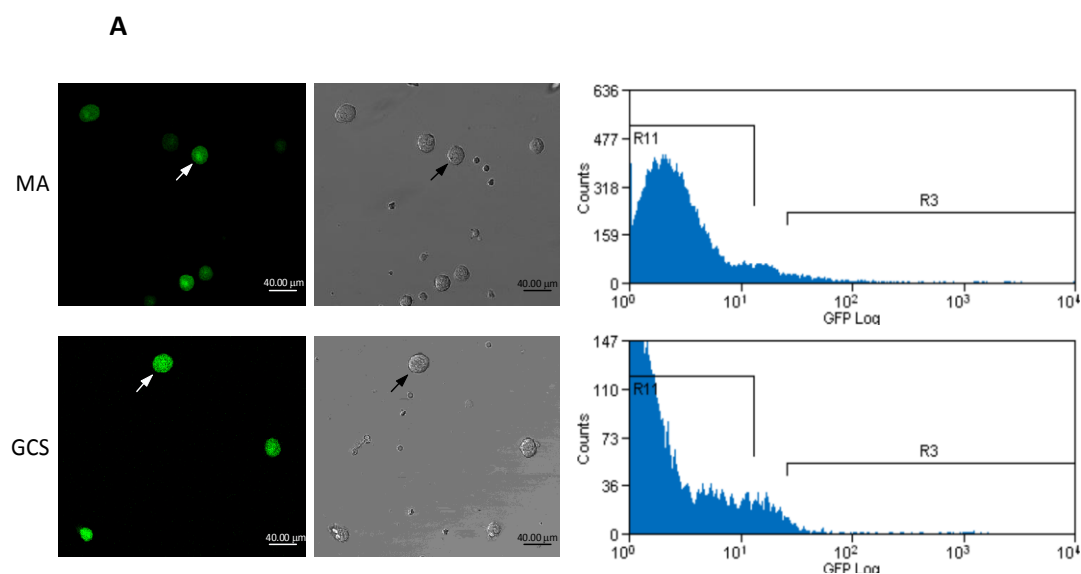
Gen (Cromosoma 10)	Células Tipo I
Hba-a2 (Hemoglobina alfa)	Expresión
Hbq1_predicted (Hbq1)	No
Hbz (Hemoglobina zeta)	No
Theta hemoglobin (Hemoglobina Theta)	No

Tabla 1. A. Composición proteica de las hemoglobinas expresadas durante el desarrollo del individuo. B. Representación esquemática de la expresión de cadenas de hemoglobina en células glómicas de rata, analizada mediante PCR en tiempo real. Se observó la amplificación de los dos componentes de la HbA, que fue corroborada con las curvas de disociación de cada uno de estos productos.

Adicionalmente, se estimó la presencia del transcrito de la mioglobina, por ser otra molécula relacionada con la unión de O₂ para su reserva en el tejido muscular. Sin embargo, no se detectó este mRNA.

El hecho de que cadenas de hemoglobina se expresaran en células de naturaleza no eritroide, planteó la duda de que existiese en las muestras algún tipo de contaminación sanguínea, a pesar de la pureza de las preparaciones. Por ello, se analizó la presencia de un marcador específico de eritrocitos, el gen de la enzima 5-aminolevulinato sintasa (Alas2) (265, 266). El resultado obtenido mediante RT-PCR cuantitativa confirmó la especificidad de la expresión de las cadenas α y β en las células glómicas.

Una vez caracterizada la expresión de hemoglobina en las células sensoras de CC, y debido a la imposibilidad de estudiar la funcionalidad de esta proteína en las mismas, nuestros estudios se extendieron a las células cromafines de la MA y a las neuronas simpáticas del GCS. Ambos tipos celulares se aislaron mediante *cell sorting* a partir de una línea de ratones transgénicos que expresaba la proteína fluorescente EGFP (del inglés, *enhanced green fluorescent protein*) bajo el control del promotor de la TH (apartado 6.3.5.2); de este modo, se aseguró la ausencia de contaminación con otros tipos celulares (Figura 20A). Sorprendentemente, sólo se detectó la cadena α de la hemoglobina en estos dos tipos de células neurosecretoras(Figura 20B).



B

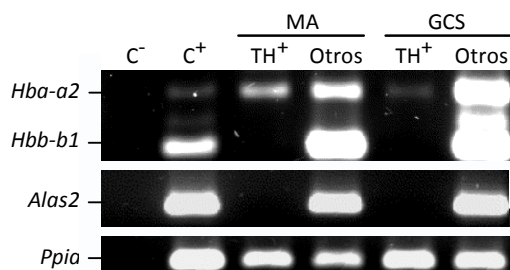


Figura 20. Análisis de la expresión de las cadenas α y β de la hemoglobina en células TH de la MA y del GCS. A. Cultivos primarios de MA y GCS procedentes de ratones transgénicos TH-EGFP. A partir de estas preparaciones, se aislaron las células fluorescentes mediante citometría de flujo. A la derecha, se muestran los histogramas específicos de cada población. Con parámetros altamente restrictivos, se recogió la fracción R3, correspondiente a las células TH-EGFP. La población restante (R11) sirvió como control representativo de todos los tipos celulares presentes en el tejido, incluyendo células eritroides. B. El análisis por RT-PCR convencional reveló en ambas muestras la presencia del mRNA de *Hba-a2* (cadena α), pero no de *Hbb-b1* (cadena β). La fracción de células restantes actuó como control de expresión de los dos genes. La ausencia de amplificación de *Alas2* en ambos tipos de células TH-EGFP positivas confirmó la especificidad del análisis, mientras que el gen de la ciclofilina (*Ppia*) se usó como control de carga (*Hba-a2*, 389 bp; *Hbb-b1*, 289 bp; *Alas2*, 130 bp; *Ppia*, 75 bp).

El resultado obtenido en las células TH de la MA y del GCS llevó a considerar que la cadena α , por sí sola, podría desempeñar una función específica en células neurosecretoras derivadas de progenitores simpatoadrenales. La línea celular PC12, procedente de un feocromocitoma de rata y que representa un modelo inmortalizado de este tipo de células (267, 268), se utilizó para un nuevo análisis de expresión de las cadenas de hemoglobina. Como cabía esperar, también en PC12 apareció únicamente el transcrito de la cadena α (Figura 21); este dato fue corroborado mediante secuenciación a partir de un producto de RT-PCR clonado en un vector plasmídico (resultado no ilustrado).

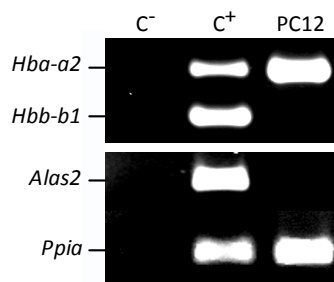


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación de la cade-

na α en células PC12. Al igual que ocurría en las células TH de la MA y del GCS, la cadena β no estaba presente. La ausencia de amplificación de *Alas2* confirmó que no había contaminantes eritroides en los cultivos. El tejido cardíaco de rata (C^+) sirvió para verificar la expresión de todos los genes analizados, entre los cuales el de la ciclofilina actuó como control de carga (*Hba-a2*, 389 bp; *Hbb-b1*, 289 bp; *Alas2*, 130 bp; *Ppia*, 75 bp).

Además, se comprobó mediante RT-PCR en tiempo real si el resto de globinas que se examinaron en las células glómicas, incluyendo el gen de la mioglobina, amplificaban en esta muestra. El resultado fue negativo en todos los casos (Tabla 2).

Gen (Cromosoma 1)	PC12
<i>Hbb-b1</i> (Hemoglobina beta, <i>major form</i>)	No
LOC100134871 (Hemoglobina beta, <i>minor form</i>)	No
<i>Hbe1_predicted</i> (Hemoglobina Epsilon 1)	No
<i>Hbe2_predicted</i> (Hemoglobina Epsilon 2)	No
<i>Hbg1</i> (Hemoglobina Gamma 1)	No

Gen (Cromosoma 10)	PC12
<i>Hba-a2</i> (Hemoglobina alfa)	Expresión
Hbq1_predicted (Hbq1)	No
<i>Hbz</i> (Hemoglobina zeta)	No
<i>Theta hemoglobin</i> (Hemoglobina Theta)	No

Tabla 2. Representación esquemática de la expresión de cadenas de hemoglobina en PC12 a partir de datos de PCR en tiempo real. El resultado mostró que únicamente la cadena α tenía expresión en esta línea celular.

Los datos obtenidos en esta línea celular confirmaron, pues, la expresión del gen de la cadena α en células neurosecretoras simpatoadrenales. La búsqueda en la literatura en torno a este hallazgo mostró que, recientemente, también se había descubierto que otras células de naturaleza no eritroide expresaban cadenas de hemoglobina (69-74). Sin embargo, en ninguna de estas publicaciones se reflejaba la expresión única de la cadena α , sino de los dos componentes de la HbA. Ello reforzó nuestro interés por estudiar la funcionalidad y regulación génica de esta globina, considerando la ventaja que ofrecía la línea celular PC12.

3.2.2. Análisis de la presencia de las cadena α y β en otras líneas celulares

Dada la novedad que supuso la presencia de una única cadena de la HbA en una línea celular, se decidió comprobar la especificidad del resultado analizando otros modelos inmortalizados disponibles en el laboratorio.

Así, se utilizaron muestras del RNA total obtenido desde células tumorales de un hemangioendotelioma (EOMA, del inglés *mouse hemangioendothelioma endothelial cells*) y desde fibroblastos embrionarios inmortalizados (NIH3T3), ambas de ratón. También se analizó la línea MAH (del inglés *adrenal-derived Hnk1⁺*), formada por progenitores de la línea simpatoadrenal. El resultado fue que ninguno de los dos componentes de la hemoglobina mayoritaria en el organismo adulto se expresaba en estos tipos celulares, a excepción de la cadena β , que amplificó en las EOMA (Figura 22).

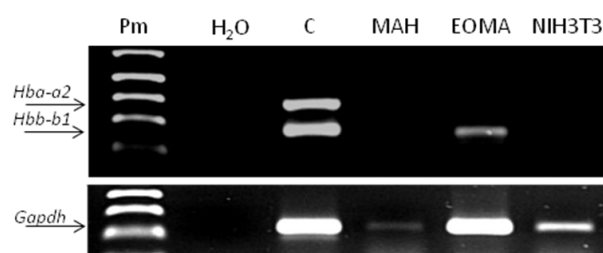


Figura 22: Análisis de la expresión de las cadenas α y β de la hemoglobina en progenitores catecolaminérgicos (MAH), y en células EOMA y NIH3T3, con tejido cardíaco (C) como representación de ambos genes. Tan sólo en las células EOMA se observó la amplificación de la cadena β . El gen de la GAPDH fue el control de carga en todos los casos (*Hba-a2*, 389 bp; *Hbb-b1*, 289 bp; *Gapdh*, 255 bp).

El hecho de que la cadena α no aparezca en los precursores simpatoadrenales sugiere que su presencia en las células PC12 y en tejidos como el CC, el GCS y la MA, sea un rasgo fenotípico característico de su diferenciación.

3.2.3. Regulación del mRNA de la cadena α en células PC12

3.2.3.1. Curso temporal en hipoxia

Dada la relación directa de la hemoglobina con el O₂, se sometieron las células a condiciones de hipoxia (1% O₂), en un transcurso temporal de cuarenta y ocho horas, con el fin de comprobar si estas condiciones tan severas podían afectar a la expresión del gen de la cadena α .

El análisis mediante RT-PCR cuantitativa reveló que, tras las primeras veinticuatro-treinta y seis horas de exposición, los niveles de mRNA descendían hasta un 50%, de manera altamente significativa, manteniéndose este efecto en las horas sucesivas (Figura 23A). Como control experimental, se analizó el gen de la TH, caracterizado por su regulación a la alza frente al descenso en la PO₂ (Figura 23B), debida a la acción de la familia de factores HIF, cuya actividad, a su vez, se regula por mecanismos dependientes de O₂ (269).

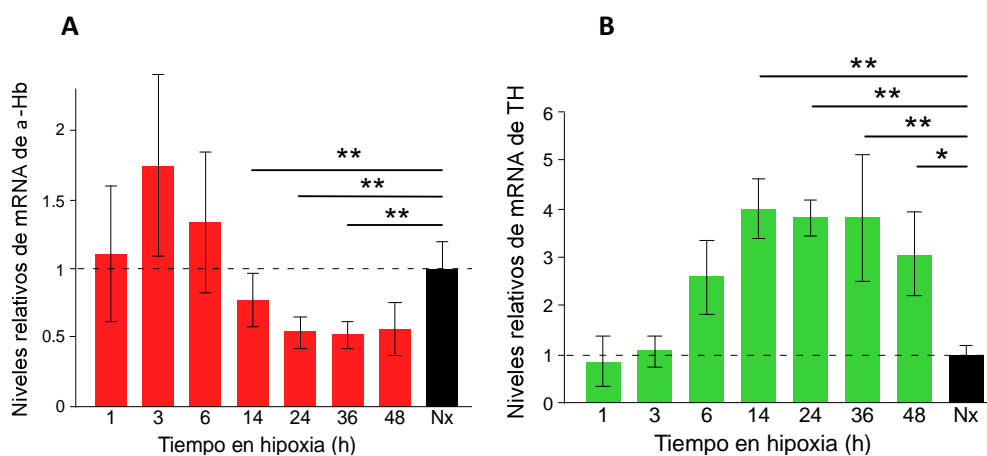


Figura 23. Cuantificación mediante RT-PCR en tiempo real de los niveles de mRNA de los genes de la cadena α (A) y de la TH (B) en un curso temporal en hipoxia (1% O₂) durante cuarenta y ocho horas ($n = 5$). En ambos casos se observó la misma cinética de regulación, pero en sentido inverso. Los niveles de α -hemoglobina descendieron muy significativamente hasta prácticamente un 50% tras veinticuatro horas de exposición, respecto a las condiciones normóxicas (21% O₂, Nx). Nótese la diferencia de escala en el eje de ordenadas entre las dos figuras.

Estos datos indican que, en células PC12, el gen de la cadena α está sometido a una regulación por parte del descenso en los niveles de O₂ que es inversamente proporcional al tiempo de exposición al estímulo hipóxico, hasta un máximo alcanzado a las veinticuatro horas.

3.2.3.2. Análisis de la dependencia de HIF

El resultado obtenido anteriormente nos llevó a plantear si la regulación por hipoxia del gen de la cadena α podía estar mediada por algún represor activado por factores de transcripción de la familia HIF. Para ello, se hizo uso del compuesto DMOG, que mimetiza el efecto inductor de la expresión génica en hipoxia mediado por HIF al actuar como bloqueante de la actividad proil hidroxilasa (PHD) (es un inhibidor competitivo de los sustratos de estas enzimas) (270, 271).

De este modo, las células PC12 se incubaron con DMOG a una concentración 1 mM en condiciones normóxicas (21% O₂) frente al tratamiento con niveles bajos de O₂ (1%), durante un período de veinticuatro horas, que es el tiempo al que se alcanzaba el máximo de inhibición. La situación control en ambos casos fue la adición de dimetilsulfóxido (DMSO) 1 mM al medio de cultivo, por ser el excipiente en el que se preparó el inhibidor. De manera altamente significativa, la incubación de las células con el compuesto mimético de la acción de HIF no coincidió con lo observado en hipoxia, ya que los niveles de mRNA, cuantificados mediante RT-PCR en tiempo real, no se vieron alterados respecto a la situación control (Figura 24).

Para comprobar que el efecto de inducción génica mediado por HIF se llevaba a cabo correctamente se analizó, al mismo tiempo, la cantidad de mRNA de *Th* (TH) y de *Vegf* (VEGF; del inglés, *vascular endothelial growth factor*), que verificaron la validez del experimento (Figura 24).

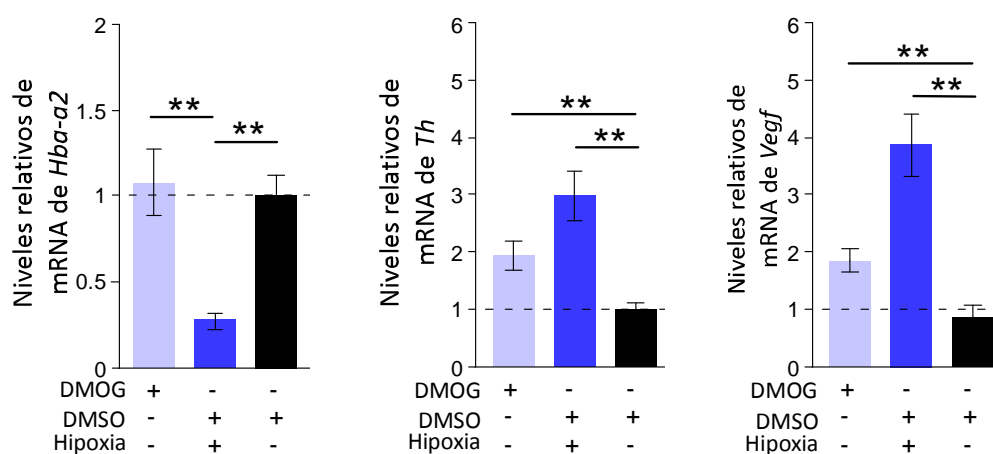


Figura 24. La incubación de las células con DMOG durante veinticuatro horas no reprodujo el efecto de inhibición de la expresión génica de la cadena α observado en hipoxia (gráfico izquierdo, $n = 14$). En cambio, los niveles de mRNA de la TH y del VEGF sí se vieron afectados por este bloqueante de la actividad PHD (nótese la diferencia de escala en el eje de ordenadas respecto al anterior), tal como cabía esperar (gráficos central y derecho, respectivamente; $n = 13$).

Por tanto, la ausencia de regulación del gen de la cadena α después del tratamiento con un mimético de la acción de HIF, llevó a concluir que este factor de transcripción no participa en la regulación de la expresión de la α -hemoglobina.

3.2.3.3. Tratamiento con inhibidores de la transcripción y de la traducción

Para comprender la regulación de la expresión del gen de la cadena α , se realizaron experimentos con inhibidores de la maquinaria de transcripción y de traducción, de manera independiente.

Cuando las células PC12 se sometieron al estímulo hipóxico (1% O_2) durante veinticuatro horas en presencia de actinomicina D (300 μM), un compuesto bloqueante de la transcripción celular, se observó que desaparecía el efecto inhibitor de la hipoxia sobre los niveles de mRNA de la cadena α (Figura 25). Este dato, altamente significativo, indicó que la represión causada por la hipoxia sobre este gen se ejerce a nivel transcripcional, bien de manera directa sobre el *locus* de la cadena α o sobre otros genes que actuarían, a su vez, como factores de transcripción/estabilización del mRNA de esta globina.

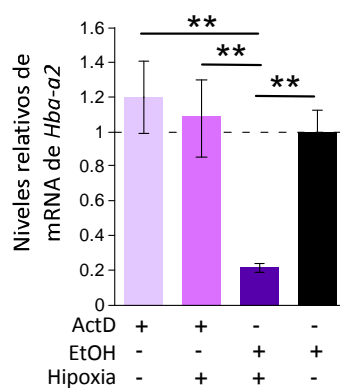


Figura 25. El bloqueo de la transcripción con actinomicina D (ActD) abolió la regulación dependiente de hipoxia del mRNA de la cadena α , cuantificado mediante PCR en tiempo real ($n = 3$). La situación control, tanto en hipoxia (1% O₂) como en normoxia (21% O₂), fue la adición al medio de cultivo de etanol (EtOH), el excipiente en que se preparó la ActD.

De forma análoga, se realizó una incubación de las células con cicloheximida (10 μ M), compuesto que bloquea la maquinaria de traducción. El resultado, de nuevo con alta significancia estadística, reveló la ausencia de inhibición del gen de la cadena α en presencia de este compuesto (Figura 26), demostrando que la regulación por hipoxia de su expresión depende de factores proteicos sintetizados específicamente en condiciones de hipoxia (1% O₂).

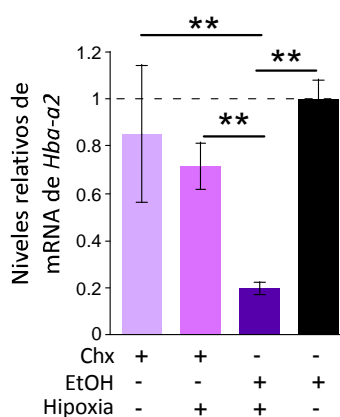


Figura 26. El tratamiento con cicloheximida (Chx) en hipoxia (1% O₂) no reprodujo el descenso de los niveles de mRNA de la cadena α provocado por la bajada de O₂ en condiciones normales de cultivo (EtOH), sugiriendo la implicación de una respuesta traduccional para la regulación de este gen ($n = 3$).

Con estos experimentos, se concluyó que la regulación del gen de la cadena α requiere la síntesis *de novo* de mRNA y proteínas.

3.2.4. Estudio funcional de la cadena α en células PC12

3.2.4.1. Generación de clones de expresión estable de la cadena α de la hemoglobina (α -Hb) y de su proteína estabilizadora (AHSP)

En células eritroides se ha descrito que la proteína AHSP, también denominada ERAF, se une de manera reversible a la cadena α de la hemoglobina cuando aún no se ha completado la síntesis de cadenas β , actuando como una chaperona que impide la formación de precipitados de α -hemoglobina que conducirían a la lisis de la célula; una vez formadas las cadenas β , la unión se desestabiliza para permitir la formación de HbA (184).

Los datos publicados en torno a la función de la hemoglobina en células no eritroides son muy diversos. Se ha descrito que pueda tener un papel antioxidante, actuar como un regulador del metabolismo del Fe e, incluso, intervenir en el control de la fosforilación oxidativa (69-74).

Para determinar la funcionalidad de la cadena α en células catecolaminérgicas, se generaron clones de expresión estable de la misma en células PC12 en los que, conjuntamente, se indujo la expresión de su chaperona bajo el control del mismo promotor (CMV, del inglés *citomegalovirus*) mediante la inserción de una secuencia IRES (del inglés, *internal ribosome entry site*) (clon silvestre-*Hba-a2*, Figura 27A). Además, se dispuso un gen marcador (*Neo*) que confirió resistencia a neomicina. De forma paralela, se diseñó un transgén idéntico en el que, mediante mutagénesis dirigida, se modificó la His proximal de la cadena α (His 88), responsable de la unión del grupo prostético hemo (clon mutante-*Hba-a2*, Figura 27A). Esta segunda construcción génica, que codifica una hemoglobina no funcional, serviría como control del efecto de una sobre-expresión en la célula. En ambos casos, mediante PCR cuantitativa, se seleccionó un clon de células PC12 que sobre-expresaba, correlativamente y de manera significativa, altos niveles de *Hba-a2* y de *Eraf* (Figura 27B).

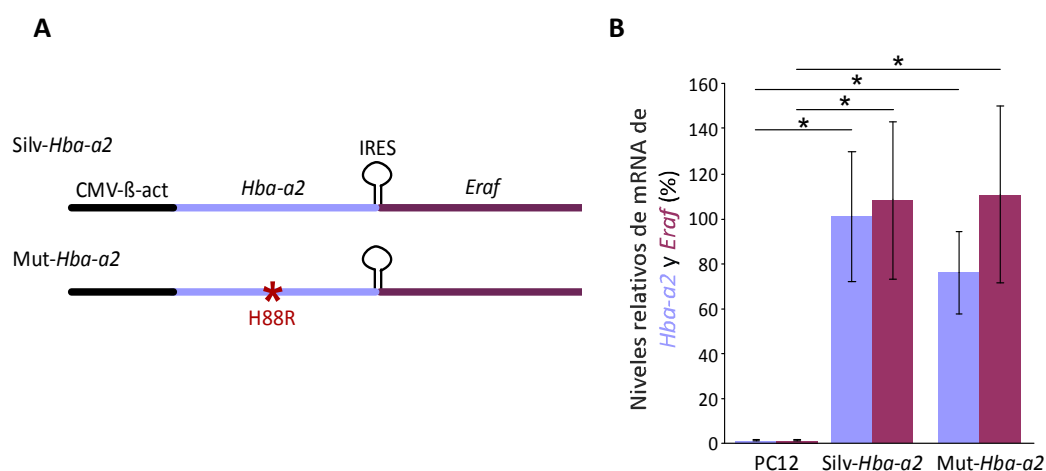
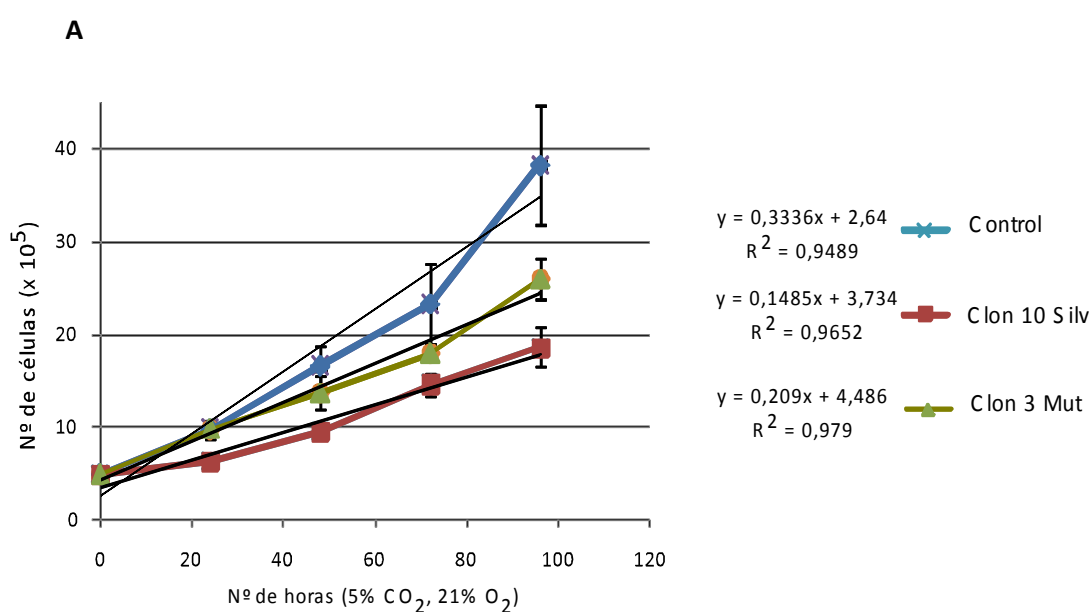


Figura 27. A. Representación esquemática de las construcciones génicas utilizadas *in vitro* para la expresión estable de la cadena α y de su proteína estabilizante en células PC12. Ambos genes se situaron bajo el control del promotor del CMV mediante la inserción de un elemento IRES entre los dos. Además de la forma silvestre (Silv-*Hba-a2*), se generó una forma inactiva de la α -hemoglobina en la que la His 88 del gen fue sustituida por el aminoácido Arg para impedir la unión del grupo hemo (Mut-*Hba-a2*). B. Cuantificación de la cantidad de mRNA de *Hba-a2* (color azul) y *Eraf* (color granate) en células PC12 y en los clones seleccionados de las formas silvestre y mutante de la cadena α , ambos con altos niveles de expresión de los dos genes. La medida se realizó normalizando los datos al gen de la ciclofilina ($n = 5$)

3.2.4.2. Análisis del crecimiento de los clones de expresión estable de α -Hb y de AHSP

Con el fin de determinar si la sobre-expresión de los genes de la cadena α y/o de la AHSP afectaban a la viabilidad o a la tasa de crecimiento de los clones seleccionados, se realizaron contajes de la proliferación de cada uno de ellos en las condiciones habituales de cultivo, partiendo desde un número inicial de 5×10^5 células. La cuantificación se mantuvo hasta el momento en que alcanzaron la confluencia. Para ello se utilizó un hemocitómetro. El resultado indicó que los diferentes clones no sólo sobrevivían a la mutación génica sino que, además, proliferaban de un modo similar a las células PC12 silvestres (Figura 28A). Posteriormente, el dato se corroboró utilizando un kit comercial que, basándose en la formación de un compuesto coloreado, cuantificaba las células metabólicamente activas presentes en el cultivo (ver apartado 6.3.6.2) (Figura 28B).



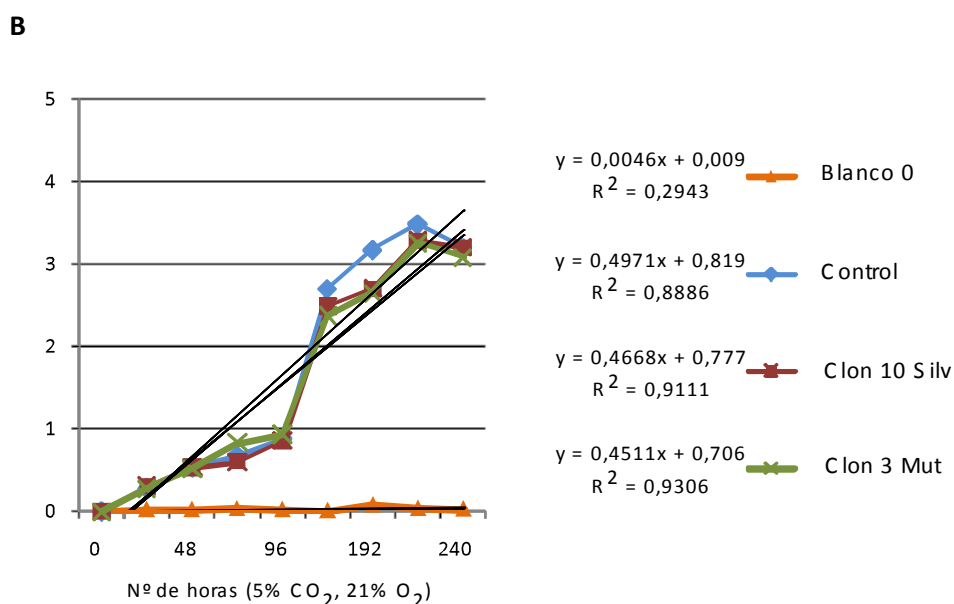


Figura 28. Tasa de crecimiento de los clones de células PC12 en condiciones normóxicas. A la derecha, se muestra la ecuación y el coeficiente de regresión (R^2) correspondiente a la línea de tendencia de cada clon. A. El conteo realizado con el hemocitómetro reveló que no había diferencias significativas entre el clon de sobre-expresión de la cadena α silvestre (color granate) y el clon mutante (en verde) respecto a las células silvestres (en azul) ($n = 3$). B. El uso del kit comercial, que implicaba llevar un control sin el compuesto coloreado (línea naranja), verificó que los clones crecían de forma similar ($n = 3$).

3.2.4.3. Análisis de la expresión de genes regulados por hipoxia en los clones de expresión estable de α -Hb y de AHSP

En vista de la regulación que presentaba la cadena α ante el descenso de la PO_2 , se planteó si las células podrían utilizar esta globina para regular los niveles intracelulares de O_2 . Para ello, se estimaron los niveles del mRNA de *Th* y de *Vegf*, en condiciones normóxicas y en hipoxia, en los dos clones de sobre-expresión seleccionados y en células PC12 silvestres.

La inducción de la expresión por hipoxia de estos dos genes es un mecanismo ampliamente estudiado en diversos tipos celulares (269). Sin embargo, mientras que en normoxia los niveles de *Vegf* permanecían inalterados en los tres modelos (Figura 29A, izquierda), la cantidad del mRNA de la TH aumentó específicamente y significativamente en las células que sobre-expresaban la forma silvestre de la cadena α (Figura 29A, derecha). En condiciones de hipoxia (1% O_2), la magnitud de la inducción del gen del VEGF respecto a niveles normales de O_2 (21%) fue similar tanto en los clones de sobre-expresión como en las células PC12 silvestres mientras que, en el caso de la TH, la subida del mRNA fue algo menos acusada en el clon *Silv-Hba-a2* que en los otros dos modelos (Figura 29B).

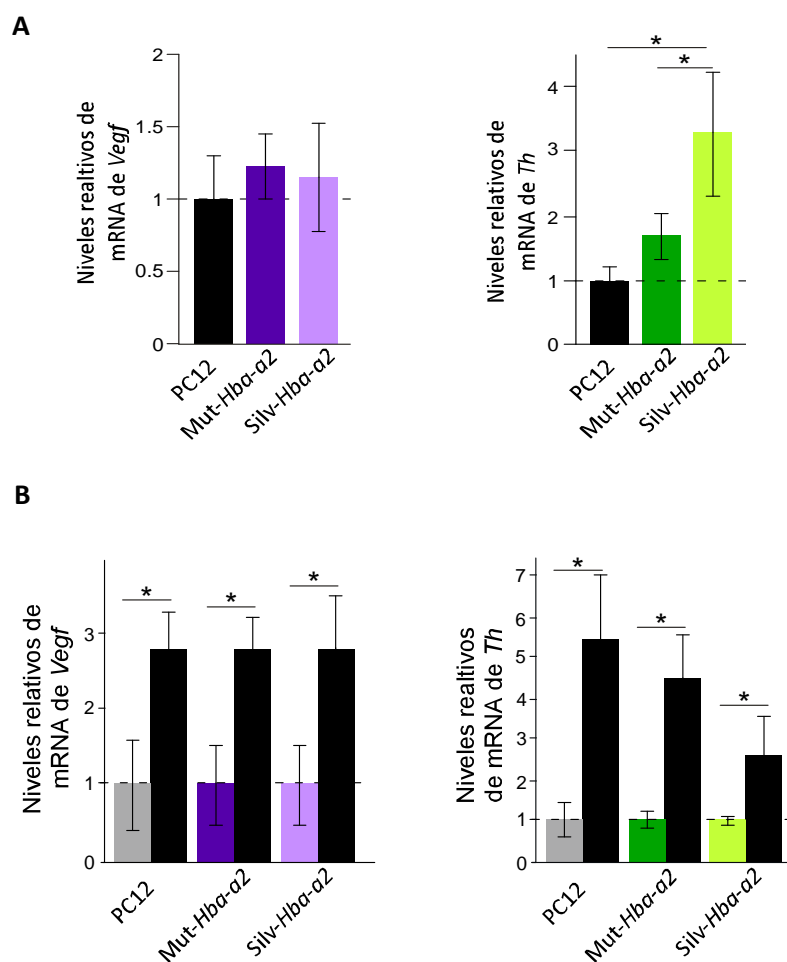


Figura 29. Cuantificación de los niveles de mRNA de *Vegf* (paneles izquierdos) y *Th* (paneles derechos) en los clones de expresión estable y en células PC12 silvestres. A. En condiciones normóxicas (21% O₂), tan sólo se observaron diferencias significativas entre los tres modelos en el gen de la TH, cuyos niveles fueron mayores en el clon de la forma silvestre de la cadena α . B. Tal como cabría esperar, en hipoxia (1% O₂), representada en color negro, los dos genes mostraban una clara regulación a la alza respecto a presiones normales de O₂ aunque, en el caso de la TH, la inducción fue algo menor en el clon *Silv-Hba- α 2*. La medida se realizó normalizando los datos al gen de la ciclofilina ($n = 5$).

3.2.4.4. Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno en los clones de expresión estable de α -Hb y de AHSP

Los datos publicados en torno a la funcionalidad de la hemoglobina en las células mesangiales indican un papel defensivo ante la presencia de ROS (74). Por este motivo, se planteó si la inducción de la expresión de la cadena α en los clones de PC12 podría modular los niveles de mRNA de genes relacionados con la defensa

antioxidante. Dentro de estos genes, los más relevantes son la isoforma citoplasmática de la superóxido dismutasa (*Sod1*, *Sod1*), la glutatión peroxidasa dependiente de selenio (*Gpx1*, *Se-GPX*) y la catalasa (*CAT*, *Cat*), por lo que se procedió a cuantificar su expresión mediante PCR en tiempo real en los clones de PC12 y en las células silvestres.

El resultado obtenido mostró una regulación a la baja significativa de los genes *Sod1* y *Se-GPX* en las células que sobre-expresaban la forma silvestre de la cadena α , mientras que los niveles de estas enzimas se mantenían estables en los otros dos subtipos celulares (Figura 30A y 30B). Los niveles de mRNA de la catalasa no presentaban alteraciones en ningún caso (Figura 30C).

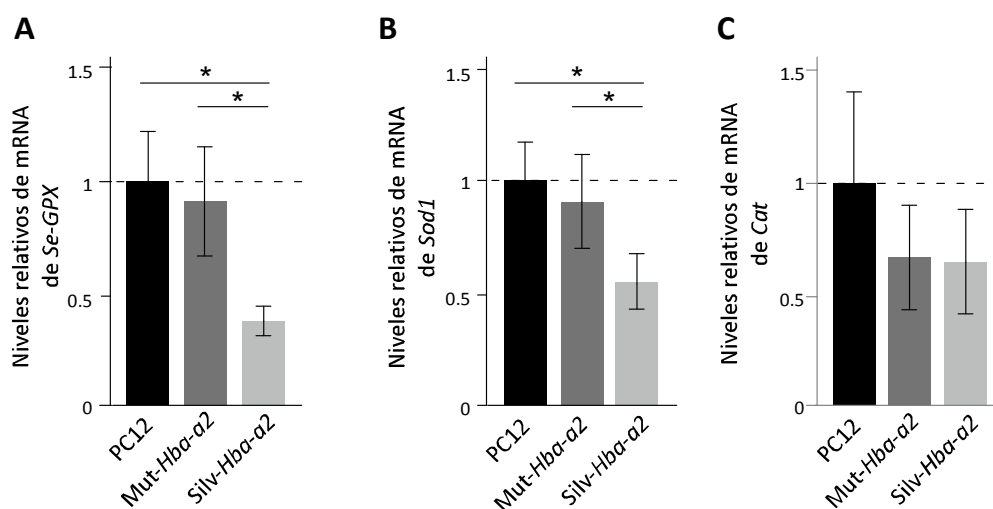


Figura 30. Cuantificación de los niveles de mRNA de *Se-GPX* (A), *Sod1* (B) y *Cat* (C) en los clones de expresión estable y en células PC12 silvestres. Las dos primeras enzimas experimentaron un descenso significativo en sus niveles de expresión en el clon *Silv-Hba- α 2*, en relación a los otros dos subtipos celulares, que no presentaban diferencias entre sí. En cambio, la cantidad de mRNA de *Cat* era similar entre los tres ($n = 7$).

Parece, pues, que la presencia de la cadena α en células PC12 regula, de algún modo, las defensas antioxidantes.

3.2.4.5. Análisis del proteoma de los clones de expresión estable de α -Hb y de AHSP

Continuando con la búsqueda de la funcionalidad de la cadena α en las células PC12, se llevaron a cabo experimentos de proteómica que permitieron establecer diferencias entre las dos poblaciones recombinantes y las células silvestres. Estudios previos realizados por otros grupos de investigación han descrito una

implicación de la hemoglobina en la regulación de genes mitocondriales y de genes dependientes de O₂ (69). En base a estos resultados, se realizaron análisis independientes del proteoma de la fracción soluble (Figura 31A) y de una porción enriquecida en mitocondrias (Figura 31B), utilizando para ello la tecnología bidimensional DIGE (*Differential in gels electrophoresis*). En ambos casos, se seleccionaron los spots proteicos que modificaron sus niveles relativos de expresión en el clon *Silv-Hba-a2*, en relación a las PC12 silvestres y al clon mutante (Figura 31).

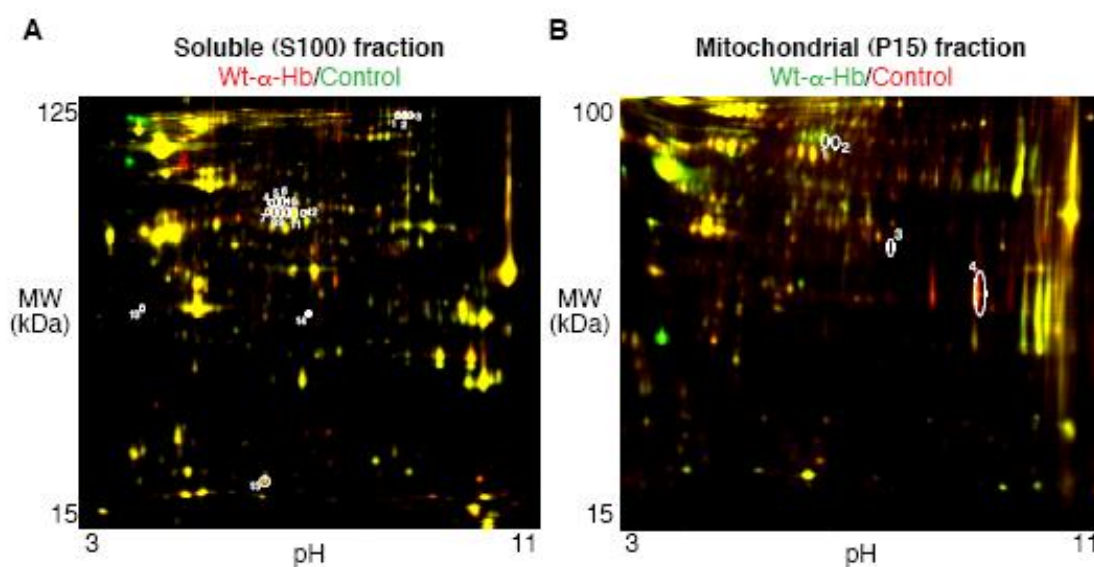


Figura 31. Análisis proteómico del clon *Silv-Hba-a2* en relación al clon mutante y a las células PC12 silvestres, realizado en la fracción soluble (A) y en una porción enriquecida en mitocondrias (B). En color rojo, se muestran las proteínas que se regulan a la baja ante la sobre-expresión de la cadena α , y en verde aquellas cuyos niveles se inducen. En amarillo, el resto de spots que no ven modificada su expresión ($n = 4$).

El examen de la huella peptídica mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-MS/MS reveló una regulación a la alza de la proteína TH en el clon de sobre-expresión de la cadena α (Tabla 3). Este dato concuerda con la inducción de los niveles de mRNA de *Th* que se observaron anteriormente en ese mismo subtipo celular (Figura 29B) y que parecía ser independiente de la disponibilidad de O₂ en el medio (Figuras 29A y 29B). Además de esta enzima clave en la síntesis de catecolaminas, el análisis MALDI-MS/MS reveló que proteínas implicadas en el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, así como proteínas antioxidantes, también estaban siendo reguladas por los niveles de α -hemoglobina (Tabla 3).

FRACCIÓN SOLUBLE						
Nº spot	Proteína (gen)	Nº acceso	Silv-Hba-a2 vs PC12		Silv-Hba-a2 vs Mut-Hba-a2	
			t-test	Tasa de cambio	t-test	Tasa de cambio
1	ATP citrato liasa isoforma 1 (<i>Acly</i>)	EDM06044	0,00708	-1,662	0,00170	-2,287
2	ATP citrato liasa isoforma 1 (<i>Acly</i>)	EDM06044	0,00629	-1,861	0,00083	-2,360
3	ATP citrato liasa isoforma 1 (<i>Acly</i>)	EDM06044	0,00044	-1,814	0,00017	-2,371
4	Tirosina hidroxilasa (<i>Th</i>)	EDM12167	0,00133	1,847	0,00783	1,837
5	Tirosina hidroxilasa (<i>Th</i>)	EDM12167	0,00333	2,288	0,03123	1,939
6	Tirosina hidroxilasa (<i>Th</i>)	EDM12167	0,00261	1,818	0,0266	1,601
7	Tirosina hidroxilasa (<i>Th</i>)	EDM12167	0,00313	1,963	0,00366	1,923
8	Tirosina hidroxilasa (<i>Th</i>)	EDM12167	0,00013	2,416	0,00158	2,166
9	Tirosina hidroxilasa (<i>Th</i>)	EDM12167	0,00239	3,088	0,01297	2,582
10	Tirosina hidroxilasa (<i>Th</i>)	EDM12167	0,00494	2,120	0,03642	1,762
11	Tirosina hidroxilasa (<i>Th</i>)	EDM12167	0,00819	2,884	0,03334	2,254
12	Similar a dihidropirimidasa-3 (<i>Dpys15</i>)	EDM02978	0,00001	2,539	0,0062	1,827
13	Keratina 18 (<i>Krt18</i>)	NP_446428.1	0,00766	2,251	0,02854	1,962
14	Aminoacilasa 1 (<i>Acy1</i>)	NP_001005383.1	0,00023	1,753	0,00111	1,574

15	Peroxirredoxina 6 (Prdx6)	CAA76732	0,00164	1,512	0,00002	2,587
16	Similar a GAPDH isoforma 1 (Gapdh- ps2)	KP_001070609.1	0,00082	-2,828	0,03166	1,536

FRACCIÓN MITOCONDRIAL						
1	Tirosina hidroxilasa (Th)	EDM12167	0,04282	2,144	0,02037	2,181
2	Tirosina hidroxilasa (Th)	EDM12167	0,01665	2,215	0,00499	2,536
3	Precursor de la cadena larga de acil- CoA deshidrogenasa (Acadl)	NP_036951.1	0,00652	1,653	0,01383	1,506
4	Anexina A2 (Anxa2)	NP_063970.1	0,0003	-2,615	0,006	-1,563

Tabla 3. Representación esquemática de la expresión diferencial de proteínas en el clon *Silv-Hba-a2* respecto al clon mutante de sobre-expresión y a las células silvestres, tanto en la fracción soluble como en la fracción enriquecida en mitocondrias.

Se demuestra, pues, que la expresión elevada de la cadena α de la hemoglobina en células PC12 modifica la tasa de síntesis de la enzima TH lo que sugiere que, tal vez, la cantidad de catecolaminas que es capaz de producir la célula también se vea afectada. Además, existen otras proteínas implicadas en la defensa antioxidante y en la regulación del ciclo de Krebs cuya expresión obedece a los niveles de α -hemoglobina.

3.2.4.6. Análisis de la actividad tirosina hidroxilasa en los clones de expresión estable de α -Hb y de AHSP

Para contrastar el dato obtenido en el análisis proteómico referente a la inducción específica de la enzima TH en el clon *Silv-Hba-a2*, se procedió a cuantificar sus niveles de expresión mediante *Western blot*. El resultado corroboró la presencia de altas cantidades de TH tan sólo en este clon que sobre-expresaba la forma silvestre de la cadena α (Figura 32).

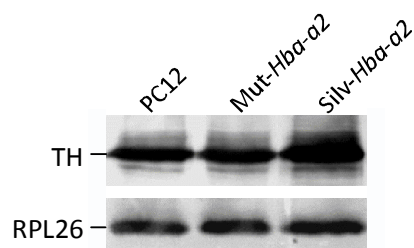


Figura 32. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de TH en las células PC12 silvestres y en los dos clones recombinantes. Se observó una marcada diferencia en el clon *Silv-Hba-α2* respecto a los demás, en el cual los niveles de enzima eran superiores. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico contra el extremo amino de la proteína ribosómica L26 (RPL26) ($n = 3$).

En vista de la confirmación de la inducción de TH ante la presencia de altos niveles de α -hemoglobina, se realizaron estimaciones mediante HPLC de la actividad de la enzima en las tres poblaciones de células PC12. Para ello se utilizó un compuesto (m-hidroxibencilhidracina, NSD-1015) que bloqueaba la enzima L-DOPA descarboxilasa, responsable de la síntesis de dopamina a partir de L-DOPA (apartado 6.3.3.6). De este modo, la cantidad de L-DOPA intracelular sería proporcional a actividad de la TH. En todos los casos, las células fueron incubadas con el inhibidor en un curso temporal, hasta un máximo de cuatro horas, y se cuantificó la cantidad de L-DOPA acumulada. De forma significativa, el clon *Silv-Hba-α2* presentó unos niveles dos veces mayores que la forma mutante y las células silvestres (Figura 33).

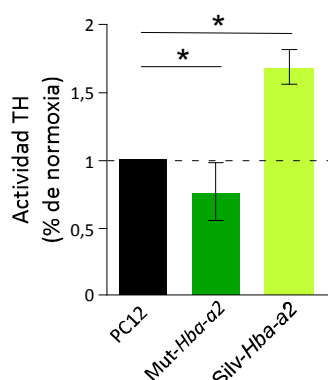


Figura 33. Estimación mediante HPLC de la actividad TH por acumulación de L-DOPA tras el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de dopamina. En el clon que sobre-expresaba la cadena α de la hemoglobina se observaron niveles doblemente superiores que en los otros dos subtipos de células PC12 ($n = 5$).

Por otro lado, el perfil catecolaminérgico de este clon *Silv-Hba-α2* mostraba una

marcada acumulación de dopamina y también de noradrelina respecto a las células silvestres (Figura 34), sugiriendo que, en PC12, debe haber otras enzimas implicadas en la síntesis de catecolaminas que también se encuentran moduladas por la expresión de la cadena α .

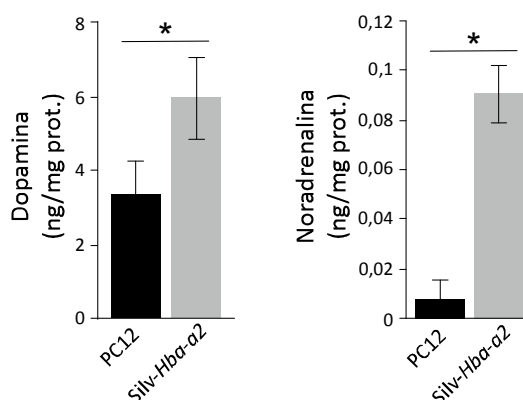


Figura 34. Cuantificación mediante HPLC de los niveles de dopamina y noradrenalina en el clon *Silv-Hba-a2* y en células PC12 no recombinantes. La sobre-expresión de la cadena α inducía una mayor acumulación intracelular de dopamina y, más aún, de noradrenalina en relación a las PC12 silvestres ($n=5$).

Todo ello parece indicar que la elevada expresión de la cadena α de la hemoglobina en estas células enfatiza su fenotipo catecolaminérgico.

3.3. CARACTERIZACIÓN DEL TROPISMO DE VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS EN PREPARACIONES DE CUERPO CAROTÍDEO

Teniendo en cuenta las propiedades ventajosas de los AAVs frente a otro tipo de vectores virales (243, 253), se decidió analizar su capacidad infectiva en preparaciones de CC susceptibles de ser registradas posteriormente por amperometría para el estudio de la respuesta neurosecretora ocasionada por la hipoxia extracelular.

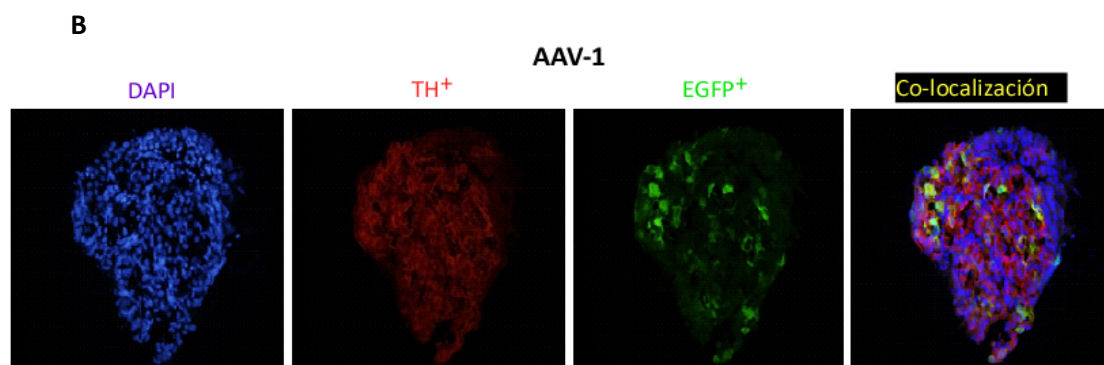
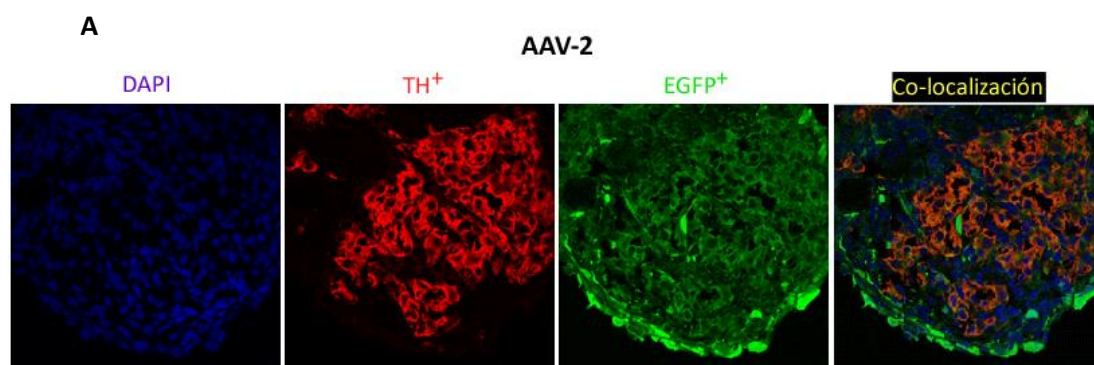
Así, se estableció una colaboración con la Dra. Corinna Burger, perteneciente al Dpto. de Neurobiología de la Universidad de Wisconsin-Madison (USA), quien no sólo nos instruyó en la técnica de producción de AAVs sino que, además, nos cedió tres de los serotipos comúnmente utilizados en terapia génica *in vivo* con el fin de comprobar, por primera vez, la competencia de los mismos para transducir células glómicas. El genoma vírico en todos ellos estaba compuesto únicamente por el gen codificante para la proteína fluorescente EGFP, lo que permitió visualizar rápidamente el resultado de los experimentos.

3.3.1. Análisis de la infección de los serotipos AAV-1, AAV-2 y AAV-5 en rodajas de tejido

Para cada uno de los tres serotipos analizados, se realizaron dos infecciones en paralelo de rodajas de CC de rata, con 4×10^9 y 20×10^9 partículas virales de vector respectivamente, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.3.4.3.1. En todos los casos, tal como cabría esperar, la eficiencia de la infección fue mayor cuando se inocularon más partículas virales sobre la superficie del tejido.

El análisis inmunohistoquímico de las rodajas que estuvieron en contacto con un mayor contenido viral reveló que, mientras que los serotipos AAV-1 y AAV-5 eran capaces de transducir las células TH⁺, el AAV-2 apenas lograba infectar algunas células principalmente de la periferia y, en cualquier caso, nunca las tipo I (Figura 35A). Los serotipos AAV-1 y AAV-5 presentaron un tropismo positivo hacia las células glómicas, mayor aún en el AAV-5 (Figura 35B y 35C) aunque, en ningún caso, la eficiencia fue lo suficientemente alta para tener una preparación idónea susceptible de ser registrada por amperometría.

No obstante, el experimento demostró la capacidad de penetrancia del virus en la preparación, ya que no sólo aparecieron transducidas células de la superficie de la rodaja.



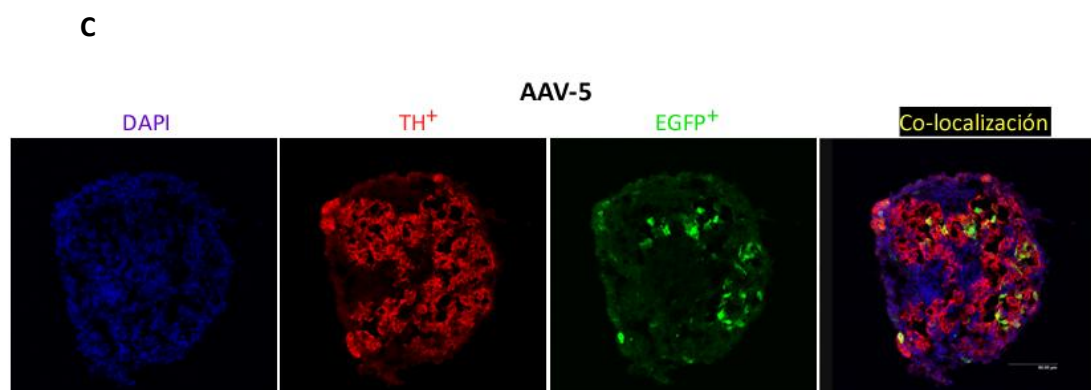


Figura 35. Imágenes realizadas a microscopía confocal de una tinción inmunohistoquímica de rodajas de CC infectadas con tres serotipos de AAVs. En todos los casos, el total de células de la rodaja se estimó mediante tinción con DAPI (color azul). La última imagen (co-localización) nos muestra la superposición de los canales de emisión. A. La infección con AAV-2 no mostró co-localización de la proteína viral EGFP (en verde) con la TH (en rojo) característica de las células glómicas. B y C. Los serotipos AAV-1 (B) y AAV-5 (C) tenían afinidad específica por las células TH del CC. No obstante, en ninguno de estos dos casos, la eficiencia de transducción fue lo suficientemente alta para poder realizar registros amperométricos en las zonas infectadas.

3.3.2. Análisis de la infección de los serotipos AAV-1, AAV-2 y AAV-5 en neuroesferas

Dado que la infección de rodajas de CC no presentaba una eficiencia lo suficientemente alta para su uso en determinaciones cuantitativas de la secreción de catecolaminas ante determinados estímulos, la alternativa fue aplicar esta misma técnica en neuroesferas de CC de rata (31), tal como se describe en el apartado 6.3.4.3.2.

Así, aunque el cultivo se llegó a mantener hasta un mes bajo las condiciones de crecimiento establecidas, al tercer día, cuando comenzaron a formarse neuroesferas con los característicos acúmulos de células diferenciadas TH⁺ (en forma de protuberancias esféricas desde la parte central), ya se tuvo constancia de la expresión de la proteína viral en los mismos, pero tan sólo en aquellas que fueron infectadas con los serotipos AAV-1 y AAV-5 (Figuras 36B y 36C), tal como ocurría en las rodajas de tejido (Figura 36). A medida que las neuroesferas proliferaban, la expresión de la EGFP se hacía más evidente en esas células TH⁺. El serotipo AAV-2, sin embargo, apenas fue capaz de transducir alguna célula de la parte central, caracterizada por albergar las células quiescentes dentro de una matriz rica en colágeno y disponer en su periferia las células progenitoras nestina⁺ en su proceso de diferenciación hacia células TH⁺ (31) (Figura 36A).

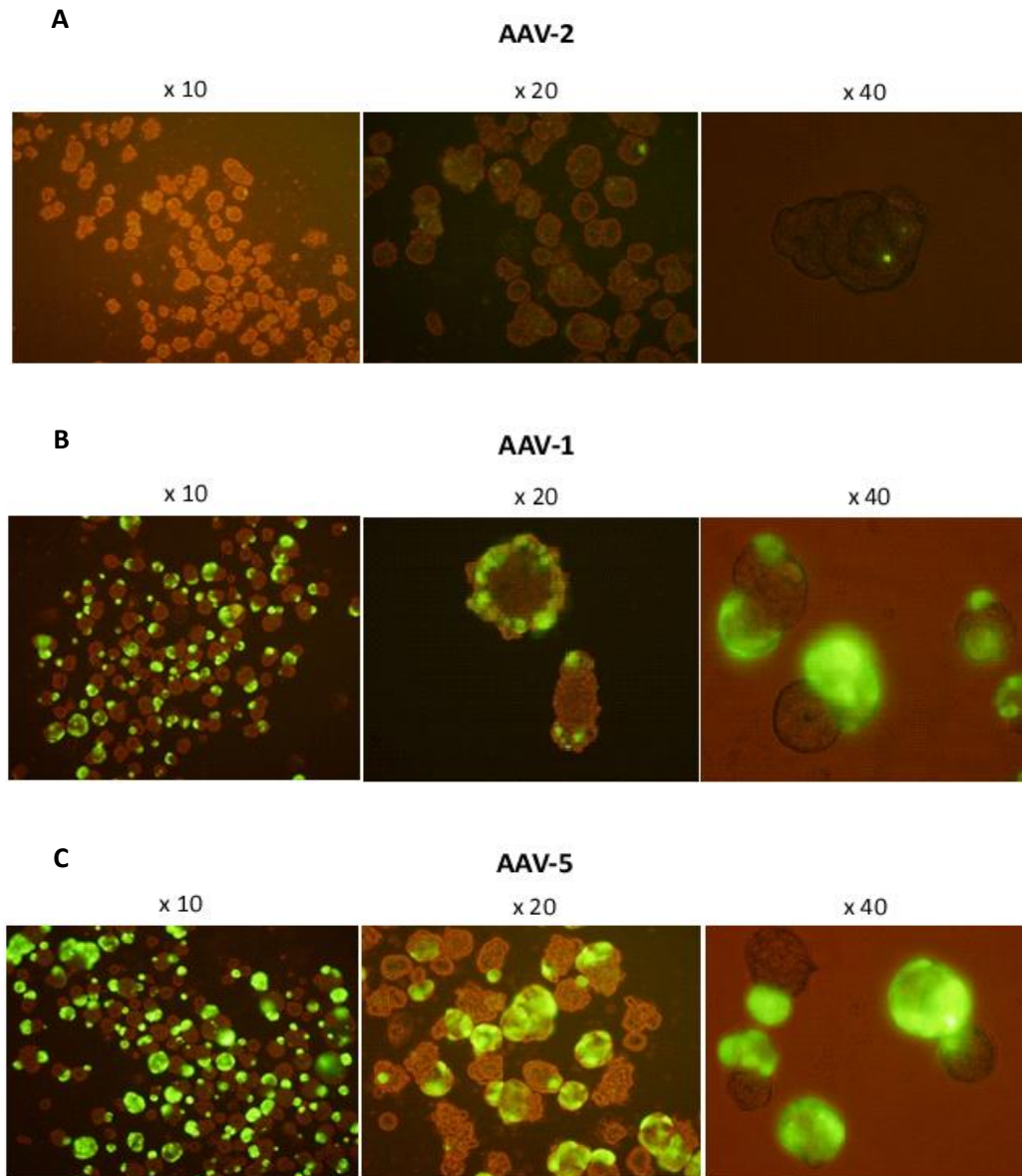


Figura 36. Neuroesferas de CC de rata en cultivo incubadas durante veinte días en presencia de los serotipos AAV-2 (A), AAV-1 (B) y AAV-5 (C). En los dos últimos casos, la proteína fluorescente viral EGFP se expresó en los grupos de células TH⁺ generados a partir de precursores indiferenciados. El serotipo AAV-2 parecía transducir tan sólo una pequeña zona de la parte central de la neuroesfera.

Para confirmar la veracidad de las conclusiones anteriores, se realizaron marcajes inmunohistoquímicos en secciones de neuroesferas incubadas entre catorce-veinte días (Figura 37). El resultado reveló que, efectivamente, eran las células TH⁺ las que eran transducidas con el virus, en los casos de los serotipos 1 y 5. Sin embargo, no en todas ellas se expresaba la proteína viral, sugiriendo que quizás la célula no habría finalizado por completo su proceso de diferenciación hacia célula

glómica o, simplemente, que la penetrancia del virus en el grupo de células TH⁺ generado *de novo* desde precursores indiferenciados no fue lo suficientemente alta.

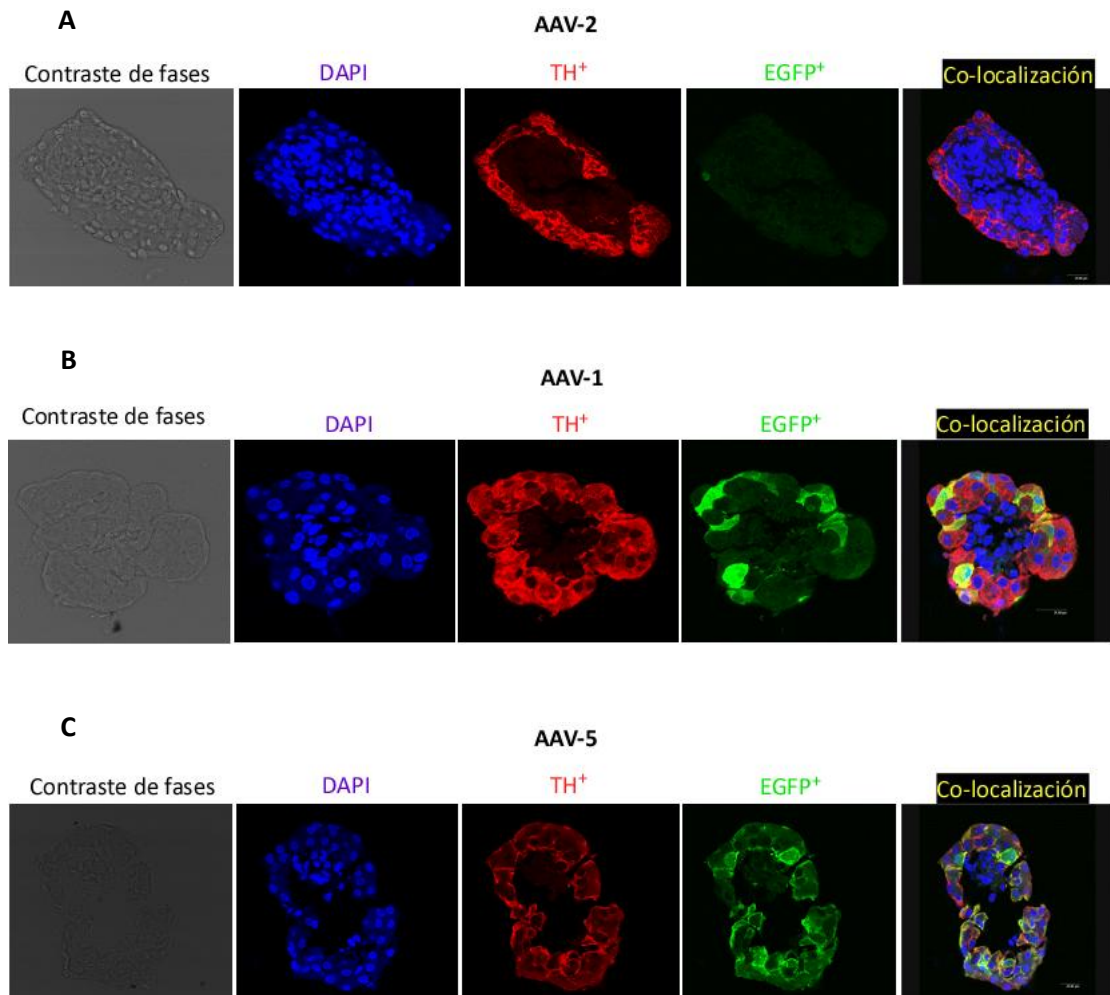


Figura 37. Inmunohistoquímica de secciones de neuroesferas de CC de rata incubadas durante catorce días en presencia de los serotipos AAV-2 (A), AAV-1 (B) y AAV-5 (C). Los serotipos 1 y 5 transdujeron específicamente células TH⁺ (en rojo), como demuestra la co-localización (en amarillo) con la proteína viral EGFP (en verde). En cambio, el serotipo 2 apenas fue incapaz de infectar una sola célula de toda la población.

Por tanto, los serotipos de AAVs 1 y 5 permitirían, de una manera eficiente y relativamente rápida, modificar la expresión génica de las células glómicas en neuroesferas de rata. De este modo, se podría analizar la contribución de determinadas moléculas a la función quimiosensora del CC y, de un modo más generalizado, a otro tipo de estudios relativos a este órgano.

Apartado 4:

DISCUSIÓN



4.1. **CONTRIBUCIÓN DE LOS CANALES DE K⁺ TASK-1 Y TASK-3 A LA FISIOLÓGÍA DEL CUERPO CAROTÍDEO**

Considerando que el O₂ es uno de los elementos más abundantes de la biosfera y, por tanto, de importancia crucial para el mantenimiento de la mayoría de las formas de vida sobre la Tierra, sería razonable pensar que el mecanismo por el cual los seres vivos detectan las variaciones ambientales de este gas sea un proceso conservado, al menos en parte. Los primeros resultados que se muestran en este estudio vienen a sustentar, de alguna manera, esta hipótesis. Así, la proteína bacteriana *EcDos*, implicada en la detección de los niveles ambientales de O₂ mediante un dominio PAS que une un grupo hemo (175), presenta una cierta homología con el canal de K⁺ TASK-1 de rata. En un análisis más detallado, la identidad con *EcDos* se encuentra dentro del extremo C-terminal del canal, que tiene una función reguladora (Figura 7). Una hipótesis atractiva sería que este dominio PAS encontrado en el canal TASK-1 pudiera unir un grupo hemo que regulase su actividad en función de la concentración de O₂. Para la detección del estímulo hipóxico en las células quimiorreceptoras del CC, se ha postulado que la interacción con el O₂ podría producirse directamente con la estructura oligomérica de un canal de K⁺ (Figura 4). A pesar de que esta cuestión se mantiene vigente desde hace décadas, en los últimos años se ha sugerido la participación de canales tipo TASK, más concretamente del subtipo 1, en esta respuesta secretora de la célula glómica, por lo que los resultados obtenidos en torno al extremo C-terminal de TASK-1 resultaron, en un principio, prometedores (123, 147-149, 150).

4.2.1. **Morfología y propiedades electrofisiológicas de las células glómicas de animales deficientes en TASK-1 y en TASK-1 y TASK-3**

La imposibilidad de disponer de un ratón *knock-out* condicional para comprobar nuestra hipótesis de trabajo, nos llevó a completar el estudio con el ratón deficiente en los canales TASK-1 y TASK-3 (*Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-}) que había generado un grupo de investigación independiente del nuestro (260). Asimismo, a partir de este animal transgénico, pudimos segregar una línea independiente de ratones *Kcnk3*^{-/-} (Figura 13). El estudio fenotípico de estos ratones reveló un estado saludable y una vida media normal (272-274). La única característica exclusiva de estos animales deficientes en TASK-1 y/o TASK-3 parece residir en algunos grupos neuronales, que manifiestan una cierta pérdida de la sensibilidad al ácido y, además, una desaparición completa del efecto del halotano sobre las corrientes de membrana o la conductancia (272-274). En algunos de estos animales, la invalidación de los canales TASK-1 provoca una desorganización de la estructura de la glándula adrenal y produce hiperaldosteronismo (275). Sin embargo, el impacto de la ausencia de estos dos canales sobre la quimiorrecepción periférica está sujeto a controversia. Así, mientras que algunos grupos han descrito respuestas ventilatorias normales frente a la hipoxia y a la hipercapnia en el doble mutante *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-} (274), otros laboratorios han observado que, cuando se carece tan sólo de TASK-1, la ventilación y las descargas aferentes del NSC en respuesta a

la hipoxia y a la hipercapnia están disminuidas (147). Nuestros datos indican que las propiedades electrofisiológicas básicas y la actividad quimiosensora intrínseca de las células glómicas de los animales *Kcnk3*^{-/-} no parecen cambiar frente a lo observado en ratones de genotipo silvestre (Figuras 18 y 19A). Sin embargo, la ausencia de ambos canales TASK provoca determinadas alteraciones electrofisiológicas y una menor sensibilidad al pH externo (261). No obstante, la respuesta secretora a la hipoxia en estos animales doblemente mutantes, así como a otros estímulos quimiosensores, también es similar a los controles (Figuras 18 y 19A).

Desde el punto de vista morfológico, el CC de los animales *Kcnk3*^{-/-} y *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-} no presenta diferencias significativas en relación al genotipo silvestre, manteniendo la organización estructural característica del CC que agrupa las células tipo I (positivas para el marcaje inmunohistoquímico contra la enzima TH) en glomérulos (Figura 16) (31). Tampoco el volumen del órgano, considerando no sólo las células glómicas sino también el tejido parenquimal, se ve alterado con las mutaciones, por lo que se podría intuir que las células glómicas funcionan con normalidad en estos modelos de ratón (Figura 17). Efectivamente, la ausencia de TASK-1 confiere a estas células unos parámetros electrofisiológicos similares al genotipo silvestre. Sin embargo, cuando faltan los dos canales tipo TASK aparece un marcado fenotipo, caracterizado por un incremento en la resistencia de la membrana y del umbral de despolarización, lo que sugiere que los canales TASK-3 (o bien los heterodímeros funcionales TASK-1/TASK-3) contribuyen al establecimiento del potencial de reposo de las células tipo I del CC (145). Además, las corrientes de fuga de K⁺ de las células glómicas de esos transgénicos deficientes en TASK-1 y TASK-3 presentan una menor sensibilidad a las variaciones del pH extracelular que las de los animales control (261).

Estos registros concuerdan con los estudios previos realizados en otros laboratorios en las neuronas granulares del cerebelo, que describen que la desaparición de TASK-1 no afecta al potencial de membrana ni a la resistencia, y tampoco influye en la densidad de canales dependientes de voltaje (272, 274). Además, la escisión del gen de TASK-1 no induce la expresión de otros canales de la misma familia, aunque la pérdida de la sensibilidad al halotano y al pH en algunas neuronas centrales indica que podría haber ocurrido una compensación con otro tipo de canales de K⁺, o bien haber reemplazado los heterodímeros funcionales TASK-1/TASK-3 por monómeros TASK-3 (272, 274). En cambio, cuando es TASK-3 (u heterodímeros TASK-1/TASK-3) el canal ausente en estas neuronas, aparece un fenotipo con un incremento en la excitabilidad de la membrana y alteraciones en la frecuencia de disparo debido a la inactivación de canales de Na⁺ (273). Estos resultados, acordes con las propiedades electrofisiológicas que observamos en las células glómicas de los ratones *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-}, sugieren que, en algunas neuronas, los canales TASK-3 (cuya conductancia es mayor que la de TASK-1) son indispensables para el mantenimiento del potencial de reposo. En el caso particular de las células tipo I del CC, esto podría ser de importancia crítica, ya

que poseen una población significativa de canales de Ca^{2+} tipo T (de bajo umbral de estimulación) que, tal como se describe en las células cromafines de individuos neonatos o de adultos sometidos a hipoxia (276, 277), podrían ser activados por pequeñas despolarizaciones de la membrana para inducir la secreción de vesículas. De hecho, en nuestros experimentos observamos un incremento en la tasa de secreción basal en las células glómicas de estos animales doblemente mutantes (Figura 19B), lo cual es compatible con la despolarización sostenida y el aumento de la excitabilidad que muestran estas células en este modelo *knock-out*.

En las células glómicas carentes de TASK-1, la densidad de la corriente voltaje-dependiente (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) no presenta alteraciones (261). Sin embargo, las corrientes de K^+ y Ca^{2+} son significativamente menores en las células que no poseen ninguno de los dos canales TASK analizados (261). Estas observaciones hacen suponer que, si bien los canales TASK-1 pueden ser prescindibles, los TASK-3 resultan indispensables para mantener el fenotipo fisiológico de las células glómicas (ya sea como monómeros o como parte de los heterodímeros con TASK-1). La disminución de la corriente de K^+ y de Ca^{2+} en las células tipo I de este animal podría ser el resultado de un remodelado electrofisiológico inducido por la despolarización basal que presentan, tal como ocurre en las células del músculo liso y en las PC12 cuando se someten a una despolarización crónica, en las cuales la subunidad α de los canales de Ca^{2+} tipo L se encuentra regulada a la baja (278). Aunque la amplitud de la corriente macroscópica de K^+ disminuye cuando las células glómicas carecen de TASK-1 y de TASK-3, es posible que otros tipos de canales de K^+ sensibles a O_2 estén sobre-expresados para compensar esa ausencia. En este sentido, el subtipo 5 de la familia TASK es un buen candidato para modificar su regulación, por ser el más relacionado con los dos anteriores. Sin embargo, se ha visto que no se expresa significativamente en el CC de estos animales, ni siquiera en los controles de genotipo silvestre (datos no ilustrados). Por otro lado, sí que aparece una regulación negativa de la subunidad α del canal maxi- K^+ (Figura 15A), el principal contribuyente de la corriente macroscópica de K^+ en la célula glómica (67, 279).

4.1.2. Actividad secretora en respuesta a la hipoxia en las células glómicas de animales deficientes en TASK-1 y en TASK-1 y TASK-3

La ausencia de TASK-1 en las células glómicas no provoca alteraciones significativas en la actividad secretora de las células tipo I del CC (Figuras 18 y 19A). Por el contrario, la privación de los dos canales TASK induce un aumento de la tasa de secreción basal, lo cual concuerda con la mayor excitabilidad que presentan las células de este doble mutante (Figura 19B). Además, la potenciación de la respuesta secretora a la hipoxia causada por hipoglucemia (efecto característico en las células glómicas) (242, 280) también se mantiene en este último ratón (261). No obstante, ninguno de los dos modelos *knock-out* carece de la capacidad de responder a las modificaciones de la tensión de O_2 ambiental. De hecho, las curvas dosis-respuesta ante concentraciones decrecientes de O_2 son similares a las presen

tadas por los animales silvestres.

Todo ello se ajusta a la falta de fenotipo electrofisiológico que poseen las células glómicas *Kcnk3*^{-/-}, sugiriendo nuevamente que los canales TASK-1, a pesar de contribuir a la formación de heterodímeros funcionales con TASK-3, no son imprescindibles para la correcta función quimiosensora de las células glómicas.

Por otro lado, sorprende el hecho de que la ausencia de ambos canales TASK no altere la respuesta secretora ante el estímulo hipóxico (Figuras 18 y 19A), aún cuando exhiben un marcado cambio en sus propiedades electrofisiológicas. La explicación a este hecho podría deberse a que el incremento de la excitabilidad de estas células (despolarización de la membrana, aumento de la resistencia y descenso de las corrientes de K⁺ reguladas por voltaje) (261) compensa la reducción de la densidad de la corriente de Ca²⁺, y por eso la función quimiosensora de las células del CC es aparentemente normal. Los datos experimentales obtenidos en el modelo *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-} (261) son compatibles con la existencia, en las células glómicas de genotipo silvestre, de corrientes de K⁺ sensibles a O₂ reguladas por TASK-3 (145). Los datos de nuestros registros electrofisiológicos revelan que esta corriente regula el potencial de reposo de la célula y, por tanto, su inhibición por hipoxia podría contribuir al inicio de la respuesta quimiosensora (261). En las células que carecen de TASK-3, la respuesta ante la bajada de los niveles de O₂ debe estar mediada por otro tipo de corriente sensible a O₂, aunque la despolarización y la mayor excitabilidad que las caracteriza es probablemente lo que hace que exhiban patrones de secreción normales.

El comportamiento de las células deficientes en TASK-1 y en TASK-1 y TASK-3 que observamos en las rodajas de CC (Figuras 18 y 19) se corresponde con otros datos registrados *in vivo*, que no detectan cambios en la respuesta ventilatoria a la hipoxia en los animales *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-} (274). No obstante, otros autores (147) describen una respuesta ante el estímulo hipóxico disminuida en ratones *knock-out* de *Kcnk3*^{-/-}, fenotipo que no aparece en animales deficientes en los dos canales TASK. Por otro lado, el análisis *in vitro* que realizan estos mismos autores en ratones *Kcnk3*^{-/-} revela un menor número de descargas aferentes del NSC en relación a organismos silvestres (147); los animales *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-} muestran un fenotipo similar a la carencia de TASK-1, aunque la línea basal que registra la actividad del NSC es más alta, de forma similar a lo que indican los registros de liberación de neurotransmisores en nuestras preparaciones de células glómicas de este mismo modelo animal (Figura 19B).

La relación dosis-respuesta obtenida mediante amperometría en rodajas de CC (Figura 18) se corresponde con la correlación hiperbólica característica descrita entre la tensión arterial de O₂ y las descargas aferentes del NSC (5). Sin embargo, la excitación nerviosa quimiorreceptora puede no ser estrictamente proporcional a la liberación de vesículas desde las células glómicas, puesto que la descarga de las

fibras aferentes también depende de mecanismos postsinápticos, tales como la clase y la densidad de los canales iónicos implicados en la generación y propagación del potencial de acción (281). Por tanto, podría ocurrir que la ausencia de canales TASK-1, a pesar de que apenas afecte a los mecanismos de sensibilidad a O₂ en la célula glómica, esté alterando la transmisión de la señal a nivel sináptico (68), ya sea por la falta en sí de estos canales o por la inducción de otro tipo de canales iónicos.

4.1.3. Implicaciones de la ausencia de TASK-1 y de TASK-1 y TASK-3 en el estudio de los mecanismos de la sensibilidad a O₂ del cuerpo carotídeo

El hecho de que la respuesta a la hipoxia, cuantificada mediante la liberación de vesículas catecolaminérgicas, permanezca prácticamente intacta en las células glómicas que carecen de canales TASK-1, tiene importantes implicaciones para los mecanismos de sensibilidad a O₂ del CC. También las células en las que, además, está ausente TASK-3, muestran una respuesta secretora normal antes descensos de la PO₂ a pesar, incluso, de sus propiedades electrofisiológicas características. Experimentos realizados en nuestro laboratorio bloqueando farmacológicamente la corriente del canal maxi-K⁺ en preparaciones de CC de ratones *Kcnk3*^{-/-}; *Kcnk9*^{-/-} demuestran que la respuesta a hipoxia se mantiene intacta (261), lo que viene a confirmar los datos de estudios previos que muestran que el bloqueo específico de este canal con iberiotoxina no abole el patrón de secreción ante el estímulo hipóxico (67). De hecho, la expresión de la subunidad α del maxi-K⁺ aparece regulada a la baja en las células glómicas de estos animales (Figura 15A). Por consiguiente, el impacto que supone la supresión de dos de los principales efectores de la hipoxia (canales TASK y maxi-K⁺) en las células glómicas, debe estar compensado por otros mecanismos que minimizan el efecto que causaría sobre la funcionalidad de las mismas. Todo ello sugiere que estas células quimiosensoras del CC tienen una alta capacidad adaptativa con el fin de mantener su función, posiblemente debido a la existencia de múltiples sensores y/o mecanismos efectores.

Dentro del amplio debate que genera la naturaleza molecular de la sensibilidad a los descensos en la tensión arterial de O₂ en el CC, se ha propuesto reiteradamente que, al igual que en otros sistemas sensores, las células glómicas tienen una molécula específica que actúa como sensor de O₂ asociada con algún tipo de canal de K⁺ para regular el potencial de reposo y/o la frecuencia de descarga del potencial de acción (47, 53, 282). Sin embargo, nuestros datos nos alejan de esta hipótesis tan selectiva, ya que existen diferentes subtipos de canales de K⁺ sensibles a O₂, así como de Na⁺ y de Ca²⁺, distribuidos ampliamente en el organismo y entre diversas especies animales (4, 146). Los resultados que hemos obtenido sugieren que, independientemente de la naturaleza de la molécula sensora, ésta debe interactuar de manera indistinta con varios subtipos de canales de K⁺ para modular la entrada de Ca²⁺ y la liberación de neurotransmisores en la célula glómica.

En relación a la naturaleza del mecanismo implicado en la sensibilidad a O₂, es probable que lo que posibilita la quimiorrecepción arterial a las células del CC sea su especial diseño morfológico y biofísico. Así, las células glómicas tan sólo poseen un diámetro de unos 10 µm y tienen una superficie varias veces inferior y una resistencia mucho mayor que otras células derivadas de la cresta neural, tales como las células cromafines o las neuronas simpáticas. Las células tipo I del CC contienen varios subtipos de canales de fuga de K⁺ que, junto con la existencia de una corriente de entrada de Na⁺ (280, 283), establecen su potencial de reposo en valores cercanos al umbral de activación de los canales de Na⁺ y Ca²⁺ dependientes de voltaje (aproximadamente, -55 mV). Por tanto, pequeños cambios en la corriente transmembranaria, que para otras células con menor resistencia y un potencial de reposo hiperpolarizado serían indetectables, provocarían una despolarización de la célula glómica de una amplitud suficiente para activar los canales de Na⁺ y/o de Ca²⁺ y desencadenar, en último término, la exocitosis.

4.2. FUNCIONES DE LA CADENA α DE LA HEMOGLOBINA EN CÉLULAS SIMPATOADRENALES

4.2.1. Expresión de cadenas de hemoglobina en células de la línea simpatoadrenal

Un requerimiento indispensable para las células que poseen un metabolismo aerobio es un correcto aporte de O₂. Para ello, los organismos, desde las bacterias hasta los más evolucionados, poseen moléculas asociadas a grupos hemo, entre las cuales la hemoglobina es la más característica en los vertebrados superiores.

En la última década, los estudios realizados en torno a la expresión de cadenas de hemoglobina han desechado la creencia clásica de que esta proteína aparece únicamente en células del linaje eritroide (69-74, 307). En este sentido, incluso, se han descubierto otras dos globinas dentro de la misma familia con una homología estructural a las cadenas de hemoglobina y cuyas funciones también están relacionadas con la afinidad al O₂ conferida por el grupo hemo (200, 201), aunque la hexacoordinación del átomo de Fe (203) les confiere propiedades características diferentes a la hemoglobina sanguínea. Así, la NGB, presente predominantemente en el sistema nervioso y actuando de forma monomérica, juega un papel neuroprotector durante períodos de estrés hipóxico, al facilitar la difusión del O₂ a la mitocondria (202-208, 284, 285). La Cygb, en cambio, tiene una expresión mucho más ubicua, apareciendo en multitud de órganos y tejidos. Ambas proteínas, a pesar de tener secuencias aminoacídicas diferentes, exhiben funciones similares implicadas, sobre todo, en la defensa antioxidante, y se relacionan filogenéticamente con la mioglobina por sus características espectrales de unión del O₂ (201, 202). De hecho se cree que, dada la amplia distribución de la Cygb en el organismo, la mioglobina es una especialización muscular de esta globina (198). El descubrimiento de estas dos proteínas pone de manifiesto la existencia de más

globinas que, al igual que la mioglobina, no requieren la formación de heterodímeros para su funcionalidad.

La confirmación de la presencia de cadenas de hemoglobina en macrófagos de ratón (72) ha supuesto una importante novedad en el estudio de esta molécula, que ha sido continuada por la descripción de la expresión del heterodímero mayoritario en el organismo adulto ($\alpha_2\beta_2$) en tejidos tan dispares como los neumocitos tipo II del pulmón o las células mesangiales del sistema renal (70, 73, 74). Con ello se demuestra que, a diferencia de lo que se creía, los genes de las cadenas α y β de la hemoglobina no se encuentran silenciados de forma generalizada en las células que no pertenecen a la estirpe eritroide, si bien, en el caso concreto de las células pulmonares, se ha sugerido que podrían derivar de células madre hematopoyéticas, lo que explicaría la presencia de hemoglobina en las mismas (286-289). También en el cerebro se ha visto que algunos tipos de células neuronales y gliales presentan expresión de las cadenas α y β (69, 71, 307). Entre éstas últimas, cabe destacar las células dopaminérgicas de la *substantia nigra*; estas neuronas, que representan una fuente importante de dopamina en el cerebro y que están implicadas en el curso de enfermedades neurodegenerativas, contienen altos niveles de ambas cadenas (69).

Nuestros análisis describen, por primera vez, la presencia del transcrito de las cadenas α y β en otro tipo de células dopaminérgicas, como son las células glómicas del CC (Tabla 1B). Estas células tipo I, con un fenotipo neuronal claramente diferenciado, representan un ejemplo más de la expresión de hemoglobina en tejidos no hematopoyéticos. Sin embargo, sorprende el hecho de que otros derivados simpatoadrenales, como las células cromafines de la MA o las neuronas simpáticas del GCS, tan sólo expresen el gen de la cadena α (Figura 20B), del mismo modo que ocurre en la línea celular PC12, también del mismo origen (Figura 21). Ésta es la primera evidencia de la expresión exclusiva de la cadena α , en lo que respecta a la hemoglobina tetramérica, en un tipo celular de vertebrados superiores. En estas células se ha comprobado, además, que el gen codificante de la chaperona que estabiliza este tipo de globinas, la AHSP, también se encuentra transcripcionalmente activo. Para asegurar la ausencia de contaminación sanguínea que pudiera enmascarar los resultados de expresión de hemoglobina en las células analizadas, se ha hecho uso de la técnica *cell sorting*, que permite obtener poblaciones celulares puras (Figura 20A), tal como corroboran los datos de ausencia de expresión de genes característicos de eritrocitos (Figuras 20B y 21). Un resultado aún más llamativo que la presencia de una única cadena de la hemoglobina en las tres poblaciones celulares anteriores, se encuentra en la línea celular MAH, que representa un modelo celular de los progenitores que generan los diversos tipos celulares de la línea simpatoadrenal, como el CC, la MA o el GCS (308). En este modelo inmortalizado no se observa expresión alguna de las cadenas α y β (Figura 22), lo que hace suponer que estas hemoproteínas inician su expresión con la diferenciación neuronal y podrían contribuir al mantenimiento de la función de las estructuras catecolaminérgicas analizadas y, tal vez, les confieran

un fenotipo característico. La especificidad de estos datos viene marcada, además, por la ausencia de la α -hemoglobina en otras líneas celulares de diferente naturaleza, como las NIH3T3 o las EOMA (Figura 22).

El análisis proteico de estas tres poblaciones de células purificadas desde órganos de tamaño tan reducido se ve enormemente limitado, ya que sería necesaria una elevadísima cantidad de tejido animal para obtener resultados significativos. La solución a este inconveniente es el uso de líneas celulares representativas que puedan ofrecer datos aproximados al modelo *in vivo*. Las células PC12, derivadas de un feocromocitoma de rata, presentan un fenotipo próximo al de las células cromafines aunque, en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*), experimentan una serie de cambios bioquímicos y morfológicos (incluyendo la emisión de neuritas) que las acercan más al fenotipo de las neuronas simpáticas (267, 290).

4.2.2. Regulación de la expresión de cadenas de hemoglobina en células simpatoadrenales

En las células eritroides, la expresión de las cadenas de HbA es un proceso equilibrado y coordinado, destinado a la producción de tetrámeros funcionales $\alpha_2\beta_2$, con sus respectivos grupos prostéticos hemo. Sin embargo, la formación de la cadena β es más lenta que la de su homóloga, de ahí la presencia en los eritroblastos de la proteína AHSP, que estabiliza las cadenas α hasta que se completa la síntesis de las β -hemoglobinas (184, 291). A pesar de que la expresión de las diferentes globinas en los reticulocitos sigue una estricta coordinación, los *loci* de todas ellas se ubican en dos cromosomas distintos formando, respectivamente, los grupos α y β (192). Por tanto, el contexto genómico de cada uno de estos monómeros es diferente, y cada gen contiene elementos específicos que regulan su expresión en los diferentes estadios del desarrollo del individuo (292, 293).

Por otro lado, el hecho de que la hemoglobina esté presente en diversos tipos celulares no hematopoyéticos indica que la regulación de su expresión sigue un patrón mucho más complejo del que se creía hasta ahora. De hecho, las cantidades polipeptídicas de las cadenas de hemoglobina que se han descrito en estas células son siempre menores que las que se registran en la línea eritroide, lo que sugiere que los niveles de expresión de estos genes dependen, de algún modo, del tipo celular. A excepción del caso de los macrófagos de ratón, en los que la inducción con interferón- γ y lipopolisacáridos hace que se sintetice la isoforma minoritaria de la cadena β (72), son los dos componentes de la HbA los que aparecen en los demás tejidos no hematopoyéticos analizados (69-71, 73, 74, 307) por lo que quizá su expresión esté regulada de un modo similar a lo que sucede en eritrocitos, produciendo cantidades niveladas de las dos cadenas. Los datos de PCR cuantitativa obtenidos en las células glómicas (Tabla 1B) también indican una expresión proporcionada de las cadenas α y β y, de nuevo, se confirma que sus

niveles son mucho menores que lo que reflejan las muestras sanguíneas. Sin embargo, es sorprendente que, en este sentido, tanto en las células PC12 como en las células TH⁺ de la MA y del GCS tan sólo esté activo el gen *Hba-a2* (Figuras 20B y 21).

En las células no hematopoyéticas, el grupo génico de las β -globinas está empaquetado en el interior de una heterocromatina inactiva, mientras que los genes α están inmersos en conformaciones de cromatina abierta en todos los tipos celulares (183). En principio, resulta ilógico que dos grupos génicos pertenecientes a la misma familia, y cuyos productos interaccionan para constituir heterómeros funcionales, tengan una ubicación tan diferente, máxime cuando su expresión está tan estrechamente coordinada. No obstante, esta complejidad tiene sentido cuando, tal como muestran nuestras observaciones, los genes de la HbA se transcriben de manera independiente y específica en determinados tipos celulares.

4.2.2.1. *Regulación de la expresión de la cadena α de la hemoglobina en células PC12*

En los eritroblastos basófilos, precursores de los hematíes, tiene lugar la transcripción del mRNA de la cadena α que, junto a su homóloga, comienza a formar las primeras moléculas de hemoglobina sanguínea. Los niveles de la proteína se incrementan en los sucesivos estadios, en los cuales la cromatina se condensa cada vez más hasta obtener reticulocitos maduros en los que el núcleo ha sido excluido, pero que contienen altas cantidades de HbA (294). No obstante, a pesar de carecer de núcleo, en estas células continúa activa esta síntesis proteica durante unos dos días más. Ello se debe, en parte, a la elevada vida media de estos mRNA. En el caso concreto de la cadena α se habla de más de veinticuatro horas de estabilidad (295), lo que hace que se esté produciendo más cantidad de este monómero que de β -hemoglobinas. Sin embargo, mientras que las formas libres de la cadena β se establecen en homotetrámeros relativamente estables, las α -globinas se organizan en estructuras monoméricas inestables que requieren la unión con proteínas AHSP para evitar situaciones patológicas asociadas a la liberación de grupo hemo (184).

En las células PC12, la expresión del gen de la cadena α (Figura 21) y la de su chaperona (dato no expuesto) también están coordinadas, por lo que representan un modelo *in vitro* de los derivados simpatoadrenales (267, 268) que facilita el estudio de la expresión de la cadena α en estos tipos celulares. Como se ha mencionado anteriormente, hasta el momento no se había descrito la presencia exclusiva de este componente de la HbA en células de mamíferos y, por tanto, poco se conoce de la regulación de su expresión. No obstante, existen evidencias de la funcionalidad de esta globina como monómero en el sistema circulatorio del pez *Pomatomus saltatrix*, comúnmente conocido como “pez azul” (296). En este animal, se ha registrado una producción excesiva de cadenas α , aunque estas globinas presentan una modificación estructural que las hace insensibles a las

variaciones de pH y también poseen una mayor estabilidad y una afinidad por el O₂ más baja que las α -hemoglobinas de vertebrados; de este modo, pueden transportar este gas y cederlo con mayor facilidad a los tejidos periféricos (296). La sobre-producción de cadenas α no es incompatible con la presencia de tetrámeros funcionales $\alpha_2\beta_2$, por lo que se podría pensar que esta β -talasemia adaptativa podría estar regulada por los niveles de O₂ o bien por la exposición a ambientes con valores extremos de pH.

En vista de la relación tan directa que las globinas poseen con el O₂, cabe esperar que la regulación de su expresión dependa, en gran medida, de los niveles del mismo. Un claro ejemplo de ello es el incremento de los niveles de HbA en mamíferos expuestos a altitudes elevadas, donde la disponibilidad de O₂ ambiental está reducida (ej. 297). Sin embargo, en el caso de otras globinas monoméricas como la mioglobina, la adaptación a la hipoxia es variable (298, 299). En el caso de la NGB, los datos publicados en modelos *in vitro* indican una regulación a la alza (208), aunque los niveles de mRNA se mantienen intactos al pasar a experimentos en animal completo (207). En cambio, el comportamiento de la Cygb ante episodios de bajas concentraciones de O₂ parece estar condicionado por el tejido en el que se expresa; así, sus niveles se incrementan en órganos como el hígado o el corazón (300), mientras que en cerebro no hay modificaciones significativas en los niveles de expresión (301). El pez cebra (*Danio rerio*) está adaptado a vivir en ambientes donde los niveles de O₂ pueden sufrir descensos ocasionales. En este animal, los niveles de mRNA de la NGB y la mioglobina experimentan un notable aumento tras cuarenta y ocho horas de exposición a niveles graves de hipoxia (PO₂ = ~31 mm Hg) (302), mientras en la Cygb, que en este pez contiene dos genes parálogos, se ve una regulación a la alza en uno de los casos y unos niveles prácticamente normales en el segundo (302). No ocurre lo mismo con las cadenas α y β , que, a diferencia de lo que ocurriría en el pez anterior, constituyen exclusivamente heterotetrámeros funcionales. El mRNA de ambas globinas desciende drásticamente a medida que se limita la disponibilidad de O₂ (302). Este dato sorprende debido a que, en muchos peces, la respuesta de la hemoglobina a estas condiciones adversas implica un incremento de sus niveles de expresión (ej. 303) aunque, en determinadas especies, se mantienen invariables (ej. 304). Una explicación a este inesperado comportamiento de las cadenas α y β propone que, en un entorno hipóxico, la cantidad de hemoglobina presente excede al total de O₂ disponible, por lo que sería contraproducente mantener esos niveles de proteína, aún cuando el transporte y entrega de O₂ se vieran facilitados, pues el coste energético que supondría la síntesis de nuevas globinas sería muy alto (302). Además, está demostrado que, en peces, la hipoxia provoca alteraciones en la hemoglobina que incrementan su afinidad por el O₂ proporcionando una eficiencia mayor en el transporte sanguíneo de este gas (305, 306). Recientemente, también se ha observado un descenso en los niveles de *Hba-a2* y *Hbb* en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, del estriado y de la corteza, cuando éstas eran tratadas con inhibidores de los complejos mitocondriales, reflejando así su relación con la función mitocondrial (307). Cuando las células PC12 se someten a

un curso temporal durante cuarenta y ocho horas en condiciones de hipoxia (1% O₂), la expresión del gen de la cadena α también experimenta un marcado descenso que, transcurrido ese tiempo, comienza a revertir, aún cuando se mantienen las mismas condiciones (Figura 23). Aunque en este caso la globina estaría actuando de forma monomérica, el único registro en el que la α -hemoglobina reduce su expresión en un ambiente similar lo encontramos en el pez cebra. Por ello, podría plantearse la posibilidad de que, al igual que ocurre en este animal, el descenso del mRNA tenga como objetivo disminuir el gasto energético que supondría la transcripción de nuevas unidades. Por otro lado, considerando el caso de las neuronas dopaminérgicas (307), cabe la posibilidad de que, de alguna manera, el descenso en los niveles de O₂ esté afectando a la producción de grupo hemo que tiene lugar en la mitocondria, el cual actúa como un potente activador de la transcripción de cadenas de hemoglobina (309). En cualquier caso, sería necesario un estudio más completo para discernir este peculiar comportamiento en hipoxia del mRNA de la cadena α en células PC12.

En las células eritroides, la expresión de los genes de hemoglobina depende de la acción de la subunidad α de HIF-1 (310). En ausencia de O₂, HIF-1 α se hidroxila y se trasloca al núcleo donde, unido a HIF-1 β , actúa como factor transcripcional de numerosos genes que poseen elementos de respuesta hipóxica (HRE, del inglés *hypoxia response element*) en su promotor (311). Entre la multitud de genes activados por HIF-1, se encuentra el de la hormona eritropoyetina (EPO) que, a su vez, estimula la maduración de los reticulocitos e incrementa los niveles sanguíneos de hemoglobina. Los datos que se publican en torno a la presencia de HbA en el tejido cerebral, indican un aumento de su mRNA en animales *knock-out* para EPO inyectados con la hormona y, en áreas del hipocampo y del cerebelo, se observa un incremento exclusivo de las cadenas α (71); el objetivo de esta regulación parece ser reducir el entorno hipóxico en regiones cerebrales en determinadas situaciones (71). Los resultados obtenidos en células PC12 muestran una situación completamente diferente en el caso de la cadena α de la hemoglobina. Así, al mimetizar las condiciones que llevan a la estabilización y activación de HIF-1 mediante la incorporación al medio de cultivo de DMOG, no se reproduce la disminución de la expresión del gen mediada por la hipoxia tras un periodo de veinticuatro horas, sino que los niveles se mantienen invariables (Figura 24). Por tanto, esta regulación en PC12 es independiente de la acción de HIF y requiere mecanismos adicionales que restan por determinarse.

La regulación a la baja que la hipoxia está ejerciendo sobre el gen *Hba-a2* en células PC12, requiere una modulación a nivel transcripcional, en vista de que este efecto se anula cuando se bloquea este mecanismo (Figura 25). No se ha determinado, sin embargo, si la represión del gen ocasionada por los niveles bajos de O₂ se ejerce de manera indirecta a través de la regulación de factores de transcripción o de estabilización de mRNAs o si, por el contrario, es el propio *locus* de la cadena α el que se ve directamente modulado. Asimismo, hemos demostrado que, además de un control transcripcional, la hipoxia provoca la

síntesis de nuevas proteínas destinadas a regular, de alguna manera, la inhibición del gen de la α -hemoglobina (Figura 26). En cualquier caso, persiste la necesidad de continuar estudiando la regulación tan específica que parece tener este gen en este tipo celular.

4.2.3. Implicación funcional de la cadena α de la hemoglobina en células PC12

A pesar de la creciente confirmación de la presencia de HbA en células no eritroides (69-74, 307), hasta el momento no se había descrito la presencia única de una de sus cadenas en un tipo celular de mamífero. Nuestras observaciones indican que dos derivados simpatoadrenales, como son las células cromafines de la MA y las neuronas simpáticas del GCS, tan sólo contienen la α -hemoglobina como representante de esta gran familia de proteínas. Además, las células PC12, modelo *in vitro* de este linaje celular, corroboran este resultado de expresión. De esta manera, planteamos como hipótesis que, a diferencia de otros tipos celulares que expresan la HbA, en estos derivados simpatoadrenales la cadena α pueda estar desarrollando una función específica que contribuya a la fisiología celular. El hecho de que la proteína AHSP acompañe la expresión de la globina, al igual que ocurre en las células sanguíneas, puede permitir la expresión estable de las cadenas α sin que éstas precipiten en forma de agregados citotóxicos (184, 185).

Para llevar a cabo los estudios de funcionalidad de la cadena α en las células PC12, se han generado dos clones de sobre-expresión estable de la misma en los que, al mismo nivel, se transcribe la proteína AHSP mediante la inserción de una secuencia IRES (Figura 27). Gracias a las técnicas de mutagénesis dirigida, en uno de estos clones la cadena α es incapaz de unir hemo, con lo que se anula su funcionalidad para enlazar determinados ligandos y sirve como control de la sobre-expresión de proteínas en la célula. Además, la chaperona AHSP es capaz de estabilizar no sólo estas cadenas α , sino también aquéllas que aún no han unido el grupo prostético (312). Este hecho viene a validar los dos modelos de clones de sobre-expresión que se han utilizado. Con ese segundo subtipo de células PC12 se ha conseguido establecer un control idóneo al que normalizar los datos obtenidos tras la sobre-expresión de la forma silvestre de la cadena α . Asimismo, se han tenido en cuenta las diferencias establecidas con las células PC12 silvestres, lo que ha ratificado aún más nuestros resultados.

La sobre-expresión de la α -hemoglobina, también en su forma mutante, y de la AHSP no parece afectar al crecimiento y viabilidad de las células, tal como demuestran las observaciones realizadas mediante dos aproximaciones experimentales diferentes (Figura 28). Por tanto, no sólo la inducción de la expresión de estos genes no supone un inconveniente para el crecimiento normal de la célula sino que, además, se puede concluir que ni la cadena α ni su chaperona afectan a la vida media y a la tasa metabólica de las células PC12, al menos en condiciones normóxicas. Es posible que, ante una situación con niveles de O_2 alterados, la cadena α esté llevando a cabo alguna función que contribuya a

paliar posibles patologías. Así, dada la mayor afinidad por el O₂ que presentan los monómeros de globina frente a heterómeros funcionales (305, 306), podría ocurrir que, ante un descenso en la disponibilidad ambiental de este gas, las cadenas α presentes en la célula enlazasen preferentemente el O₂ para cederlo a la mitocondria. Además, los niveles de mRNA de esta molécula se encuentran disminuidos en hipoxia (Figura 23) tal vez, de manera similar a lo que sucede en el pez cebra (302), para reducir el gasto energético que supondría la síntesis de nuevas cadenas. No obstante, en el clon de expresión estable de la forma silvestre de *Hba- α 2* tiene lugar, en condiciones normales de PO₂, una significativa elevada tasa transcripcional de TH (Figura 29A), enzima típicamente ligado a la acción de HIF-1 (313) por lo que, en un principio, se podría pensar que la cadena α está, de alguna manera, induciendo un estado hipóxico en el interior celular mediante la captura de O₂. Sin embargo, el gen de VEGF, también regulado por este factor de transcripción, apenas varía en sus niveles de expresión. Es más, la exposición de los tres subtipos de PC12 generados para este estudio a un ambiente deprivado casi por completo de O₂ hace que, al igual que en el caso de *Vegf*, la cantidad de mRNA de *Th* sea mayor en estas condiciones que en normoxia, tal como cabría esperar (313), si bien en este último gen la diferencia es menos marcada en el clon de sobre-expresión silvestre (Figura 29B), probablemente debido a que el gen ya se encuentra inducido en condiciones de normoxia en estas células. Por tanto, la presencia de la cadena α en PC12 no parece regular los niveles intracelulares de O₂.

En vista de que las células cromafines, las neuronas del GCS y las células PC12 no co-expresan ninguna otra hemoglobina, es de suponer que la cadena α ejerza su función de forma monomérica, aunque es difícil determinar si constituye homómeros o si, por el contrario, actúa de forma individual. Hasta la fecha, las únicas proteínas de esta familia que se han descrito funcionalmente activas como monómeros son la mioglobina y, más recientemente, la *Cygb* y la *NGB*. Estas últimas están implicadas, sobre todo, en la defensa contra el estrés oxidativo, y se cree que también contra la producción de NOS, aunque igualmente desempeñan labores de transporte y detección del O₂ intracelular (202-209, 285). La mayor parte de las publicaciones que describen la presencia de HbA en células no hematopoyéticas también coinciden en asignarle un papel protector contra los intermediarios reactivos de O₂. La hemoglobina es capaz de detoxificar radicales altamente oxidantes (314) e, incluso, interviene en la eliminación de H₂O₂ de un modo más eficiente aún que el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa (315). En las células mesangiales del riñón parece participar, además, en la eliminación de anión superóxido (74). En este aspecto funcional de la hemoglobina, los estudios más específicos se han realizado en estas células renales, donde se ha visto que la sobre-expresión de las cadenas α y β reduce los niveles intracelulares de ROS y, en general, mejora la viabilidad celular bajo condiciones de estrés oxidativo (74). En las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, la inducción de la expresión de las dos cadenas de la HbA coincide con la de determinados genes mitocondriales que codifican subunidades

de los complejos I-V, cuya inhibición contribuye a la degeneración dopaminérgica que manifiestan los modelos animales parkinsonianos (69); esto sugiere que la hemoglobina puede ejercer un papel fundamental en el control de la actividad mitocondrial, tanto en condiciones normales como patológicas. Además, una intensa actividad mitocondrial se relaciona con la producción de radicales libres de O_2 , la cual es especialmente intensa en estas neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo debido a la producción de H_2O_2 causada por la autooxidación y desaminación de la dopamina que genera, en último término, esos radicales tóxicos (316).

La producción endógena de ROS ocurre durante el metabolismo aerobio habitual, de manera que, aproximadamente, un 5% del O_2 se metaboliza a través de una reducción incompleta formando productos intermediarios altamente reactivos y tóxicos, como anión superóxido y peróxido de hidrógeno que, a su vez, genera radicales hidroxilo (OH^\cdot) en presencia de determinados metales como el Fe y el Cu. Estas ROS pueden oxidar lípidos (peroxidación lipídica) y proteínas, llegando a producir lesiones en las membranas celulares, inactivación de enzimas y cortes en la doble cadena del DNA (317, 318). Sin embargo, las células de organismos evolucionados poseen, entre otros, mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante. Este grupo de enzimas que detoxifican O_2^\cdot y H_2O_2 para impedir oxidaciones biológicas deletéreas, está integrado por la súperóxido-dismutasa, en sus formas mitocondrial y citoplasmática (Sod1), la catalasa y la glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Gpx1) (319). En los clones de PC12, el análisis cuantitativo de los niveles de expresión de estas tres enzimas revela un descenso significativo en el caso de la Sod1 y la Gpx1 en el clon de sobre-expresión de la cadena α , en relación a los dos controles (Figuras 30A y 30B). La catalasa, sin embargo, no muestra grandes variaciones entre los tres modelos (Figura 30C). La Gpx1 dependiente de selenio desempeña un papel fundamental en los procesos *redox*, al catalizar las reacciones que ayudan a destruir tanto el H_2O_2 como los peróxidos de ácidos grasos que se generan en el organismo, antes de que puedan formar radicales libres (320, 321); además, esta reacción se encuentra acoplada con la enzima glutatión reductasa, que permite la regeneración del glutatión gracias a la participación de NADPH (320). Por otro lado, la Sod1 cataliza la dismutación del anión superóxido en O_2 y H_2O_2 , siendo este agua oxigenada imprescindible para la oxidación del glutatión que lleva a cabo la Gpx1. Parece, pues, que la α -hemoglobina se encuentra directamente relacionada con estas dos enzimas antioxidantes y, por tanto, estaría implicada en la protección contra las ROS, tal como ocurre con otras globinas monoméricas y, en general, como se ha descrito para las hemoglobinas no sanguíneas (69-74). De hecho, tanto la mioglobina como las diferentes hemoglobinas animales actúan por sí mismas como peroxidasa ya que, mediante una serie de reacciones *redox*, son capaces de catalizar la oxidación de determinadas moléculas utilizando H_2O_2 (322). Así, la oxidación de la HbA hasta su estado férrico, produce aniones superóxido que, cuando reaccionan con H_2O_2 , inducen la formación de radicales reactivos en su estructura pero, en presencia de NAD(P)H, se reduce nuevamente generando H_2O

y O₂ (199) (315). Por tanto, los heterotetrámeros de hemoglobina y sus formas monoméricas (mioglobina) poseen una actividad peroxidasa, lo cual podría explicar el que, en las células PC12 que expresan altos niveles de α -hemoglobina, la cantidad de mRNA de la Sod1 y de la Gpx1 esté disminuida, llegando hasta un 50% de inhibición en este último caso (Figuras 30B y 30A, respectivamente), como consecuencia de la sustitución de esta actividad por parte de la cadena α . Además, las células catecolaminérgicas, en general, presentan una intensa actividad en el ciclo de Krebs, por lo que generan una gran cantidad de poder reductor que contribuye a que el rendimiento de la capacidad de la hemoglobina para eliminar H₂O₂ sea mayor que la del sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa (315). Cabe pensar, pues, que la sobre-expresión de la cadena α en las células PC12 mejora las defensas antioxidantes. No obstante, la actividad peroxidasa de la catalasa es más importante que la de la Gpx1 y que la de la hemoglobina (en presencia de NADPH) (315). Esto explicaría el hecho de que, aunque las funciones de la Sod1 y la Gpx1 estén parcialmente sustituidas por la acción de la α -hemoglobina en estas células catecolaminérgicas, la expresión de la catalasa permanezca invariable a pesar de la mutación (Figura 30C). Por tanto, se puede deducir que, en PC12, la sobre-expresión de la cadena α de la hemoglobina contribuye a la regulación del balance *redox* de la célula, en presencia de NAD(P)H. Además, está descrito que las proteínas que se combinan con metales de transición, como ocurre con estas globinas unidas a grupos hemo, atenúan la disponibilidad de los mismos (319), necesarios para la formación de radicales OH⁻, altamente reactivos, por lo que la presencia de este tipo de heteroproteínas favorece, de por sí, las defensas antioxidantes.

Por otro lado, se plantea la cuestión de por qué los mecanismos contra el estrés oxidativo son más potentes en las células PC12 que contienen altos niveles de mRNA de α -hemoglobina. El examen de la huella peptídica de las proteínas identificadas en experimentos de proteómica comparando los tres subtipos celulares de nuestro estudio revela que, tanto en la porción soluble como en la fracción enriquecida en mitocondrias, la proteína TH se encuentra significativamente incrementada en el clon de sobre-expresión de la forma silvestre de la cadena α respecto a las otras dos subpoblaciones (Tabla 3). La cuantificación del extracto proteico total mediante *Western blot* corrobora este resultado (Figura 32). Se observa, pues, que la regulación a la alza a nivel transcripcional del gen *Th* que muestran estas mismas células (Figura 29A), se traduce en un aumento de la cantidad de la proteína y, probablemente, de su actividad. La TH es la enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas y, por tanto, es muy abundante en células catecolaminérgicas, en las cuales se encuentra regulada tanto por los niveles intracelulares de O₂ como por el estrés oxidativo (323). No obstante, los efectos de cada uno de estos factores son contrarios (323). Así, la hipoxia estimula la síntesis de catecolaminas a través del factor de transcripción HIF-1, que ejerce su acción sobre el promotor de *Th* (324); sin embargo, la presencia de altas cantidades de ROS en la célula tiende a inhibir la transcripción de este gen (323). Nuestros experimentos demuestran que la

expresión de la cadena α de la hemoglobina en las células PC12 no produce cambios en los niveles de mRNA de genes regulados por HIF-1 (Figura 29), por lo que su relación con la TH debe corresponderse exclusivamente con la presencia de ROS, lo cual estaría en consonancia con las variaciones del mRNA de las enzimas Sod1 y Gpx1 (Figura 30). Además, como suplemento a la idea de que la α -hemoglobina está realizando una función peroxidasa que requiere poder reductor para potenciar las defensas antioxidantes y disminuir el estrés oxidativo, se observa que, además de la TH, existen otras proteínas relacionadas con el funcionamiento del ciclo de Krebs, así como otras enzimas antioxidantes, que están siendo moduladas cuando los niveles de la cadena α son elevados (Tabla 3). Así pues, si los sistemas de protección ante las ROS se encuentran reforzados por la presencia de esta globina, podríamos suponer que la presencia de cantidades elevadas de α -hemoglobina conduce a una mayor producción de dopamina. En las células catecolaminérgicas, el efecto del estrés oxidativo está potenciado, ya que la liberación de catecolaminas supone un evento clave para el inicio de la respuesta antioxidante (325). La ruta principal de la biosíntesis de estas moléculas comienza con la hidroxilación de la tirosina, que se transforma en L-DOPA para, tras la acción de una descarboxilasa, dar lugar a la dopamina (326). En las células PC12 que sobre-expresan la forma silvestre de la cadena α , la cantidad de L-DOPA acumulada por unidad de tiempo en presencia de un inhibidor de la descarboxilasa es mucho mayor que en las otras dos poblaciones (Figura 33), por lo que el incremento en los niveles de TH que muestran los datos bioquímicos y moleculares (Tabla 3 y Figura 32) se corresponde con un aumento de la actividad de la enzima. Además, los niveles de dopamina y noradrenalina que acumula el clon silvestre de la hemoglobina también presentan una marcada diferencia respecto a las células PC12 (Figura 34), sugiriendo que, del mismo modo que sucede con la TH, la DOPA-d Descarboxilasa y la dopamina hidroxilasa se encuentran moduladas positivamente por la expresión de la cadena α . Por tanto, existe una relación coherente entre la actividad peroxidasa de la α -hemoglobina, que mejora la actuación de las defensas antioxidantes al contribuir a la eliminación de H_2O_2 , y el incremento en la síntesis de catecolaminas.

En resumen, nuestras observaciones proponen un modelo de protección contra el estrés oxidativo en las células catecolaminérgicas en el que la cadena α de la hemoglobina jugaría un papel fundamental (Figura 38). La TH es la enzima limitante en la síntesis de dopamina, que es un agente oxidante, de ahí que su expresión sea inversamente proporcional al nivel de estrés oxidativo. Por tanto, si las defensas antioxidantes están comprometidas, la célula es incapaz de responder a un alto nivel de catecolaminas.

Parece, pues, que las células catecolaminérgicas requieren una protección oxidativa adicional al resto de las células, ya que deben contrarrestar el estrés causado por las catecolaminas.

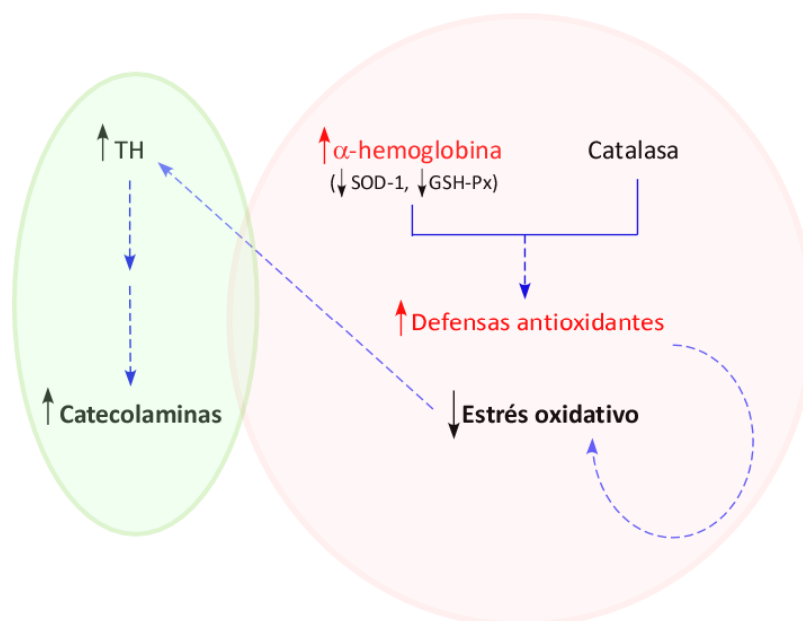


Figura 38. Modelo de actuación propuesto para la cadena α de la hemoglobina en células catecolaminérgicas. El incremento de la capacidad antioxidativa en la célula ocasionado por la alta expresión de la cadena α , que sustituye las funciones de la Sod1 y la Gpx1, reduce los niveles de estrés oxidativo los cuales, a su vez, regulan la síntesis de dopamina, de manera que la célula presenta una mayor actividad catecolaminérgica bajo estas condiciones.

El hecho de que la α -hemoglobina esté presente en este tipo celular y su función esté ligada a la eliminación de peróxido de hidrógeno parece contribuir al fenotipo catecolaminérgico. Además, se ha descrito que, en las neuronas dopaminérgicas de pacientes de Parkinson, que presentan deficiencias en la síntesis de dopamina, los niveles de HbA están disminuidos (69); esto sugiere, nuevamente, un papel antioxidante para la hemoglobina de este linaje celular que, según estos autores, podría estar implicada en patologías neurodegenerativas. Sería, pues, muy interesante dirigir futuras investigaciones a la regulación que los agentes oxidantes parecen ejercer sobre la producción de catecolaminas.

4.2.4. Expresión de las cadenas α y β de la hemoglobina en las células tipo I del cuerpo carotídeo

Nuestros datos apuntan a que un rasgo común en las células catecolaminérgicas del CC, de la MA y del GCS es la expresión de la cadena α de la hemoglobina (Tabla 1B y Figura 20B), tal como ocurre también en la línea celular PC12 (Figura 21), modelo *in vitro* del linaje anterior. Sin embargo, sorprende el hecho de que, en las células glómicas, también la cadena β se encuentre transcripcionalmente activa (Tabla 1B). Aunque nuestros estudios no han profundizado en esta observación, es importante considerar esta característica diferencial que se establece entre el CC y

otras estructuras catecolaminérgicas. Hasta el momento, las publicaciones que detallan la expresión de hemoglobinas en células no eritroides describen la expresión conjunta de las cadenas α y β , y coinciden en asignarles una función implicada en la defensa oxidativa, en la cual actuarían como un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$, del mismo modo en que se organiza la HbA de las células sanguíneas (69-75). Pero, en vista de lo expuesto en el caso de las PC12, cabe pensar que las cadenas α y β desarrollen funciones independientes en el CC. Así, equiparando en estas células glómicas el modelo de actuación de la α -hemoglobina propuesto para las células catecolaminérgicas (Figura 38), podría ocurrir que la alta tasa de síntesis de catecolaminas requiera también la actuación de la actividad peroxidasa que parece tener la cadena α (ver apartado 4.2.3). En cuanto a la funcionalidad de la β -hemoglobina, además de considerar que pueda contribuir igualmente a paliar el estrés oxidativo, una atractiva hipótesis en torno a la sensibilidad al O_2 que presentan las células quimiosensoras del CC, sería asignar a la cadena β una implicación, más o menos directa, en la detección del estímulo hipóxico, tal como sugieren las teorías que proponen a las hemoproteínas como candidatos a sensar los niveles arteriales de O_2 (ver apartado 1.2.2.2.1). No obstante, queda abierta la posibilidad de ahondar en este sugerente estudio que permitiría ampliar los datos en torno a la quimiosensibilidad de las células glómicas del CC.

4.3. UTILIZACIÓN DE VECTORES VIRALES ADENOASOCIADOS EN EL ESTUDIO DEL CUERPO CAROTÍDEO

El reducido tamaño del CC supone una gran limitación para su estudio, especialmente desde el punto de vista molecular. Sin embargo, son muy pocos los avances técnicos que se han producido para intentar facilitar la investigación de este pequeño órgano quimiosensor, a pesar de que cuestiones tan importantes como la naturaleza de la molécula sensora que permite la detección de variaciones en la PO_2 arterial se mantienen vigentes desde hace décadas. Considerando la dificultad añadida que supone la caracterización de este mecanismo sensor de hipoxia, en los últimos años se ha conseguido, al menos, disponer de dos preparaciones *in vitro* que reproducen la sensibilidad a diversos estímulos (31, 122). Por un lado, se pueden obtener rodajas de tejido a partir de animales, que conservan el ambiente fisiológico del CC (122) y, por otro, neuroesferas, generadas *in vitro* desde una única célula multipotente, que también mantienen sus características electrofisiológicas en respuesta a determinadas variaciones ambientales (31).

Aprovechando el hecho de que ambas preparaciones mantengan intacta su respuesta quimiosensora, se ha caracterizado la capacidad infectiva sobre las células glómicas de rata que presentan tres serotipos de AAVs, teniendo en cuenta sus propiedades ventajosas frente a otro tipo de vectores virales (243, 253). Así, se ha observado que tanto el AAV-1 como el AAV-5 transducen algunas células tipo I de las rodajas de CC, aunque en ningún caso la eficiencia es lo suficientemente alta

como para considerar esta técnica de modificación génica idónea en esta preparación (Figuras 35B y 35C). Tal vez, incrementando el número de partículas virales en contacto con la rodaja, se podría optimizar el resultado de la infección, siempre que la cantidad de virus no sea excesiva y represente, en sí misma, un perjuicio para la supervivencia celular. En el caso de las neuroesferas, también estos dos serotipos presentan afinidad por las células TH⁺ aunque, en este caso, el porcentaje de transducción es mucho mayor (Figuras 37B y 37C). Además, las neuroesferas se mantienen en contacto con los AAVs durante todo el período de incubación, lo que permite la transformación genética de nuevas células glómicas, una vez que han culminado su proceso de diferenciación desde los progenitores presentes en el cultivo (Figuras 36B y 36C). Por tanto, la infección de neuroesferas de CC con los serotipos 1 y 5 de AAVs posibilita la modificación de la expresión génica de las células TH⁺ de una manera rápida y eficiente sin alterar, aparentemente, el crecimiento normal del cultivo.

El uso de vectores virales con este fin está ampliamente extendido en diversos campos de la investigación biomédica y, cada vez más, los AAVs demuestran ser, junto con los lentivirus, el tipo de vector más eficiente (245, 247, 248). La aplicación de esta metodología al estudio del CC y, de manera más específica, de la sensibilidad a hipoxia de las células glómicas, permite la generación de modelos de inhibición génica en neuroesferas. Con ello, se facilita el estudio de los mecanismos responsables de esta respuesta quimiosensora, más aún considerando el extenso abanico de propuestas existentes en la literatura, que requeriría un tiempo demasiado largo para esclarecerse.

Apartado 5:

CONCLUSIONES



En base a los resultados obtenidos y analizados en el presente trabajo de investigación, podemos extraer, con carácter general, las siguientes conclusiones:

- 1.** Los canales TASK-1 y TASK-3 no son los elementos principales responsables de la quimiosensibilidad del CC de ratón a los descensos en la PO₂ arterial.
- 2.** La ausencia de los canales TASK-1 y TASK-3, así como de tan sólo TASK-1, no produce alteraciones morfológicas en el CC de ratón.
- 3.** La cadena α de la hemoglobina y su proteína estabilizadora AHSP se expresan en las células tipo I del CC, las neuronas simpáticas del GCS, las células cromafines de la MA y en la línea celular PC12. Además, las células glómicas expresan también la cadena β .
- 4.** En células PC12, la expresión del gen de la cadena α de la hemoglobina se reprime en condiciones de hipoxia tisular (1% O₂). Este efecto es independiente de la familia de factores HIF, aunque requiere modulación transcripcional y síntesis de nuevas proteínas.
- 5.** En células PC12, la expresión de la cadena α de la hemoglobina reduce los niveles de enzimas antioxidantes como la Gpx1 y la Sod1, y aumenta la expresión y la actividad de la enzima TH.
- 6.** En células PC12, la expresión de la cadena α de la hemoglobina conlleva una acentuación del fenotipo dopaminérgico debido al aumento de la síntesis de dopamina y noradrenalina.
- 7.** Los serotipos 1 y 5 de vectores AAVs transducen específicamente las células TH⁺ del CC, tanto en rodajas de tejido como en neuroesferas cultivadas *in vitro*, sin comprometer en ningún caso la viabilidad y el crecimiento de estas preparaciones. No obstante, la modificación génica es más eficiente en neuroesferas. Esta metodología supone un importante avance en las técnicas de estudio de la quimiosensibilidad del CC.

Apartado 6:

METODOLOGÍA



La búsqueda de moléculas sensoras de O₂ en el CC implica el empleo de una amplia variedad de técnicas, tanto a nivel celular como molecular y bioquímico.

Desde el punto de vista celular, es básico obtener preparaciones en las que estén presentes las células sensoras, susceptibles de ser registradas electrofisiológicamente, ya sea como unidades aisladas procedentes de una dispersión enzimática del órgano completo o inmersas en la estructura funcional básica del CC (glomérulos) en forma de neuroesferas o rodajas de tejido. Otra herramienta útil es la línea celular PC12, derivada de un feocromocitoma de rata (267), al ser un modelo inmortalizado de células derivadas de la línea simpatoadrenal.

A nivel molecular y bioquímico, se requieren técnicas que permitan obtener modificaciones genéticas para el estudio de posibles moléculas implicadas en la sensibilidad a O₂. En este sentido, cabe destacar tanto el modelo de ratón *knock-out* condicional como los modelos *in vitro*, siendo estos últimos de especial relevancia en este trabajo por su aplicabilidad como técnica para posteriores avances en el análisis sensorial de las células glómicas.

6.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

6.1.1. Especies animales

La generación del ratón *knock-out* condicional para el canal de K⁺ TASK-1 implicó disponer de embriones (*Mus musculus*) en fase de blástula en los que inyectar las células previamente modificadas *in vitro*, tal como indica la metodología habitual. En nuestro caso, estos embriones pertenecieron a la estirpe C57BL/6N, de color negro y no agoutí, y, tras la microinyección de las células madre recombinantes (cepa 129SvJ), fueron transferidos a hembras pseudogestantes híbridas de la estirpe B6CBAF1. Para determinar la colonización de la línea germinal por parte de las células embrionarias modificadas en el organismo quimera, se utilizó la estirpe C57. La manipulación de estos animales se llevó a cabo en el CPYEA.

El análisis funcional de los canales TASK-1 y TASK-3 en el CC se realizó a partir de un modelo de ratón deficiente en homocigosis de ambos genes, en fondo genético mixto, generado en un laboratorio independiente (260). La segregación de dos líneas aisladas, *TASK-1*^{-/-} y *TASK-3*^{-/-}, respectivamente, se realizó en nuestro grupo mediante cruzamiento del anterior modelo con ratones de la estirpe C57BL/6N, procedentes de la casa comercial *Charles River Laboratories International*. En el análisis de las tres líneas genéticas disponibles, la edad de los individuos osciló entre los dos y los seis meses, sin considerar en ningún caso el sexo del ejemplar como una variable independiente.

La expresión de los genes de las cadenas de hemoglobina en MA y GCS se analizó a

partir de las muestras de ratones transgénicos de la línea TH-EGFP, estirpe C57, que expresaban de forma constitutiva la proteína fluorescente EGFP únicamente en aquellas células que contenían la enzima TH. Se utilizaron indistintamente individuos de ambos sexos, con edades comprendidas entre los tres y cinco meses. Este modelo murino fue proporcionado por *The Gene Expression Nervous System Atlas –GENSAT– Project (The Rockefeller University, EE.UU)*.

Para el desarrollo experimental del resto de la investigación, se emplearon indistintamente ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar Han albinas de diferentes sexos, con un intervalo de edad entre los veinte y los treinta días.

6.1.2. Alojamiento y manipulación

Los animales procedentes de otros laboratorios, así como los generados de manera propia, se mantuvieron en el CPYEA. Siguiendo una planificación previa, los ejemplares necesarios para los distintos ensayos se transportaron hasta nuestro centro de trabajo, donde se mantuvieron alojados en locales cerrados con unas condiciones ambientales controladas, conservando una temperatura constante de 22°C (± 2) y una humedad relativa óptima. Se dispuso, además, de un sistema de iluminación que modulaba un ciclo de luz-oscuridad de doce horas (8 am–8 pm). En todos los casos, las paredes de las jaulas fueron de material plástico, con una rejilla superior metálica que permitía el libre acceso al alimento y al agua.

La experimentación se realizó en base a la Directiva 86/609/CEE de la Unión Europea del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, mediante Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre (BOE núm. 252).

6.2. EXTRACCIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS ANIMALES

En el presente trabajo, se requirieron muestras animales de diferentes tejidos y órganos, aunque la mayor parte de las técnicas quirúrgicas se destinaron únicamente a la obtención de los CCs y, en menor medida, de las MAs y de los GCSs. La obtención de estos tres modelos implicaba, en primer lugar, una extracción quirúrgica de los mismos junto con otros tejidos circundantes y, seguidamente, una manipulación más delicada en placa que requería el uso de una lupa para conseguir aislar el órgano en cuestión. El hecho de extirpar otros tipos tisulares fue debido a la necesidad de disponer de controles de expresión de determinados genes. No obstante, en algunos casos, estas muestras nos fueron cedidas por compañeros de trabajo, tal como se indicará más adelante.

Las técnicas quirúrgicas descritas para la obtención de los tres modelos simpatoadrenales (CC, MA y GCS) se aplicaron a modelos murinos, mientras que la

extracción de otros tejidos únicamente se realizó en ratas. De cualquier modo, la metodología de extracción fue común para ambas especies, dada su similitud anatómica.

6.2.1. Anestesia

En todos los casos, los animales se anestesiaron de manera general e irreversible, con anestesia parenteral. Se utilizó pentobarbital sódico (*B. Braun Medical S.A*) en suero fisiológico (*Fresenius Kabi España S.A*) al 0,05% (relación peso/volumen – p/v-) inyectado con aguja hipodérmica de 25G, por vía intraperitoneal, a la dosis recomendada en mg/kg de peso corporal para cada especie (30-40 mg/kg, en el caso de ratón, y 30 mg/kg para rata).

6.2.2. Cirugía

6.2.2.1. Cuerpo carotídeo y ganglio cervical superior

La extracción de los CCs y de los GCSs requiere, en primer lugar, aislar bilateralmente del organismo la bifurcación de la arteria carótida.

Para ello, se situó el animal en posición decúbito dorsal sobre la mesa de operaciones. Con ayuda de pinzas de disección tipo *Adson*, se separó la piel a nivel del borde anterior del esternón y se realizó un corte transversal con tijeras tipo *Mayo* de punta roma, desplazando la abertura en sentido longitudinal hasta 1 cm por debajo del maxilar inferior. Con disección roma, se desgarró la musculatura localizada sobre la tráquea. Para proceder a la extracción bilateral de las bifurcaciones carotídeas, se separaron a ambos lados los músculos esternohioideo, omohioideo y esternocleidomastoideo, hasta llegar a las arterias carótidas comunes. Con pinzas *Dumont* de punta fina (0,17 x 0,07 mm), cada una de ellas se disecó en un tramo de 1 cm (a veces, junto al nervio glossofaríngeo, dada la proximidad del mismo), partiendo hacia la bifurcación (dirección caudal), y llegando hasta una rama del NSC que, visiblemente, se dispone transversal a las dos ramas de la arteria. De este modo, se aseguró la presencia del CC en la muestra, ya que se sitúa próximo al vértice de la ramificación, oculto bajo el GCS (Figura 39). Una vez aislado el tramo correspondiente, se procedió a ocluir la arteria común mediante pinzas hemostáticas dentadas de punta curva, para interrumpir el flujo sanguíneo procedente de la aorta. Por último, se escindió el segmento de la bifurcación definido, con tijeras curvas tipo *Vannas* de punta fina (0,1 mm). Rápidamente, se sumergió la muestra aislada en tampón fosfato salino (PBS)¹, frío (4°C) y estéril, para proceder de forma inmediata a la extracción del CC y/o del GCS. El tiempo estimado para este tipo de cirugía fue de unos cinco minutos.

¹ **Tampón PBS:** 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄, en H₂O bidestilada (H₂O_{dd}); pH 7,4.

La preparación se transfirió a una placa de cultivo de 6 cm de diámetro (*Nunc*), rellena de PBS frío, situada sobre un recipiente con hielo. El fondo de la placa estaba recubierto con SYLGARD® (*Dow Corning Corporation*), para permitir la sujeción del tejido por medio de púas de cactus estériles. Además, se aplicó color negro en la base para facilitar la visualización de la muestra.

La manipulación de la misma a partir de aquí se llevó a cabo en una lupa (SZX16, *Olympus*). La fijación al SYLGARD® mediante púas se efectuó en los tres extremos de la bifurcación, en posición dorsal, procurando no alterar la estructura del órgano de interés. Utilizando pinzas *Dumont* (0,1 x 0,06 mm) y tijeras rectas tipo *Vannas* de punta fina (0,1 mm), se retiró el GCS, aislándolo en un tubo *coulter* estéril (*DELTALAB, S.L*) con PBS frío¹. Una vez descubierta la cavidad de la bifurcación, y utilizando el mismo instrumental, se separó el CC de los tejidos circundantes, retirando los restos de grasa y tejido conjuntivo adheridos a él. La transferencia del órgano a un tubo *coulter* estéril con PBS frío, se realizó con ayuda de una pipeta *Pasteur* de plástico, estéril, por la que se había pasado previamente suero bovino fetal (*SIGMA*) para evitar la adhesión del CC a las paredes del plástico. El aislamiento de este órgano en placa requirió un tiempo próximo a los cinco minutos.

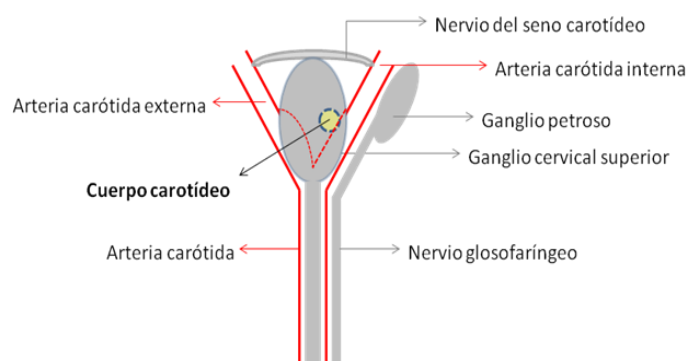


Figura 39: Dibujo esquemático de la bifurcación carotídea. Se representa la localización del CC, por debajo del GCS y adyacente a la arteria carótida interna.

6.2.2.2. Médula adrenal

Se trata de un órgano par que se encuentra recubierto por la corteza adrenal formando, en su conjunto, la glándula suprarrenal.

La extracción de esta glándula, adherida a la parte superior del riñón, se efectuó con el animal en posición decúbito dorsal. Con pinzas de disección, se separó la piel

¹ Cuando la muestra se destinó a la extracción de RNA, se utilizó PBS con Depc (Dietil pirocarbonato, *SIGMA*), en una proporción volumen/volumen (v/v) de 1:10000 (PBS-depc), frío y estéril.

del músculo y se abrió el animal por la línea media ventral, con tijeras de punta roma, desplazando la abertura desde la región inguinal hasta las costillas inferiores. Con ayuda de tijeras y pinzas de disección, se realizó un corte longitudinal a lo largo de la línea alba, levantando la pared muscular con unas pinzas para crear un espacio entre la misma y las vísceras abdominales. Con mucho cuidado, se apartaron el estómago y los intestinos, sin llegar a escindirlos, hasta alcanzar la glándula suprarrenal, que se extirpó mediante pinzas de punta fina, procurando no alterar su estructura al separarla del riñón. Para esta disección se necesitó un tiempo de unos cuatro-cinco minutos. Inmediatamente después, se introdujo la glándula en PBS frío y estéril y se transfirió enseguida a una placa con SYLGARD® de las mismas características que las expuestas en el apartado anterior.

La extracción de la MA se realizó en una lupa idéntica a la utilizada para la bifurcación carotídea, conservando de igual modo el frío en la muestra. Esta vez, dada la morfología del órgano, no se precisó fijar el tejido al fondo de la placa, sino que la separación de la corteza se llevó a cabo simplemente con pinzas tipo *Dumont* (0,1 x 0,06 mm) y tijeras *Vannas* de punta recta (0,1 mm), en un tiempo de cinco-seis minutos. La MA, libre de restos de corteza, se colocó en un tubo *coulter* estéril con PBS frío.

6.2.2.3. *Tejido cardíaco, hepático y muscular*

La abertura del animal se realizó de modo similar al caso anterior, esta vez extendiendo la incisión de la línea alba hasta la altura del esternón, para llegar al tejido cardíaco. Una vez descubierta la cavidad con las vísceras, se extirparon con tijeras de punta fina pequeños trozos tanto de hígado como de corazón y de músculo de la parte dorsal. La finalidad de estas muestras fue la extracción de RNA, por lo que se congelaron rápidamente en N₂-líquido, previo lavado en PBS-depc.

6.2.2.4. *Cerebro y embrión*

Ambas muestras fueron extirpadas por compañeros de trabajo. Inmediatamente después de sumergirlas en PBS-depc, se congelaron en N₂-líquido para la posterior purificación de RNA.

6.3. CULTIVOS CELULARES DE ORIGEN ANIMAL

En relación a la búsqueda de moléculas sensoras de O₂ en el CC, no sólo se dispersaron células de este órgano, sino también de la MA y del GCS. Por otro lado, se trabajó con líneas celulares tales como las células PC12 para la caracterización funcional de las cadenas de hemoglobina, y las células implicadas en la producción de vectores virales y en la generación de ratones *knock-out*.

6.3.1. Cultivos primarios

Para la realización de cultivos primarios es imprescindible trabajar en condiciones de esterilidad, lo que requiere la manipulación dentro de una campana de flujo laminar (TWO30, *FASTER*) y el uso, en todo momento, de material y soluciones estériles.

6.3.1.1. Dispersión de células de cuerpo carotídeo

Esta técnica se realizó únicamente en ratas. Se partió de un número mínimo de CCs de dos y un máximo de seis. Cuando se precisó dispersar una cantidad mayor, simplemente se realizaron los cultivos de forma paralela, siempre dentro del rango establecido.

Una vez extraídos los CCs (apartado 6.2.2.1), se realizaron tres lavados sucesivos con PBS frío y estéril (*GIBCO*), en placas de cultivo de 3 cm de diámetro (*Nunc*). Para transferir las muestras de una placa a otra se utilizó una pipeta *Pasteur* de plástico pasada, previamente, por suero bovino fetal. A continuación, se incubaron durante veinte minutos en 3 mL de solución de dispersión (Tabla A-1), a una temperatura de 37°C y un porcentaje de CO₂ del 5% y 21% de O₂, con saturación de humedad (incubador Hera cell, *Heraeus*). Transcurrido ese tiempo, se realizó al microscopio óptico una disgregación mecánica del tejido mediante pinzas *Dumont* (0,1 x 0,06 mm), sin cambiar la solución enzimática de la placa. Este efecto debía ser lo suficientemente drástico como para romper la cápsula conjuntiva que envuelve el CC, pero sin destruir las células del interior. Seguidamente, se incubó la misma placa durante siete minutos en las mismas condiciones anteriores, tras lo cual se transfirió el tejido a un tubo estéril (15 mL, *BD Falcon*) que contenía unos 8 mL de medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM/F-12 1:1, *GIBCO*) con suero bovino fetal (*BioWhittaker*) al 10%, para inactivar las enzimas de la solución de dispersión. Tras centrifugación a 167 g (GS-15R Centrifuge, *BECKMAN*), a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se dispersó suavemente el pellet celular mediante pipeteo, en un volumen de unos 75 µL de medio de cultivo de CC equilibrado (5% CO₂, 21% O₂, con saturación de humedad, 37°C) (Tabla A-2), hasta conseguir resuspender la muestra en su totalidad. En la figura 40 se pueden observar las células aisladas de CC en cultivo tras esta última dispersión.

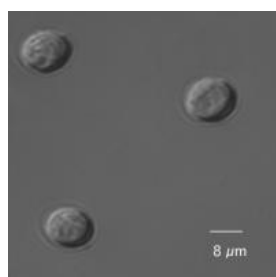


Figura 40: Células glómicas de rata en cultivo. Se observa la forma redondeada y refringente de las células glómicas tras ser dispersadas y cultivadas durante veinticuatro horas (tomada de 262).

En función del objetivo experimental, el procesado posterior de las células obtenidas fue variable. En cualquier caso, se mantuvieron incubadas hasta ese momento a una temperatura de 37°C y unos porcentajes de CO₂ y O₂ del 5 y el 21%, respectivamente, con saturación de humedad.

6.3.1.2. Neuroesferas de cuerpo carotídeo

Las neuroesferas son agregados de células progenitoras con capacidad de proliferación y diferenciación, que se originan a partir de células multipotentes. Dado que estas células madre se encuentran dentro del nicho fisiológico del CC, su formación implicó disponer previamente de un cultivo de células dispersas (apartado anterior).

Los cultivos de neuroesferas que se llevaron a cabo se destinaron a la caracterización del tropismo de diferentes vectores virales adenoasociados, para lo cual se necesitó una cantidad de cuatro CCs, a partir de ratas de unos veinte días de edad.

Tras resuspender las células (apartado 6.3.1.1) en unos 75 µL de medio de cresta neural equilibrado (5% CO₂ y 3% O₂, 37°C) (Tabla A-2), éstas se filtraron por una malla de nylon (*Sefar-Maissa*) de un tamaño de poro de 70 µm sobre un tubo estéril de 15 mL. Para recuperar la mayor cantidad posible de células, se realizaron a continuación varios lavados de la malla con medio completo, hasta obtener un volumen final de muestra filtrada de unos 300 µL. Para cada ensayo, las células filtradas se diluyeron en un volumen de medio de cresta neural de 3 mL, contenido en el pocillo de una placa con fondo tratado para la no adherencia (6 Well Plate, *Costar*). Este tratamiento evita que las células progenitoras se fijen al fondo, lo que adelantaría su diferenciación antes de formar neuroesferas.

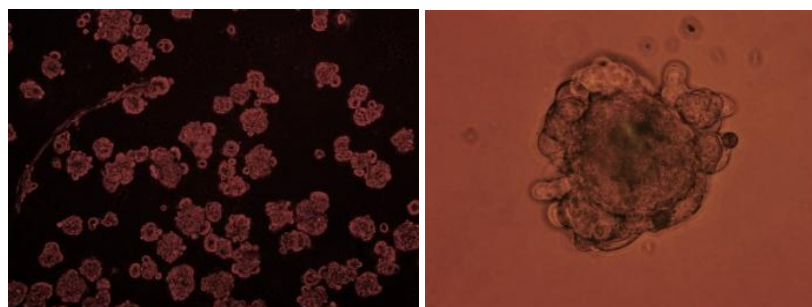


Figura 41: Neuroesferas de rata en cultivo. Las células crecen en suspensión, permi-

tiendo la proliferación de los progenitores y la diferenciación hacia célula glómica. En la foto de la derecha (aumento x40), se aprecia la morfología de una neuroesfera, con un núcleo central donde se conservan las células progenitoras y glomérulos periféricos en los que predominan las células productoras de TH.

Así, las células crecieron en suspensión, incubadas a una temperatura de 37°C y unos porcentajes de O₂ y CO₂ del 3 y del 5%, respectivamente (incubador Galaxy Oxygen Control, *BioTECH*). El hecho de incubarlas en estas condiciones de hipoxia moderada respecto al ambiente fisiológico del CC, facilitó la proliferación y diferenciación de las células progenitoras. Unas setenta y dos horas más tarde, ya era visible la formación de las primeras neuroesferas, aunque el tiempo de proliferación y diferenciación de cada célula es una variabilidad intrínseca del cultivo (Figura 41).

6.3.1.3. Rodajas de cuerpo carotídeo

Una vez obtenidos los CCs (apartado 6.2.2.1), se preparó una disolución p/v de agarosa (*SeaKem GTG, FMC BioProducts*) al 1%, en agua destilada (H₂O_d), y se calentó. Cuando la temperatura descendió a los 42°C, se llenaron rápidamente pequeños moldes cilíndricos de plástico (de unos 4 mm de diámetro y 0,5 cm de longitud) con la base cerrada con parafilm (*Alcan Packaging*). Manteniendo esta temperatura, los CCs fueron incluidos en los moldes con ayuda de unas pinzas *Dumont* (0,1 x 0,06 mm), procurando que quedasen centrados en el interior de la solución. A continuación, estos cilindros se colocaron enseguida en hielo para que la agarosa polimerizase lo antes posible y poder proceder al corte.

Para ello, se desmoldaron los bloques y se pegaron con cianocrilato al fondo de la cámara de un vibratomo (VT1200S, *Leica*), que se llenó rápidamente con PBS frío, para mantener la morfología del tejido. Los cortes se realizaron a un espesor de 150 µm, lo que nos permitió obtener entre dos y cuatro rodajas de cada CC, dado que el espesor medio de este órgano es de unos 500 µm. Las rodajas se depositaron en una placa de cultivo de 3 cm de diámetro, donde se lavaron hasta tres veces con PBS frío y estéril. Por último, se transfirieron a una placa idéntica con 3 mL de medio de cultivo de CC (Tabla A-2) equilibrado al 21% de O₂ y 5% de CO₂, con saturación de humedad, a 37°C de temperatura, donde se mantuvieron hasta el momento de su utilización.

6.3.1.4. Dispersión de células de médula adrenal

La dispersión de células cromafines se realizó únicamente a partir de ratones de la línea TH-EGFP, con objeto de analizar la expresión de cadenas de hemoglobina. Así, una vez obtenidas las MAs (apartado 6.2.2.2), se transfirieron a un tubo estéril de 15 mL que contenía 3 mL de solución I de dispersión (Tabla A-1). Durante treinta minutos, se incubaron a 37°C en un baño termostatzado (P-Selecta®, *Unitronic OR*) en agitación moderada (40 U/min), dispersándolas mecánicamente y

con suavidad con una pipeta automática a intervalos de diez minutos. A continuación, se centrifugaron durante cuatro minutos a 167 g, temperatura ambiente. El precipitado resultante se mezcló con 3 mL de solución II de dispersión (Tabla A-1) y se incubó durante ocho minutos en las mismas condiciones anteriores. Tras dispersión mecánica con la pipeta automática, sin brusquedad, se añadieron unos 5 mL de medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM + 4.5 g/L Glucose, + L-Glutamine, + 0.1 g/L Sodium pyruvate, GIBCO) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SIGMA) para inactivar las enzimas e interrumpir la reacción. Por último, se centrifugó la mezcla a 167 g durante cuatro minutos y, tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en unos 100 µL de medio de cultivo de células cromafines (Tabla A-2) equilibrado en una atmósfera del 21% de O₂ y el 5% de CO₂, con saturación de humedad, a 37°C de temperatura.

6.3.1.5. *Dispersión de células de ganglio cervical superior*

Al igual que en el caso de las células cromafines, estos cultivos se realizaron a partir de ratones de la línea TH-EGFP, con el fin de analizar la expresión de cadenas de hemoglobina en neuronas simpáticas. Así, una vez aislados los GCSs (apartado 6.2.2.1), se transfirieron a un tubo estéril de 15 mL que contenía 3 mL de solución de dispersión de CC (Tabla A-1). Durante unos cuarenta minutos, se incubaron a 37°C en un baño termostatzado en agitación moderada (40 U/min), dispersándolos mecánicamente y con suavidad mediante pipeteo a intervalos de diez minutos. Cuando las muestras estuvieron totalmente disgregadas, se centrifugaron durante cuatro minutos a 167 g, temperatura ambiente. El pellet celular se resuspendió en 3 mL de medio de cultivo de CC (Tabla A-2), y se incubó a 37°C, con porcentajes de O₂ y de CO₂ del 21% y 5%, respectivamente, con saturación de humedad.

6.3.2. Líneas celulares

De forma análoga a la manipulación de cultivos primarios, se requieren condiciones estériles, para lo cual se trabajó en una campana de flujo laminar (Bio48, FASTER), destinada únicamente al manejo de células inmortalizadas.

6.3.2.1. *Células PC12 (Phaeochromocytoma Rat Cells)*

Este modelo simpatoadrenal estuvo en todo momento disponible en el laboratorio, derivado de un vial preliminar cedido hace varios años por un grupo estadounidense. El trabajo experimental se centró, básicamente, en el análisis de expresión y caracterización de las cadenas de hemoglobina, para lo cual se llevaron a cabo ensayos de diversa índole que describiremos más adelante. En cualquier caso, el protocolo de manipulación de estas células tumorales fue común para todos ellos.

Así, a partir de un vial congelado en N₂-líquido, se transfirieron las células a un tubo estéril de 15 mL, previa descongelación a 37°C en un baño en agitación moderada. Rápidamente, se diluyeron en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM + 4.5 g/L Glucose, + L-Glutamine, + 0.1 g/L Sodium pyruvate, *GIBCO*), en una proporción v/v de 1:5, y se centrifugaron durante cinco minutos a 167 g, a temperatura ambiente, con el fin de retirar el DMSO contenido en el medio de congelación. El pellet celular resultante se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo de PC12 (Tabla A-3). Considerando que la densidad celular oscilase entre el 70-80%, creciendo en monocapa, se repartieron las células en una placa de cultivo (*Nunc*) de superficie adecuada, con fondo adherente, completando el volumen final con medio de cultivo de PC12¹. La incubación se realizó a 37°C, con porcentajes de CO₂ y O₂ del 5 y del 21%, respectivamente, con saturación de humedad (Hepa Filter, Direct Heat CO₂ Incubator, *ThermoForma*). El mantenimiento en cultivo y expansión de esta línea requirió dispersión mecánica con pipeta automática cada vez que se alcanzaba la confluencia celular en la placa. De este modo, el medio de cultivo era retirado mediante succión, procurando no arrastrar el césped de células, adherido al fondo. Según la planificación experimental, se realizaba una dilución en medio de cultivo de PC12 equilibrado, y se sembraban en diferentes placas a una densidad en torno al 40-60%.

La congelación de células para almacenamiento en N₂-líquido, precisó que la población estuviese cercana a la confluencia, asegurando de este modo una alta tasa de supervivencia en el momento de cultivarlas nuevamente. Así, tras retirar el medio de incubación, se realizaron dos lavados sucesivos con PBS y, seguidamente, se recogieron mediante dispersión mecánica con pipeta en este tampón fosfato. Alcanzando un volumen final de unos 7 mL, se transfirieron a un tubo estéril, donde se centrifugaron durante cinco minutos a 167 g y temperatura ambiente. El pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio de PC12² con DMSO (*SIGMA*) al 10% y se traspasó a un criovial estéril (*Sarstedt*). Este compuesto actuó como un agente lipofílico que facilitó la congelación posterior. De forma inmediata, se dispuso el vial en una caja de congelación (*NALGENE*) y se mantuvo durante un tiempo mínimo de 24 horas a una temperatura de -80°C, tras lo cual se almacenaron las muestras en N₂-líquido indefinidamente. La utilización de esos contenedores de congelación permitió un enfriamiento paulatino de las células, preservando así la integridad de la membrana plasmática.

6.3.2.2. Células BRL (*Buffalo Rat Liver Cells*)

El cultivo de este tipo celular derivado de hepatocitos de rata búfalo (*Rattus norve-*

¹ Cuando el requerimiento experimental implicó una selección celular por antibiótico o el uso de determinados compuestos en el medio de cultivo, éstos se añadieron en la concentración adecuada al medio de PC12 equilibrado en el momento justo de su incorporación al césped celular.

² La congelación de células PC12 seleccionadas por antibiótico se realizó en medio de cultivo sin la presencia de dicho compuesto.

gicus, sp.) se incluyó dentro de la metodología habitual que conlleva la generación de un ratón *knock-out*, ya que las células embrionarias en las que se produciría la recombinación homóloga del transgén requirieron un medio de cultivo enriquecido en nutrientes y factores de crecimiento. Este medio condicionado se generó a partir de los productos secretados por las células BRL al sobrenadante de la placa. En el laboratorio, se dispuso en todo momento de este modelo citológico, procedente de un vial inicial comprado a la American Type Culture Collection (ATCC).

Siguiendo un protocolo de descongelación análogo al descrito anteriormente para las PC12, las células BRL se cultivaron en condiciones de CO₂ y O₂ del 5 y del 21%, respectivamente, a una temperatura de 37°C, con saturación de humedad (Hepa Filter, CO₂ Water Jacketed Incubator, *Forma Scientific*). Para ello, se utilizaron placas de cultivo de 10 cm de diámetro con fondo adherente (*Nunc*), lo que permitió el crecimiento de las células en monocapa. El medio específico para ello se presenta en la Tabla A-3. El mantenimiento y amplificación de la línea requirió una incubación de unos tres-cinco minutos a 37°C con tripsina/EDTA (*GIBCO*) al 0,02% en PBS, previo lavado con este mismo tampón fosfato, para separar las células del fondo de la placa. Una vez despegadas, se inactivó la enzima con, al menos, dos volúmenes de medio de BRL, completando después con la cantidad necesaria de medio completo para la dilución en nuevos cultivos.

Una vez obtenida una cantidad celular equivalente a unas doce placas, se inició la producción a gran escala de medio condicionado, lo cual implicó el cultivo en frascos específicos (Easy Flask, T225 Filt, Nunclon D SI, *Nunc*). De esta manera, se facilitó la recogida del sobrenadante, ya que estos recipientes admitían un volumen de hasta 100 mL. La recolección se realizó tras cinco días de incubación de las células, añadiendo después nuevo medio de BRL al mismo cultivo. A medida que se obtenía el medio condicionado, se filtraba (Stericup & Steritop Express Plus 250 mL, 0.22 µm, *Millipore*) para eliminar restos celulares, antes de su almacenamiento a -20°C. Esta operación de recogida se repitió hasta un máximo de cinco veces para cada cultivo. Considerando que disponíamos de unas doce unidades, se obtuvo un volumen total de medio enriquecido de unos 6 litros.

6.3.2.3. Células ES (*Embryonic Stem Cells*)

Son células madre embrionarias de ratón, una herramienta habitual en técnicas de ingeniería genética que, en nuestro caso, se utilizó para la generación del modelo *knock-out* condicional del canal de K⁺ TASK-1. Esta línea celular, estirpe 129SvJ de color de pelaje agutí, fue comprada a la ATCC.

El cultivo de ES se realizó sobre una matriz de gelatina (Gelatin, Type A: from porcine skin, *SIGMA-ALDRICH*) al 0,1% (p/v, en H₂O_{dd}) dispuesta sobre placas con fondo adherente (*Nunc*), lo que permitió un mejor anclaje de las células. El tratamiento de las placas con esta solución precisó una incubación durante quince

minutos a temperatura ambiente, retirándola después mediante succión o con pipeta serológica.

La descongelación de células desde el N₂-líquido, así como el mantenimiento en cultivo y la amplificación en placas, se efectuó según el mismo procedimiento descrito para las BRL, incubándolas en las mismas condiciones de temperatura, O₂ y CO₂. El medio específico (Tabla A-3) estuvo suplementado con factor inhibidor de leucocitos (ESGRO®-LIF 10⁷ units/mL, *Chemicon International*), para mantener la totipotencialidad de estas células embrionarias. Tras la inserción del transgén mediante electroporación (apartado 6.3.4.1), el medio de cultivo fue suplementado con neomicina (*GIBCO*) en una proporción v/v de 1:500 a partir de un stock de 100 mg/mL en PBS, para seleccionar las células recombinantes. El aislamiento de los clones de células resistentes a neomicina, se realizó en pocillos de placas *multiwell-24* (*Nunc*) mediante separación mecánica con pipeta serológica del fondo de la placa. El criterio morfológico que se siguió para la elección de colonias, se basó en la presencia de células sin prolongaciones citoplasmáticas y poco adheridas en toda su superficie al suelo de la placa, señal de la escasa o nula diferenciación de las mismas. En todo momento, se insistió en la individualidad de cada clon, utilizando material único para cada uno de ellos. La dispersión celular de cada clon se realizó por tratamiento enzimático, con unas dos-tres gotas de tripsina/EDTA al 0,05%, que se inactivó después con 1 mL de medio completo de ES suplementado con neomicina. En el momento en que se alcanzó la confluencia en el pocillo, las células se dispersaron nuevamente según la misma tripsinización anterior, en sendos pocillos de dos placas *multiwell-24*. De este modo, se consiguió una réplica de cada clon, destinada exclusivamente a la extracción del DNA genómico (apartado 6.5.2.1.1) para el posterior análisis por *Southern blot* (apartado 6.5.2.5.2) de búsqueda de recombinantes. El cultivo restante se congeló directamente en la placa a una temperatura de -80°C cuando la densidad celular estuvo cercana a la confluencia. Para ello, se retiró el medio y, tras dos lavados sucesivos con PBS y dispersión enzimática con tripsina/EDTA al 0,05%, se resuspendieron las células en medio de ES con DMSO al 10%, sin el antibiótico de selección.

Una vez se determinaron los clones positivos para la recombinación del transgén, su descongelación se realizó siguiendo el protocolo habitual descrito para las PC12, teniendo en cuenta que esta vez se partió desde los anteriores pocillos de placas *multiwell-24*. De este modo, se expandieron hasta varias placas de 10 cm de diámetro y, llegados a la confluencia, se congelaron en crioviales según el procedimiento común, quedando así disponibles para la microinyección en blastocistos y su trasplante a hembras pseudogestantes por parte del personal especializado del CPYEA.

6.3.2.4. Células HEK293 (*Human Embryonic Kidney Cells*)

Esta línea celular de origen humano se utilizó para la producción de tres serotipos -

diferentes de vectores virales adenoasociados, tal como indica el protocolo descrito (327).

Dada la colaboración establecida con la Dra. Corinna Burger (*The University of Wisconsin-Madison*), las células HEK293 fueron manipuladas para este fin en su laboratorio. En cualquier caso, el cultivo de las mismas se realizó siguiendo las indicaciones de la publicación citada anteriormente.

6.3.2.5. Células NIH3T3

Se trata de una línea celular originada a partir de fibroblastos de embriones de ratón, procedente de la ATCC, que sirvió para el análisis de expresión de cadenas de hemoglobina.

6.3.2.6. Células EOMA (*Mouse Hemangioendothelioma Endothelial Cells*)

Son células tumorales derivadas de un hemangioendotelioma de ratón adulto. Estas células se compraron a la ATCC y, al igual que las anteriores, se utilizaron para estudiar la presencia de cadenas de hemoglobina. Del mismo modo, la Dra. Rocío Sánchez nos prestó la cantidad de RNA total necesaria para el análisis.

6.3.2.7. Células MAH (*Adrenal-Derived HNK-1⁺ cells*)

Esta línea celular está formada por los precursores del sistema simpatoadrenal del organismo, que comprende órganos tales como el CC o la MA. La finalidad del trabajo con estas células fue la misma que en los dos últimos casos.

6.3.3. Tratamientos celulares

Con el objetivo de analizar la regulación por hipoxia del mRNA de la cadena α de la hemoglobina en células PC12, se llevaron a cabo tratamientos celulares específicos que afectaban a la maquinaria de síntesis proteica o a la transcripción génica. Asimismo, se utilizaron compuestos que mimetizaban determinadas condiciones ambientales de estrés en estas mismas células para cuantificar su efecto sobre la expresión de determinados genes y la secreción de catecolaminas.

6.3.3.1. Tratamiento con actinomicina D

El bloqueo de la transcripción celular en el cultivo se consiguió con la adición al medio de actinomicina D (*SIGMA*), en una concentración final de 300 μ M. Este compuesto se une al DNA en el complejo de inicio de la transcripción, evitando la elongación por la RNA polimerasa.

En vista de su alta toxicidad, la actinomicina D es capaz de ocasionar muerte celular, por lo que se utilizaron cultivos celulares cercanos a la confluencia. De este

modo, se aseguró la obtención de un número suficiente de células tras el tratamiento para extraer de ellas el RNA total (apartado 6.5.3.1.1). Antes del estímulo hipóxico, las células se incubaron con el bloqueante durante treinta minutos en las condiciones habituales (5% CO₂, 21% O₂, 37°C). La actinomicina D se mantuvo en el medio de cultivo durante todo el transcurso experimental.

6.3.3.2. *Tratamiento con cicloheximida*

La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas que actúa bloqueando la fase de elongación durante la traducción. El protocolo que se siguió para este tratamiento fue idéntico al anterior, con la salvedad de que la concentración final del compuesto (*SIGMA*) en el medio de cultivo fue de 10 µM.

6.3.3.3. *Tratamiento con dimetiloxalilglicina*

Para mimetizar los efectos de la estabilización de HIF-1, se utilizó un inhibidor de las enzimas prolil hidroxilasas, la DMOG (*BIOMOL*), a una concentración final de 1 mM en el medio de cultivo. El compuesto se preparó previamente en DMSO que, al estar muy diluído, no afectó a la viabilidad ni al metabolismo celular. La presencia de DMOG en el cultivo se mantuvo durante todo el período de incubación, hasta el momento de la extracción del RNA total (apartado 6.5.3.1.1).

6.3.3.4. *Tratamiento con KCl*

Cuando la concentración de cloruro potásico (KCl) en el medio extracelular es elevada (>4,5 mM), la membrana celular se despolariza, induciendo la secreción de vesículas. Para conseguir estas condiciones en las células PC12 y depletar el contenido intracelular de catecolaminas, los cultivos se incubaron normalmente, con la adición al medio de KCl (*SIGMA*), a una concentración de 70 mM, durante veinticuatro horas.

6.3.3.5. *Tratamiento con CdCl₂*

El cloruro de cadmio (CdCl₂) provoca el cierre de todos los tipos de canales de Ca²⁺, lo que impide la secreción al medio extracelular de vesículas después de un estímulo despolarizante.

En células PC12 previamente depletadas de vesículas secretoras (ver apartado anterior), la adición al medio de 200 µM CdCl₂ (*SIGMA*) durante un tiempo máximo de tres horas permitió analizar la velocidad de síntesis de nuevas vesículas.

6.3.3.6. *Tratamiento con m-hidroxibencilhidracina*

Este compuesto bloquea la síntesis de dopamina al inhibir la acción de la enzima DOPA descarboxilasa. La incubación de células PC12, en placas de doce pocillos,

con *m*-hidroxibencilhidracina (NSD-1015, *SIGMA-FLUKA*) a una concentración final de 400 μ M durante un intervalo de tiempo de treinta-doscientos cuarenta minutos en una solución HEPES¹, permitió después cuantificar los niveles del metabolito 3,4-hidroxifenilalanina (L-DOPA) secretados al medio y contenidos en las propias células (apartado 6.7).

6.3.4. Modificación genética de células

Tanto para la generación de modelos animales *knock-out* como para la obtención de cultivos celulares genéticamente modificados, se llevaron a cabo diversas técnicas de inserción de DNA exógeno, bien desde un ácido nucleico desnudo o bien desde un vector con el inserto de interés.

6.3.4.1. Electroporación

Con este método se realizó la transferencia exógena de DNA en las células ES para la generación del ratón *knock-out* condicional del gen *Kcnk3* y, en las células PC12, para obtener clones de expresión estable de la cadena α de la hemoglobina y de su proteína estabilizante. Para una transferencia génica más eficiente, el plásmido en el que se insertó la secuencia del gen *Kcnk3* para la recombinación homóloga con el genoma de la célula embrionaria, se dializó utilizando membranas semipermeables de un tamaño de poro de 1 kDa (Membrane MWCO 1000 Part. Made of Cellulose Ester, *AmiKa Corp.*). De esta manera, se disminuyó la cantidad de sales presentes en la solución, que podrían interferir en el choque eléctrico que se aplicaría después.

En ambos casos, se partió de un cultivo celular confluyente en placa de 10 cm de diámetro, resuspendido en 700 μ L del medio de cultivo adecuado, tras centrifugación a 167 g durante cinco minutos (temperatura ambiente). En un volumen máximo de 15 μ L, se añadieron 10-15 μ g del DNA plasmídico de interés y se heterogenizó suavemente con el cultivo mediante pipeteo. Esta mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (Gene Pulser[®] Cuvette, 0.4 cm, *BIO-RAD*) y se sometió a un pulso eléctrico de 240 V y 500 μ F (Gene Pulser[™], *BIO-RAD*), resultando una constante de tiempo del orden de 6-8 en los dos tipos celulares. Seguidamente, se dejaron reposar las células electroporadas durante diez minutos, en la misma cubeta, para recuperar la estabilidad de la membrana, después de lo cual se diluyeron en un tubo estéril que contenía 6 mL del medio de cultivo correspondiente, y se repartieron de forma equitativa en dos placas de 10 cm de diámetro, hasta un volumen final de medio completo de 10 mL. A continuación, se incubaron normalmente. Dado que en ambos casos el plásmido transferido confería a las células resistencia al antibiótico neomicina, al día siguiente éste se añadió al cultivo en la concentración adecuada para cada tipo celular (400 μ g/mL -

¹ **Tampón HEPES:** 125 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,3 mM CaCl₂; 1,2 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 5,6 mM glucosa; 25 mM HEPES; 100 μ M EDTA, en H₂O_{dd}; pH 7,4.

en el caso se células PC12 y 200 µg/mL para las ES), comenzando así la selección de las células modificadas genéticamente.

En el caso de las células embrionarias, una vez seleccionadas las que fueron recombinantes, éstas se electroporaron nuevamente con un plásmido resistente a puromicina, portador del gen de la recombinasa CRE (Tabla A-4), para comprobar la eficiencia de la enzima sobre la secuencia del transgén.

6.3.4.2. *Lipofección*

Previamente a la producción de clones de PC12 de expresión estable de los genes de la cadena α de la hemoglobina y de la AHSP, se comprobó la eficiencia de los plásmidos adquiridos para cada caso (Tabla A-4). Para ello, se utilizó lipofectamina (Lipofectamine™ 2000 Reagent, *Invitrogen*), un compuesto que facilitó la entrada del DNA en la célula mediante la formación de vesículas lipofílicas alrededor del ácido nucleico.

El protocolo que se siguió para la transfección fue el descrito por el fabricante, adaptado a la superficie de placa de cultivo correspondiente, utilizando una cantidad de DNA de entre 5 y 10 µg.

6.3.4.3. *Transducción de células con virus adenoasociados*

Dada la importancia de esta herramienta de modificación génica en estudios relacionados con el CC, se analizó la capacidad de tres serotipos diferentes (AAV-1, AAV-2 y AAV-5) para transducir células de este órgano. La infección se llevó a cabo en dos tipos de preparaciones. Por un lado, rodajas de tejido y, por otro, neuroesferas generadas a partir de un cultivo de células dispersas.

6.3.4.3.1. *Rodajas de cuerpo carotídeo*

Una vez obtenidas las rodajas de este órgano (apartado 6.3.1.3), se dispusieron de manera individual en pocillos de una placa multiwell-96 (*Nunc*). Previamente, para cada serotipo AAV, se preparó un volumen de 30 µL de medio de CC sin suero bovino fetal (Tabla A-2) con una cantidad de 20×10^9 partículas virales, y se dispuso sobre la superficie de la rodaja, quedando ésta inmersa en la solución. El hecho de eliminar el componente sérico facilitó la adsorción del virus a la membrana plasmática de las células. Con esta mezcla, las rodajas se mantuvieron en condiciones normales de incubación durante tres horas, después de las cuales se añadieron 120 µL de medio de CC completo para diluir los virus presentes.

Dado que la proteína fluorescente EGFP que lleva el genoma viral tarda entre cuarenta y ocho y setenta y dos horas en expresarse, las rodajas se conservaron durante cuatro días en el incubador. Transcurrido este tiempo, se comenzó el análisis inmunohistoquímico de la infección (apartado 6.4.1.3).

6.3.4.3.2. Neuroesferas de cuerpo carotídeo

La obtención de neuroesferas transducidas con este tipo de vectores virales se llevó a cabo incorporando los mismos al cultivo de células dispersas el mismo día de su generación. Así, una vez resuspendido el pellet celular resultante de la dispersión mecánica (apartado 6.3.1.2) en medio de cultivo de CC sin suero bovino fetal, y posterior filtración de las células por la malla de nylon, éstas se repartieron en pocillos de una placa multiwell-96 con fondo tratado para la no adherencia (Corning), en volúmenes de 100 μ L. Seguidamente, se añadieron 20×10^9 partículas virales del serotipo viral en cuestión y se incubaron en condiciones normales de crecimiento durante cinco-seis horas, después de lo cual se transfirieron a pocillos de una placa multiwell-6 (Costar) que contenían 3 mL de medio de cresta neural (Tabla A-2). A partir de aquí, las células se cultivaron en condiciones de hipoxia respecto a la situación anterior (3% O₂), manteniendo una temperatura de 37°C y un porcentaje de CO₂ del 5%. De esta manera, se favoreció la proliferación y diferenciación de las células progenitoras. Transcurridos entre quince-veinte días, las neuroesferas en cultivo se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia (IX71, Olympus) para observar la expresión de la proteína vírica EGFP y proceder al análisis inmunohistoquímico (apartado 6.4.1.3).

6.3.5. Separación de células por citometría de flujo

Esta técnica, denominada “*Cell sorting*”, se basa en hacer pasar una suspensión heterogénea de células alineadas individualmente por delante de un haz de láser focalizado, lo que produce una serie de señales correspondientes a distintos parámetros morfológicos de la célula y a sus características fluorescentes. Así, en función del tamaño y complejidad nuclear y citoplasmática, se generan diferentes signos de dispersión de la luz mientras que, por otro lado, se detectan señales de fluorescencia procedentes de moléculas marcadas con un fluorocromo, bien a partir de complejos antígeno-anticuerpo o de proteínas fluorescentes expresadas por la propia célula. Los caracteres emitidos son recogidos por distintos detectores capaces de convertirlos en señales electrónicas que, posteriormente, son digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en la misma célula y discriminar así su separación del resto de la población.

Aplicada a nuestro estudio de análisis de expresión de genes de las cadenas de hemoglobina, esta tecnología sirvió para separar las células glómicas de CC de rata, previo marcaje inmunocitoquímico, así como las células TH⁺ de la MA y del GCS de ratones que expresaban de forma constitutiva la proteína fluorescente EGFP junto con la enzima TH.

6.3.5.1. Células glómicas de cuerpo carotídeo

En base a una publicación de 1994 (328), se vio que dentro del nicho fisiológico del CC de rata, sólo las células tipo I poseen la glicoproteína de membrana CD57,

también conocida como HNK-1 (*Human Natural Killer-1*) o Leu-7, lo que permitió su marcaje específico para el aislamiento por citometría de flujo.

Dado el pequeño porcentaje de células glómicas respecto a la población total del CC, fue necesario disponer de una cantidad de muestra inicial de unos doce-catorce órganos, que se dispersaron según el protocolo descrito en el apartado 6.3.1.1, en un volumen final de unos 100 μ L. Previa filtración de las células obtenidas por una malla de nylon (*Sefar- Maissa*) de un tamaño de poro de 70 μ m y tres lavados sucesivos del filtro con tampón FACS¹ (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*), se transfirieron a un tubo específico para el citómetro, hasta alcanzar un volumen de unos 2 mL con este buffer. Después de una centrifugación a 201 g (*Eppendorf*) y 4°C, durante cuatro minutos, se procedió al marcaje del pellet celular durante veinte minutos, a 4°C de temperatura, con un anticuerpo monoclonal específico para la proteína HNK-1 (CAM Folio™ anti-human CD57, *PharMinger*), preparado en 300 μ L de tampón FACS en una concentración de 1:600 (v/v). Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 1 mL más de tampón para eliminar el sobrenadante con una centrifugación idéntica a la anterior. El pellet de células se resuspendió entonces en 300 μ L de anticuerpo FITC (FITC-conjugated AffiniPure ab₂ Fragment Goat antimouse Ig G, *Immunoresearch*), diluido doscientas veces en tampón FACS, y se mantuvo en hielo y oscuridad durante veinte minutos. De este modo, se consiguió marcar las células HNK-1⁺ con un fluoróforo. Por último, se procedió al lavado de este anticuerpo secundario de igual forma que se hizo con el anterior, y se resuspendió la muestra en 300 μ L de reactivo 7AAD (BD Pharmingen™ 7-AAD, *BD BioScience*), diluido en FACS en una proporción v/v de 1:500. Este compuesto actuó como un marcador de viabilidad, incapaz de intercalarse en el DNA de las células metabólicamente activas. El tiempo de actuación de este reactivo sobre el cultivo osciló entre quince-cuarenta minutos, a 4°C.

Una vez realizada la inmunocitoquímica, se procedió a pasar el total de la población por el citómetro de flujo (Citómetro MoFlo, *Cytomation*), donde se ajustaron los parámetros adecuados para la selección de las células tipo I (detector FITC, células 7AAD⁻). Además, se aseguró la pureza de la preparación aislando únicamente aquéllas que emitían una señal fluorescente intensa quedando, pues, en el rango de células altamente FITC⁺, sin posibilidad de mezcla con otros tipos citológicos que pudieran emitir fluorescencia basal. Por otro lado, se obtuvo una muestra del resto de la población del cultivo, que actuaría como control en los análisis posteriores por técnicas moleculares. Las dos muestras del cultivo se recogieron en sendos tubos estériles (1,5 mL, *Axygen*) que contenían 250 μ L de tampón de lisis de un kit de extracción de mRNA (Dynabeads® mRNA Direct Micro Kit, *Invitrogen*). Por término medio, la cantidad de células tipo I aislada a partir de una preparación de doce-catorce CCs osciló entre cuatrocientas-mil, mientras que

¹ **Tampón FACS:** 1% Penicilina/Estreptomicina; 0,2% (p/v) Albumina de Suero Bovino; 1% Hepes; 10% H₂O_{dd}, en Leibobitz-15.

como muestra representativa de la heterogeneidad celular del órgano se recogieron unas diez mil, desechando las restantes.

6.3.5.2. *Células cromafines de la médula adrenal y neuronas simpáticas del ganglio cervical superior*

A partir de la línea de ratones transgénicos TH-EGFP (apartado 6.1.1), se realizaron dispersiones celulares de la médula adrenal y del GCS (apartados 6.3.1.4 y 6.3.1.5, respectivamente), con el fin de aislar por citometría esas células TH⁺ que presentaban fluorescencia verde debido a la expresión de la proteína EGFP. Por este motivo, en estas preparaciones no fue necesario realizar un marcaje inmunocitoquímico, aunque sí se incubaron con el marcador de viabilidad 7AAD en las mismas condiciones que en el caso anterior. Previamente a este tratamiento, las células de ambos cultivos se filtraron por una malla de nylon de un tamaño de poro de 70 µm, con tres lavados sucesivos con tampón FACS, y se centrifugaron dos veces para eliminar los restos de medio de cultivo de la preparación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con el reactivo 7AAD, las muestras se pasaron por el citómetro, ajustando unos parámetros de discriminación celular idénticos a los de las células tipo I del CC.

En el caso de la MA, se precisó una cantidad de seis-ocho órganos, y lo mismo para el GCS, obteniendo rendimientos de entre mil doscientas-dos mil y quinientas-dos mil células EGFP⁺, respectivamente, con muestras representativas del total de la población del orden de cuatro mil-diez mil unidades.

6.3.6. **Medida de la proliferación celular**

En el análisis de clones de células PC12 de expresión estable de la cadena α de la hemoglobina y de su proteína estabilizante, se planteó una posible variación en su tasa de crecimiento en cultivo, consecuencia de la sobreexpresión génica inducida. Para estudiar esta potencial diferencia, se llevaron a cabo recuentos manuales en hemocitómetros. Posteriormente, se utilizó un kit comercial, con el fin de comprobar la reproducibilidad del resultado anterior.

6.3.6.1. *Hemocitómetro*

El recuento de la densidad celular con este instrumental (Bright-line hemacytometer, SIGMA) se llevó a cabo a partir de cultivos en placas de 3 cm de diámetro, destinados únicamente a este fin. Así, se recogió el césped de células en un volumen de medio de PC12 de 1-2 mL (en función de la dilución deseada para el conteo), y se transfirió a un tubo estéril de 15 mL. Tras homogenización suave mediante pipeteo, se tomó una muestra de 10 µL y se introdujo por capilaridad en una de las dos cámaras del hemocitómetro. Seguidamente, se dispuso sobre el objetivo x10 de un microscopio óptico invertido (*Nikon TMS*) y se procedió al recuento de células en las nueve áreas definidas en la cámara, del cual se calculó la

media aritmética. Considerando que la superficie de cada cuadrado representa un volumen total de $0,1 \text{ mm}^3$, se pudo calcular la concentración celular por mL^1 y, por tanto, el total de la población en cada cultivo disponible para el estudio. Un ensayo de este tipo suele ir acompañado de un test de viabilidad mediante tinción con azul tripán. Sin embargo, el seguimiento continuo de las PC12 crecidas sobre placa, nos llevó a obviar este análisis, asumiendo que prácticamente el total de células registradas se mantenían vivas.

6.3.6.2. “Cell Proliferation Kit”

Se dispuso de un kit comercial (Cell Proliferation Kit XTT, Roche) que permitió obtener la densidad celular de los cultivos, crecidos en pocillos de placas de 96. El fundamento del mismo se basó en la medida de la actividad metabólica de la célula, ya que se cuantificó la producción de un compuesto coloreado (formazán) tras la reacción con una sal (*tetrazolium salt* XTT) añadida al sobrenadante del cultivo durante cuatro horas. De este modo, se obtuvo no sólo el número de células sino que, además, se aseguró una viabilidad del 100% en el recuento. La cuantificación del formazán metabolizado se realizó por espectrofotometría, a una longitud de onda (λ) de 475 nm con referencia de 600 nm, utilizando para ello un espectrómetro de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation). La absorbancia registrada se correlacionó con la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales e, indirectamente, con la cantidad del número de células. Siguiendo en todo momento el protocolo comercial indicado, se precisó disponer inicialmente de un total de cuatro mil células en cada pocillo, para lo cual se utilizó el hemocitómetro.

6.4. HISTOLOGÍA

6.4.1. Análisis de expresión de proteínas por inmunohistoquímica

La caracterización histológica del CC de los diferentes ratones *knock-out* relacionados con los genes *Kcnk3* y *Kcnk9*, así como de las neuroesferas de este mismo órgano infectadas con diferentes serotipos de vectores virales adenoasociados, se llevó a cabo por análisis inmunológico de las células TH^+ . Según el objetivo experimental, el marcaje se realizó con anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes o con diaminobencidina (DAB), como se verá en los puntos 3 y 4, respectivamente, de este mismo apartado.

6.4.1.1. Fijación e inclusión de la muestra

Independientemente del modelo a analizar, la fijación del mismo implicó una incu-

¹ Resultado del producto: media aritmética x factor de dilución x 10^4 .

bación en paraformaldehído al 4%¹ (Paraformaldehyde, SIGMA) a 4°C de temperatura, durante dos horas en el caso de bifurcaciones carotídeas y cuarenta minutos cuando se trató de neuroesferas, seguida de un tratamiento en sacarosa al 30% (p/v) en H₂O_{dd}, durante veinticuatro-cuarenta y ocho horas, y a la misma temperatura anterior. Con ello, se consiguió crioproteger el tejido en el momento de la congelación posterior. Tras un lavado en PBS para eliminar restos de los reactivos anteriores, la muestra se incluyó en O.C.T. (Optimal Cutting Temperature –O.C.T.TM- Compound, Tissue Tek), dispuesto sobre un molde de plástico (Cryomold Intermediate 15 mm x 15 mm x 5 mm, Tissue Tek), procurando en todos los casos no arrastrar gotas del tampón, ya que impediría una correcta inmersión del tejido en el O.C.T. Rápidamente, se procedió a la congelación de todo el bloque sobre nieve carbónica, quedando después almacenado a -80°C hasta el momento del corte histológico.

6.4.1.2. Obtención de secciones de tejido

En los dos casos mencionados, las muestras incluidas en O.C.T se cortaron en secciones de 10 µm con ayuda de un criostato (CM3050 S, Leica), que mantuvo un intervalo de temperatura de -33°C a -27°C entre la muestra y el resto de la cámara. Las secciones obtenidas se dispusieron sobre portas previamente tratados para facilitar la adherencia de muestras congeladas (Thermo scientific) y, tras mantenerlos a temperatura ambiente durante toda la noche, se guardaron a -20°C hasta el momento de su marcaje con anticuerpos.

6.4.1.3. Inmunohistoquímica de fluorescencia

Como se ha mencionado anteriormente, tan sólo se aplicó este tipo de análisis a los cortes de neuroesferas de CC procedentes de una infección viral, dispuestos según el apartado anterior. Así, tras cuatro lavados sucesivos del porta por inmersión en PBS y permeabilización posterior con PBS-Tritón al 0,1%² (PBTx-0.1%) durante diez minutos, se procedió al bloqueo³ de la membrana por un tiempo de una hora, a temperatura ambiente en todo momento. A continuación, se incubó la muestra con dos anticuerpos primarios de diferente origen y con distinta especificidad (Tabla A-10), en un volumen total de 200 µL en solución bloqueante, dentro del espacio creado entre el porta y un cristal sellado por la tensión superficial ejercida por la solución. El contacto con los anticuerpos se mantuvo durante toda la noche, a la temperatura requerida por el fabricante. Al día siguiente, el exceso de anticuerpo se eliminó con cuatro lavados en PBTx-0.1%, tras lo cual se procedió al marcaje de la proteína de interés con el fluoróforo por incubación durante dos horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secunda-

¹ **Paraformaldehído-4%:** 4% paraformaldehído (p/v) en PBS; pH 7,4.

² **PBTx-0.1%:** 10% PBS-10X (v/v); 1% Tritón-10% (v/v), en H₂O_{dd}.

³ **Solución de bloqueo:** 10% Fetal Calf Serum-100X (v/v); 1 mg/mL Albumina de Suero Bovino, en PBTx-0,1%.

rio conjugado a una molécula de este tipo. Por esta razón, a partir de aquí se procuró mantener el porta protegido de la luz. De nuevo, el anticuerpo excedente se excluyó de la muestra siguiendo el método anterior, y se procedió al marcaje de los núcleos celulares a través de un tratamiento de diez minutos con DAPI (en proporción v/v de 1:1000, en PBS), a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS y un último con H₂O_d, se preparó el tejido para su visualización al microscopio invertido de fluorescencia (*Olympus PROVIS*), disponiendo un cubre (*Menzel-Gläser*) sobre el líquido de montaje (Dako Fluorescent mounting medium, *Dako*) aplicado previamente en la muestra. Para conseguir un análisis más detallado de la imagen, se recurrió a la microscopía confocal (DM IRBE, *Leica*).

6.4.1.4. Inmunohistoquímica con diaminobencidina (DAB)

El fundamento de este tipo de inmunohistoquímica enzimática se basa en el precipitado coloreado que forma la DAB al funcionar como sustrato para la enzima peroxidasa, en presencia de H₂O₂. Las células TH⁺ de bifurcaciones carotídeas de ratón se analizaron según esta metodología, utilizando para ello un kit comercial (Dako EnVision+System-HRP –DAB-for use with rabbit primary antibodies, *Dako*). El procesado de las muestras se realizó según las instrucciones recomendadas en el mismo.

6.4.2. Morfometría: estimación volumétrica de órganos animales

A partir de secciones de bifurcaciones carotídeas de ratón sometidas a un marcaje inmunohistoquímico mediante DAB para la detección de las células positivas para TH (apartados 6.4.1.1-6.4.1.4), se estimó el volumen ocupado por el CC. Para ello, se utilizó el programa bioinformático *Cast Grid (Olympus)*, acoplado a un microscopio, según el cual se delimitó en cada sección de tejido el área correspondiente a este órgano quimiosensor y, aleatoriamente, se distribuyeron de manera automática una serie de puntos equidistantes, en función de parámetros previamente seleccionados (Área asociada al punto= 912,7 μm²; aumento x10; 5 puntos). Una vez calculado el total de puntos incluidos dentro del contorno elegido para todas las secciones de una misma bifurcación, se aplicó una fórmula matemática¹ que directamente nos proporcionó el volumen estimado del órgano.

6.5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.5.1. Cultivos de bacterias y producción de fagos

Además de modelos animales, el presente estudio requirió el uso de determinados

¹ Volumen final= A(punto) x Espesor corte x N° total puntos.

microorganismos y virus como herramienta genética. Así, se cultivaron organismos procariotas de diferentes estirpes bacterianas y en diversos medios, con el fin de extraer y purificar el DNA plasmídico contenido en su interior. Por otro lado, el bacteriófago λ permitió la localización de secuencias génicas de mamíferos en el cromosoma de las bacterias infectadas como parte de la metodología de generación del ratón *knock-out* condicional para el canal TASK-1.

Del mismo modo que para los cultivos de células animales, en este caso también son imprescindibles las condiciones estériles. Dada la falta de disponibilidad de un área destinada exclusivamente a la manipulación de estos organismos, se trabajó junto a la llama de un mechero Bunsen con material autoclavado, consiguiendo así el aislamiento de contaminaciones ambientales.

6.5.1.1. Medios de cultivo

6.5.1.1.1. Medio sólido

Con el fin de obtener colonias aisladas, susceptibles de ser incubadas después en medio líquido, las bacterias se crecieron sobre un gel de agar con los ingredientes nutritivos básicos (LB Agar, LENNOX, *Pronadisa*), dispuesto sobre una placa Petri (P101, *Soria genlab, S.A.*). Este medio se preparó según las indicaciones del fabricante y, seguidamente, se esterilizó por tratamiento en autoclave.

La siembra en este tipo de sustrato se realizó, bien a partir de un stock comercial de bacterias transformadas crecidas a su vez sobre gel de agar, o bien desde una pequeña cantidad de cultivo líquido. En el primer caso, la extensión de los microorganismos se realizó mediante tres-cuatro barridos sucesivos con asa de siembra estéril por toda la superficie de la placa, arrastrando en cada uno las bacterias sembradas en el barrido anterior. Cuando las bacterias procedieron de un cultivo en medio líquido, se dispuso sobre la placa un pequeño volumen del mismo (100 μ L, aproximadamente), y se repartió por toda la superficie con un asa esterilizada. De cualquier modo, la incubación posterior se realizó a una temperatura de 37°C (*Heraeus Instruments*), durante toda la noche.

6.5.1.1.2. Medio líquido

Para el crecimiento de bacterias en líquido se dispuso de dos tipos de medios enriquecidos. Así, en función del rendimiento que se quisiera obtener, se utilizó medio LB (Luria Broth, MILLER'S Modification, *Pronadisa*) o medio Terrific (Terrific Broth, *Pronadisa*), este último más nutritivo, preparados según las indicaciones comerciales, con la consiguiente esterilización térmica en autoclave. La finalidad en ambos casos fue purificar el DNA plasmídico del cultivo. En el caso del medio LB, se consideró un volumen de unos 5 mL, contenido en un tubo estéril (PP-Test tubes, 50 mL sterile, *CELLSTAR*), mientras que para el crecimiento en Terrific el volumen fue de 100 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad. El

inóculo de los microorganismos se realizó, respectivamente, mediante punta de micropipeta o asa de siembra (estériles), a partir de una única colonia de bacterias crecida sobre gel de agar. Las condiciones de incubación fueron 37°C de temperatura y una agitación de 230 rpm (Infors AG CH-4103 Bottmingen, *Unitron*), durante toda la noche.

Cuando se precisó una población bacteriana susceptible de ser infectada por el bacteriófago λ , dentro de la tecnología de generación de modelos animales recombinantes, se inocularon 50 mL de medio LB suplementado con 2% de maltosa y 0,2 M de sulfato de magnesio (MgSO_4) con una única colonia de la estirpe de *E. coli* XLI-Blue-MRA-P2, y se crecieron durante toda la noche en condiciones idénticas a las anteriores. El hecho de suplementar el medio líquido con maltosa aumentó la eficiencia de adsorción del fago a la pared bacteriana.

Para el caso concreto de producción de bacterias competentes mediante un protocolo de choque térmico, fue necesario inocular un volumen de 100 mL de medio LB con un cultivo de 1 mL de bacterias crecidas durante la noche anterior en ese mismo sustrato (37°C, 230 rpm). Según el procedimiento indicado, el cultivo se incubó en las mismas condiciones de temperatura y agitación, hasta alcanzar una tasa de crecimiento equivalente a una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,5 (apartado 6.5.1.3).

6.5.1.2. Infección por bacteriófagos

El primer requisito para la generación de un modelo murino modificado genéticamente es introducir la secuencia génica que se desea manipular en el interior de una población bacteriana. Para ello, se utiliza un vector de tipo plasmídico o bien un virus capaz de infectar estos organismos procariontes.

En el laboratorio se dispuso de una genoteca de fagos del tipo λ (5×10^3 pfu/ μL), que contenían fragmentos de diferentes tamaños del genoma del ratón. La búsqueda de la secuencia de interés, en nuestro caso el gen *Kcnk3*, se realizó mediante una infección de 600 μL de bacterias de *E. coli*, estirpe XLI-Blue-MRA-P2, con 10 μL de estos virus. Antes del contacto con el fago, las bacterias se crecieron según lo indicado en el apartado 6.5.1.1.2, después de lo cual se centrifugaron a 2000 g (Centrifuge 5415 D, *Eppendorf*) durante diez minutos, a temperatura ambiente, resuspendiendo el pellet final en una solución estéril de 0,01 M MgSO_4 , preparada en $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, hasta alcanzar una densidad apropiada ($\lambda_{\text{fija}} = 2$, equivalente a $1,6 \times 10^9$ células/mL, aproximadamente). Hasta el momento de la infección, estas bacterias se mantuvieron a 4°C.

El inóculo de los fagos en la población bacteriana y el crecimiento del cultivo se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas en el manual de Sambrook *et al.* (1989) (259).

6.5.1.3. Transformación de bacterias

La estirpe DH5 α de *E. coli* fue la más utilizada para la transferencia de genes, aunque en experimentos determinados se requirieron otras especies. En el caso concreto de DH5 α , se pudo disponer de células competentes transformadas en el propio laboratorio si bien, en ocasiones, se emplearon stocks comerciales.

Antes de proceder a la introducción de material genético en una bacteria, ya sea por medio de un vector de tipo plasmídico o por un bacteriófago, es necesario que ésta se encuentre en un estado fisiológico que la capacite para recibir ese ácido nucleico. Dada la naturaleza de la pared bacteriana, se requiere un tratamiento previo de la célula que permita la degradación parcial y controlada de la misma para facilitar la entrada del DNA. En nuestro caso, este tratamiento se llevó a cabo mediante un choque térmico de un cultivo líquido, el cual se manipuló continuamente en condiciones estériles.

Así, a partir de un stock de bacterias DH5 α , almacenado a -80°C en una solución de cloruro de calcio (CaCl₂) 0,1 M con un 15% de glicerol (v/v), se aislaron colonias en placas con LB-agar siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.5.1.1.1, una de las cuales se inoculó en 5 mL de medio LB líquido y se creció según lo indicado en el apartado 6.5.1.1.2. A su vez, desde 1 mL de ese cultivo de bacterias, se obtuvo otro de un volumen mayor, como ya se indicó en ese mismo apartado. Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada ($D_{O_{600}} = 0,5$) en esta última población, se centrifugó todo el volumen de la misma a 3220 g (Centrifuge 5810 R, *Eppendorf*) durante diez minutos, manteniendo en todo momento una temperatura de unos 4°C. El pellet celular se resuspendió suavemente mediante pipeteo automático en un volumen total de 5 mL de 0,1 M CaCl₂ (*SIGMA*), preparado en H₂O_{dd}, y se incubó en hielo durante veinticinco minutos. Transcurrido este tiempo, se procedió a una segunda centrifugación idéntica a la anterior, resuspendiendo poco a poco el pellet de células en 5 mL de una solución 0,1 M CaCl₂ con un 15% (v/v) de glicerol (*SIGMA*), y se alicuotó en tubos estériles (1,5 mL, *Axygen*). Tras congelación rápida en N₂-líquido, se almacenó a -80°C. De este modo, las bacterias quedaron listas para la introducción del material genético en el proceso conocido como “transformación bacteriana”.

Previamente al uso de estas células para su modificación genética, se realizó un análisis de su capacidad de transformabilidad con el plásmido pUC (Tabla A-4), que presenta resistencia a ampicilina, siguiendo el protocolo descrito en el apartado siguiente. Se utilizaron, para ello, dos cantidades de vector, 10 y 100 pg, respectivamente. En todos los casos en los que fue necesaria la generación de bacterias competentes, se obtuvieron niveles óptimos de transformabilidad, del orden de 1×10^7 cfu (del inglés, *colony-forming units*).

La transformación bacteriana se realizó a partir de 100 μ L de estos microorganismos, almacenados a -80°C, bien procedentes de un stock comercial o

de una producción en el propio laboratorio. Cuando el objetivo del experimento fue la purificación de un plásmido a gran escala (apartado 6.5.2.2.3), fue suficiente con utilizar 50 μL de células.

La selección de las bacterias transformadas con un vector plasmídico se ve facilitada por la resistencia que adquieren a un antibiótico, debido a la expresión de genes concretos presentes en el plásmido. Por ello, el sustrato en el que se cultivaron las células, bien fuera medio sólido o líquido, se suplementó con el fármaco en cuestión, asegurando únicamente el crecimiento de aquéllas que incorporaron el DNA foráneo.

El primer paso para la transformación de estos microorganismos fue incubarlos en contacto directo con 1 μL^1 de plásmido cerrado, purificado por miniprep (ver apartado 6.5.2.1.2), en tubos estériles (14 mL Polypropylene Round- Bottom Tube, *Becton Dickinson*), durante un período de treinta minutos y asegurando una temperatura de unos 0°C. A continuación, se sometieron a un choque térmico a 42°C durante cuarenta y cinco segundos, en un baño termostatzado. Inmediatamente después, se mantuvieron unos dos minutos en hielo y, después de una incubación a 37°C durante una hora tras la adición de 900 μL de medio LB (esta vez sin antibiótico para permitir el crecimiento de un mayor número de bacterias), se centrifugó la totalidad del cultivo durante treinta segundos a 16100 g (Centrifuge 5415 D, *Eppendorf*). Se desecharon unos 800 μL de sobrenadante, mientras que el pellet celular se resuspendió suavemente en el volumen restante y se extendió sobre una placa de LB agar suplementada con el antibiótico de selección, según lo indicado en el apartado 6.5.1.1.1.

6.5.2. DNA

6.5.2.1. Extracción y purificación del DNA

En vista de que el estudio requirió el empleo de moléculas de DNA de diferente naturaleza, se hizo necesario disponer de diversas metodologías de extracción y purificación específicas para cada una de ellas. De este modo, se trabajó con DNA genómico de células animales y con material genético bacteriano, tanto episómico (en forma de plásmido) como del cromosoma de la propia bacteria cuando ésta fue infectada por bacteriófagos.

6.5.2.1.1. DNA genómico de muestras de tejidos o de células animales

La caracterización genética de los ratones segregados a partir del doble homocigoto *TASK-1*^{-/-}; *TASK-3*^{-/-}, se realizó a partir del DNA genómico extraído de los dedos que se les cortaban a las crías para diferenciarlas entre sí. Esta tarea la

¹ En el caso de una transformación con un plásmido proveniente de una ligación, la cantidad del mismo dependió de otros parámetros relacionados con su naturaleza.

realizaba el personal técnico del CPYEA, cuando los animales alcanzaban el décimo día de vida. Hasta el momento de su utilización, las muestras se almacenaron congeladas a -20°C. Para la extracción del DNA genómico, se añadió a cada una de ellas un volumen de 200 µL del tampón Direct PCR (Tail) (*Viagen*) junto con 45 µg de proteinasa K (*Roche*), y se incubaron a 55°C durante dos horas y quince minutos, 800 rpm, utilizando para ello un termoagitador (*Eppendorf*). A continuación, los lisados obtenidos se mantuvieron a 85°C durante cuarenta y cinco minutos, con el fin de inactivar la enzima, después de lo cual se centrifugaron tres minutos a velocidad máxima (16100 g) para eliminar los restos de tejido o pelo del animal, que quedaron acumulados en el fondo del tubo.

En el caso del análisis de clones de células ES generados tras la electroporación del plásmido floxeado, la extracción del DNA genómico de cada uno de ellos se realizó a partir de cultivos confluentes en pocillos de placas de 24. Para ello, se retiró el sobrenadante del pocillo y, tras dos lavados con PBS, se añadió 1 mL de tampón de extracción¹ suplementado con 100 µg de proteinasa K en el mismo momento de su incorporación al cultivo. La incubación con esta solución se realizó durante toda la noche, a una temperatura de 37°C, tras lo cual se llevó a cabo un proceso de purificación convencional con fenol:cloroformo, quedando así disponible el DNA genómico para su análisis mediante *Southern blot* (apartado 6.5.2.5.2).

6.5.2.1.2. DNA plasmídico de bacterias

La purificación de plásmidos desde un cultivo bacteriano se realizó siempre a partir de un sustrato líquido, como ya se indicó en el apartado 6.5.1.1.2.

En el caso de células crecidas en medio LB, la extracción de este DNA se llevó a cabo según el método de purificación por miniprep descrito por Birnboim y Doly en 1979 (329), basado en una lisis alcalina que desnaturaliza todas las proteínas y las moléculas de DNA presentes en la célula (tanto genómico como episomal). Cuando la solución se neutraliza por la adición de acetato potásico, sólo los plásmidos, debido a su pequeño tamaño, renaturalizan correctamente y permanecen en ella, mientras que el DNA y las proteínas bacterianas precipitan. Además, previamente a la incorporación del tampón de lisis, se resuspende el pellet celular (obtenido tras centrifugación del cultivo a velocidad máxima, 16100 g, durante treinta segundos) en una solución que contiene RNA_{asa}, con el fin de evitar posibles contaminaciones de RNA en la purificación. En nuestro análisis experimental, los tres reactivos se obtuvieron a partir del kit *Systems Biology-Plasmid DNA Purification (QUIAGEN)*, siendo suficiente 1 mL de cultivo para la extracción del DNA plasmídico en cada muestra.

Cuando se quiso obtener un rendimiento mayor en la purificación de plásmidos, se requirió un cultivo bacteriano crecido en medio Terrific, en un volumen de 100 mL.

¹ **Tampón de extracción:** 0,1 M Tris-HCl; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 0,2 M NaCl, en H₂O_{dd}.

La extracción del DNA en este caso se realizó según el protocolo de midiprep descrito en el kit anterior.

6.5.2.1.3. *Lisado de bacteriófagos*

Cuando se infectaron bacterias de *E. coli* de la estirpe XLI-Blue-MRA-P2 con fagos (apartado 6.5.1.2), la extracción y purificación del genoma de las mismas se llevó a cabo según las indicaciones del kit *Wizard® Lambda Preps DNA Purification System (Promega)*.

6.5.2.1.4. *Purificación de fragmentos de DNA amplificados por PCR o digeridos enzimáticamente*

En aquellas fases de clonación de fragmentos de DNA en un vector plasmídico que requerían la inactivación de la endonucleasa y ésta era insensible a altas temperaturas, se recurrió al kit *Favorgen (BIOTECH CORP.)* para eliminarla del medio, sin necesidad de someterla a una electroforesis en gel de agarosa. La purificación del DNA se llevó a cabo según lo indicado por el fabricante.

6.5.2.1.5. *Extracción y purificación de fragmentos de DNA a partir de un gel de agarosa*

En la estrategia seguida para las diversas construcciones de vectores de transferencia génica de tipo plasmídico, se utilizó el kit *QIAquick Gel Extraction Kit (QUIAGEN)* para la obtención de los fragmentos de DNA vector e inserto, respectivamente. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y se aisló la banda génica correspondiente. De este modo, se purificó el DNA de interés, que quedó así libre de enzimas y preparado para una ligación posterior.

De forma puntual, la purificación del fragmento génico con el exón 2 del gen de TASK-1 para la generación del ratón *knock-out* condicional, se realizó triturando la banda correspondiente del gel de agarosa con un vástago de plástico. Después de añadir un volumen de fenol, se incubó en N₂-líquido durante diez minutos y, tras centrifugación a 10000 rpm durante quince minutos, temperatura ambiente, la fase superior se transfirió a un tubo de 1,5 mL, donde se trató con una mezcla equitativa de fenol y cloroformo isoamílico. El DNA contenido en la fase superior, resultante de una nueva centrifugación a 10000 rpm durante cinco minutos, se precipitó según el método convencional (apartado 6.5.2.3).

6.5.2.2. *Amplificación de DNA*

En función del objetivo experimental, la amplificación de material genético se llevó a cabo mediante reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que sirvieron para analizar y, en ocasiones, cuantificar, la expresión de genes, así como para sintetizar determinadas secuencias con fines diversos.

En el caso del DNA de tipo plasmídico, se utilizaron principalmente cultivos bacterianos a mayor o menor escala para conseguir altos rendimientos en la purificación del mismo.

6.5.2.2.1. *Reacción en cadena de la polimerasa convencional*

Esta técnica, basada en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, se empleó en este estudio para el análisis de expresión de mioglobina y de las cadenas α y β de la hemoglobina en células PC12 y en tejidos simpatoadrenales, así como de los genes de TASK-1 y TASK-3 en los ratones utilizados para el estudio funcional de estos canales. Por otro lado, con estos dos últimos genes se llevó a cabo el genotipado de las líneas segregadas a partir de los ratones *knock-out* TASK-1^{-/-}; TASK3^{-/-}, según las indicaciones de la Dra. Isabel Aller (Instituto de Neurociencias de Alicante).

Las temperaturas necesarias para la desnaturalización del DNA que actuó como molde, y para el alineamiento y extensión de los cebadores, fueron variables para cada caso (Tabla A-7), aunque en todos ellos se utilizaron los reactivos de la casa comercial *Dominion mbl* (10X PCR Buffer, 25 mM MgCl₂) y una Taq polimerasa termoestable (derivada de la bacteria *Thermus aquaticus*) procedente de la misma casa. Los desoxinucleótidos trifosfato (100 mM dNTP Set PCR Grade, *Invitrogen*) se emplearon desde un stock preparado a una concentración de 10 mM. Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de cada gen se muestran en la Tabla A-6. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en tubos estériles de 0,2 mL (*Axygen*), utilizando termocicladores de la casa comercial *BIOMETRA*.

6.5.2.2.2. *Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real*

Con esta técnica, que permite detectar las tres fases de amplificación de una PCR (exponencial, lineal y de meseta) en el mismo momento en que éstas ocurren gracias al empleo de fluorocromos que se intercalan en la doble hélice del DNA y fluorescen cuando son irradiados con luz ultravioleta, se pudo cuantificar la cantidad de mRNA de diversos genes en el estudio funcional de la cadena α de la hemoglobina en células PC12 y la expresión de otras cadenas en este mismo modelo y en las células glómicas del CC. La cantidad de mRNA en todos los casos fue calculada en base al hecho de que el total de DNA amplificado en la reacción es directamente proporcional al DNA utilizado como molde durante la fase exponencial de la reacción. Por ello, lo fundamental en esta metodología es determinar el ciclo en el que empieza a ser detectada la amplificación del producto, denominado "ciclo umbral" (Ct, del inglés *Threshold cycle*). Por otro lado, para la determinación de los niveles de cada mRNA, fue imprescindible normalizar los datos de Ct a los obtenidos con algún gen cuyo umbral de amplificación no variase en diferentes condiciones experimentales. En este sentido, se utilizó el de la ciclofilina en todo el abordaje experimental.

Para este tipo de reacciones se empleó el fluoróforo *Sybr Green I*, que presenta gran afinidad para DNA bicatenario y una alta sensibilidad para la detección de las moléculas formadas. El compuesto se dispuso en forma comercial, mezclado en la proporción adecuada con el resto de reactivos (Power SYBR® Green PCR MasterMix, *Applied-Biosystems*).

En todos los casos, las reacciones se realizaron por duplicado para cada muestra, en un volumen final de 25 µL, con 15 µL de *Power SYBR® Green PCR MasterMix*, una concentración de cada oligonucleótido (Tabla A-8) de 300 nM en un volumen de 5 µL, y 1 µL de DNA molde (cDNA, procedente de un proceso de retrotranscripción –apartado 6.5.3.2-), en placas de 96 pocillos (MicroAmp®, Optical 96/Well Reaction Plate with Barcode, *Applied Biosystems*). Se utilizó un termociclador 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) y se siguió el protocolo de reacción optimizado por la casa comercial, que consistió en una primera fase a 50°C durante dos minutos, seguida de diez minutos a 95°C y cuarenta y cinco ciclos de quince segundos de desnaturalización a la misma temperatura, con un minuto de amplificación a 60°C. Tras este protocolo, se incluyó un paso adicional consistente en una bajada progresiva de la temperatura desde 95°C hasta 60°C, de una duración de treinta minutos, para obtener la “curva de disociación del producto”, según la cual se pudo caracterizar el fragmento amplificado en función de su temperatura de fusión (T_m , del inglés *Melting temperature*).

6.5.2.2.3. Cultivos bacterianos: miniprep y midiprep

La amplificación de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos de bacterias, de manera que, en función de la cantidad y pureza del mismo necesaria para el desarrollo experimental, se recurrió a los cultivos en medio líquido, como se describe en el apartado 6.5.1.1.2.

Como norma general, el cultivo de bacterias en 5 mL de LB se llevó a cabo para la búsqueda de colonias recombinantes durante un proceso de clonación de secuencias en el vector plasmídico, utilizando después el protocolo de miniprep (apartado 6.5.2.1.2) para su extracción de la célula procarionota. En cambio, cuando el objetivo fue amplificar un plásmido específico contenido en un clon bacteriano, éste se inoculó en un volumen de medio de cultivo de 100 mL, utilizando para ello Terrific Broth, al ser un sustrato más enriquecido, lo cual contribuyó a aumentar el rendimiento de la purificación del DNA según el método de midiprep (apartado 6.5.2.1.2).

6.5.2.3. Precipitación de DNA

Cuando se hizo necesario concentrar moléculas de un determinado DNA, se añadió al mismo una décima parte de su volumen de acetato sódico (NaOAc) 3 M (pH 7,0), que neutralizó el pH de la solución, junto con tres volúmenes de etanol (*SIGMA*)

previamente enfriado (-20°C), mezclando todos los componentes por inversión suave de los tubos. Tras incubarlo unos treinta minutos a una temperatura de -20°C, para disminuir la solubilidad del DNA, y centrifugación a 16100 g durante diez minutos, se descartó el sobrenadante, haciéndose visible el precipitado de DNA en el fondo. Con unos 700 µL de isopropanol (*SIGMA*) y las mismas condiciones de centrifugación anteriores, se eliminaron los restos de sales que pudiera contener el pellet y, finalmente, éste se resuspendió en el volumen apropiado de H₂O_{dd} estéril o tampón Tris-HCl 1 M de pH 8,0.

6.5.2.4. Manipulación enzimática del DNA

6.5.2.4.1. Inserción de DNA en vectores de clonación de tipo plasmídico

Tanto la generación del plásmido floxeado para la obtención del ratón *knock-out* condicional como de los plásmidos relacionados con la sobreexpresión de las cadenas de hemoglobina en células PC12, implicaron diversas fases de clonación que fueron variables en cada uno de ellos. La escisión de las secuencias de DNA manipuladas se realizó con enzimas de restricción específicas, siguiendo las indicaciones de incubación (e inactivación, cuando fue necesario) indicadas para cada una de ellas. En ocasiones, la estrategia de clonación requirió el tratamiento del DNA linealizado con las enzimas Klenow (Klenow Fragment DNA Polymerase I, *usb*) o T4 DNA polimerasa (*Promega*) para eliminar los extremos protuberantes 5' o 3', respectivamente, según el protocolo establecido por la casa comercial.

La reacción de ligación de dos secuencias se realizó con la enzima T4 DNA ligasa (*Promega*), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

La Tabla A-4 representa los plásmidos de origen comercial utilizados como vectores de clonación. Los plásmidos generados en este estudio para la transferencia celular de genes aparecen en la Tabla A-5.

6.5.2.4.2. Mutagénesis dirigida

La caracterización de la cadena α de la hemoglobina en células PC12 implicó el estudio de la ausencia de la funcionalidad de la misma. Para ello, se llevó a cabo la mutación puntual de un aminoácido implicado en la unión del grupo hemo a la apoproteína. El desarrollo experimental se realizó con el kit comercial *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagen)*, siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados para esta modificación génica se reflejan en la Tabla A-6.

6.5.2.5. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación con sondas radiactivas

Dentro del presente estudio, la búsqueda de fagos que contuvieran en su genoma el fragmento correspondiente al exón 2 del gen de TASK-1, así como de los clones

de células ES que incorporaron el transgén floxeado por recombinación, precisaron fragmentos de DNA que hibridasen de forma específica con las secuencias de interés. En la Tabla A-9 se detallan las sondas diseñadas para cada objetivo experimental, así como los oligonucleótidos y las condiciones de reacción necesarias para su síntesis por PCR convencional. Tras someter el fragmento amplificado a una electroforesis en gel de agarosa para su purificación (apartado 6.5.2.1.5), se procedió al marcaje de unos 100 ng del mismo con 30 μCi ($=3 \mu\text{L}$) del isótopo radiactivo 5'($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP (3000 mCi/mmol), suministrado por *GE Healthcare*, según el protocolo establecido en el kit *Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare)*.

6.5.2.5.1. Detección de secuencias de DNA genómico de bacterias

Cuando una población de bacterias de la estirpe XLI-Blue-MRA-P2 se infectó con fagos procedentes de una genoteca de ratón para intentar aislar el fragmento de DNA genómico correspondiente al exón 2 del gen *Kcnk3*, se utilizaron dos sondas diferentes, una para cada extremo de la secuencia. Para ello, se siguieron en todo momento las indicaciones del manual de Sambrook *et al.* (1989) (259).

6.5.2.5.2. Detección de secuencias de DNA genómico de células animales (*Southern blot*)

La búsqueda de clones de células ES en las que se hubiese producido la recombinación del plásmido floxeado con el transgén del gen *Kcnk3* se realizó mediante la técnica de *Southern blot*, basada en la transferencia y fijación a una membrana de nylon de las bandas de DNA obtenidas desde una electroforesis en gel de agarosa, previo tratamiento del mismo con determinadas endonucleasas de restricción, y la hibridación específica con sondas de DNA marcadas radiactivamente.

Así, tras la digestión con las enzimas *Clal* y *XbaI* durante unas catorce horas, las cuatrocientas muestras de DNA genómico de los clones de células embrionarias, se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa, al cual se aplicó después un tratamiento con 0,25 N de ácido clorhídrico durante cinco-diez minutos y una desnaturalización¹ de cuarenta minutos, en dos tiempos equitativos. La transferencia se realizó sobre membranas de nylon (Hybond N⁺, *GE Healthcare*) y, para direccionarla, se utilizó una serie de papeles absorbentes. Tras unas doce-catorce horas, se incubó el filtro a temperatura ambiente durante cinco minutos con una solución neutralizante², con el fin de bloquear los sitios en los que el DNA podría unirse inespecíficamente. El proceso de hibridación³ se llevó a cabo a alta temperatura (95°C), para evitar señales inespecíficas, incubando la membrana du-

¹ Solución desnaturalizante: 0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl, en H₂O_{dd}.

² Solución neutralizante: 0,5 M Tris; 3 M NaCl, en H₂O_{dd}; pH 7,0.

³ Solución de hibridación (v/v): 2,5% NaH₂PO₄-1 M (pH 6,5); 30% SSC-20X; 10% Denhart's-50X; 5% SDS-10%; 1% sonda de DNA marcada radiactivamente, en H₂O_{dd}.

rante toda una noche con unos 30 μ L de sonda previamente marcada con 5'(α^{32} P)dCTP y desnaturalizada. El exceso de sonda no hibridada se eliminó al día siguiente. Para ello, se realizaron tres lavados¹ sucesivos en condiciones rigurosas de temperatura y composición iónica. El revelado de las bandas se llevó a cabo por exposición de los filtros sobre una película radiográfica.

6.5.2.6. *Secuenciación de DNA*

La secuenciación de DNA se realizó de manera automática por parte de un servicio de secuenciación comercial de *MWG Biotech* (Alemania).

6.5.3. RNA

La extracción de RNA desde muestras de tejido o desde una población de células, se llevó a cabo con el objetivo de cuantificar los niveles de mRNA de determinados genes o simplemente analizar la expresión de los mismos, siempre partiendo de las muestras de cDNA obtenidas tras un proceso previo de retrotranscripción.

6.5.3.1. *Extracción de RNA*

6.5.3.1.1. *RNA total*

A excepción de las muestras de tejido de CC y de las preparaciones de células aisladas por citometría de flujo, la extracción del RNA en el resto de los casos (tejidos animales y líneas celulares) se realizó siguiendo el método del reactivo trizol (Trizol[®] Reagent, *Invitrogen*) descrito por el fabricante. Tras la extirpación de los tejidos de interés del cuerpo del animal, éstos se congelaron rápidamente en N₂-líquido, para mantener su integridad y facilitar su rotura después de la descongelación. Tal como se indica en el protocolo señalado, en estos casos se precisó una trituración previa de la muestra en el reactivo, utilizando para ello un homogenizador eléctrico (PT 4000, *POLYTRON*).

La extracción del RNA total de células inmortalizadas se realizó a partir de cultivos cercanos a la confluencia, dispuestos en placas de 3 cm de diámetro. Una vez purificado, se procedió a la cuantificación de este RNA mediante espectrofotometría (DU[®]730 Life Science, *Beckman Coulter*).

6.5.3.1.2. *RNA mensajero*

Cuando la cantidad de células de una determinada muestra no era muy grande, caso del CC y, más aún, de poblaciones celulares aisladas por citometría de flujo

¹ **Lavado 1:** 0,5% SDS, en SSC-2X (cinco minutos, temperatura ambiente).

Lavado 2: 0,1% SDS, en SSC-2X (cinco minutos, 42°C).

Lavado 3: 0,1% SDS, en SSC-0,1X (treinta minutos, 42°C).

Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Invitrogen), que permitió el aislamiento de RNA poli (A)⁺ gracias a pequeñas esferas magnéticas que llevaban adheridas a su superficie moléculas de oligo (dT)₂₅. En todos los casos, se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante, teniendo en cuenta que, para el caso del CC, se precisó una cantidad de unas seis-ocho unidades, mientras que para los otros dos órganos simpatoadrenales mencionados fue suficiente con cuatro muestras. Una vez obtenido el mRNA, se realizó rápidamente la transcripción reversa hasta cDNA del total obtenido, tal como recomendaba el protocolo comercial, sin cuantificar en ningún caso el rendimiento obtenido debido a la escasez de la muestra.

6.5.3.2. *Transcripción reversa de RNA*

A partir de 1-5 µg de RNA total purificado, o bien desde el mRNA de una determinada muestra, ambos en un volumen final de 8 µL en H₂O-depc, se efectuó la retrotranscripción del mismo, utilizando el kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)* y siguiendo las indicaciones establecidas por el fabricante.

6.6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.6.1. Extracción y procesado de la muestra proteica

El estudio de expresión y cuantificación proteica únicamente se llevó a cabo en células PC12, dentro de la caracterización funcional de la cadena α de la hemoglobina. El hecho de no realizar este tipo de análisis en muestras de células glómicas se debió únicamente a la imposibilidad de conseguir una población suficiente, dado que se requieren cantidades proteicas muy elevadas.

6.6.1.1. *Extracción de proteínas*

Con el fin de disponer de un total considerable de muestra, se precisó de un cultivo de células PC12 crecido sobre dos placas de 15 cm de diámetro. Al acercarse a la confluencia, esta población se recogió mediante pipeteo automático, previo lavado doble con PBS, para retirar proteínas del suero presente en el medio de cultivo, que podrían enmascarar resultados posteriores. Tras centrifugación a 167 g durante cinco minutos, a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se congeló rápidamente en N₂-líquido. Hasta el momento de su procesado para estudios de expresión de proteínas, se almacenaron a -80°C.

6.6.1.2. *Fraccionamiento de proteínas*

A partir del pellet celular obtenido en el apartado anterior, se procedió a separar las proteínas de las fracciones soluble, nuclear y mitocondrial, limitando así el

análisis de expresión proteica en los clones estables de células PC12. Durante todo el proceso de fraccionamiento, las muestras se mantuvieron en frío, para evitar su degradación.

La rotura de la membrana plasmática de las células y la consiguiente extracción del global de proteínas, se realizó mediante la homogenización (tipo *Dounce*) de la muestra en 150 µL de un tampón hipotónico¹. La vuelta a la isotonicidad se consiguió por la adición de 150 µL de una solución hipertónica², que se mezcló con la muestra de forma idéntica a la anterior. De este modo, se obtuvo un volumen final de 300 µL, a partir del cual se comenzó la separación celular por gradiente de centrifugación.

La fracción nuclear se aisló después de dos centrifugaciones a 600 g durante cinco minutos, a 4°C de temperatura. Así, el pellet obtenido en la primera de ellas se resuspendió en una mezcla equitativa de los dos tampones anteriores y, tras la segunda, se almacenó congelado a -20°C, constituyendo la fracción "P600".

A partir del primer sobrenadante anterior, se realizaron otras centrifugaciones idénticas de manera sucesiva hasta dejar de visualizar un pellet. En ese momento, la velocidad alcanzada se amplió hasta 15000 g, durante quince minutos, consiguiendo así una porción enriquecida en mitocondrias en el fondo del tubo que, al igual que en el caso anterior, se lavó con una mezcla 1:1 de los dos tampones, resuspendiendo después el pellet en 75 µL de solución de lisis³ (LB1) para almacenarlo a -20°C. Es lo que se denominó fracción "P15".

El sobrenadante obtenido tras la primera centrifugación a 15000 g se purificó hasta eliminar cualquier resto de precipitado, después de lo cual se sometió a una última centrifugación a 10000 g (Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge, *Beckman Coulter*) durante una hora. La fracción soluble (S100), conteniendo el proteosoma y los ribosomas celulares, se aisló en el sobrenadante, que se guardó a -20°C, mientras que la porción enriquecida en restos de membranas (P100) se depositó en el fondo. Este pellet se resuspendió en 100 µL de tampón de lisis y se almacenó congelado junto con el resto de las muestras.

6.6.1.3. Purificación y cuantificación de proteínas

Los estudios proteómicos en los clones estables de células PC12 se llevaron a cabo únicamente en las porciones soluble y mitocondrial obtenidas a partir del fraccionamiento anterior. Para ello, se realizó en primer lugar un lavado del total

¹ **Tampón hipotónico:** 85 mM Sacarosa; 10 mM MOPS; inhibidor de proteasas 1:10000; inhibidor de fosfatasa 1:10000; 1 mM Na₃VO₄, en H₂O_d; pH 7,2.

² **Tampón hipertónico:** 250 mM Sacarosa; 30 mM MOPS; inhibidor de proteasas 1:10000; inhibidor de fosfatasa 1:10000; 1 mM Na₃VO₄, en H₂O_d; pH 7,2.

³ **Tampón de lisis (LB1):** 30 mM Tris-HCl (pH 8,5); 2 M Tiourea; 4% CHAPS (p/v), en H₂O_d.

de la muestra mediante el kit *2-D Clean-Up Kit*, *GE Healthcare*, siguiendo el protocolo indicado, eliminando así restos lipídicos y sales presentes en la solución. Las proteínas quedaron resuspendidas en LB1. Posteriormente, se cuantificaron mediante el método de Lowry, a partir de 5 μ L de las mismas y por duplicado, según las indicaciones del kit *BIO-RAD DC Protein Assay (BIO-RAD)*.

6.6.2. Análisis y cuantificación de la expresión por métodos moleculares y bioquímicos

6.6.2.1. Western blot

Para la detección y cuantificación de la enzima TH en células PC12, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, comúnmente conocida como SDS-PAGE (del inglés, *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*), según se detalla en el manual de Sambrook *et al.* (1989) (259). Se utilizó para ello el sistema *Mini-PROTEAN® II Cell (BIO-RAD)*. La concentración de poliacrilamida (40% Acrylamide/Bis Solution, 29:1, 3.3% C, *BIO-RAD*) de la parte separadora del gel fue del 15%, y el voltaje aplicado fue de 150-200 voltios, durante unos cuarenta minutos, en un tampón de electroforesis compuesto por 25 mM Tris base, 192 mM glicina y 20% de metanol (v/v), en H₂O_d.

En todos los casos, se partió de 5 μ g de extracto total de proteína (apartado 6.6.1.1), previamente desnaturizada mediante una incubación de cinco minutos en 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% de glicerol, 2% de SDS, 100 mM DTT y 0,004% de azul de bromofenol, en H₂O_d, a una temperatura de 95°C.

Una vez realizada la separación electroforética de las proteínas, éstas se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF Transfer membrane Hybond™-P, *GE Healthcare*) que se habían activado momentos antes con metanol (*MERCK*). Se utilizó un sistema de transferencia semi-seca (*SIGMA*) durante unas dos horas, en una solución de 149 mM Tris; 1,2 mM glicina y 20% de metanol (v/v), en H₂O_d. El amperaje escogido dependió de la superficie de la membrana, en función del cálculo "cm² x 1,2". Posteriormente, se procedió al bloqueo de la membrana, que se realizó en PBS suplementado con Tween-20 al 0,05% (*SIGMA*) (PBTween-20) y leche desnatada en polvo al 5% (*Central lechera asturiana*) (p/v). Transcurridas dos horas, las membranas se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 4°C en solución bloqueante junto con el anticuerpo primario (Tabla A-10), en bolsas de plástico (transparentes y de poco grosor) selladas por calor. A continuación, se lavaron cuatro veces en PBTween-20 durante un total de veinte minutos (cinco minutos/lavado), después de lo cual se incubaron una hora con el anticuerpo secundario (Tabla A-10) en las mismas condiciones que el anterior, pero esta vez a temperatura ambiente. Realizados los cuatro lavados correspondientes con PBTween-20, se procedió al revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit *ECL PLUS Western blot Detection System (GE Healthcare)* y el lector Typhoon 9400 Variable Mode Imagen (*GE Healthcare*).

fluorescencia emitida se cuantificó mediante el programa informático *ImageQuant*, y se correlacionó directamente con la cantidad de proteína marcada.

6.6.2.2. *Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)*

La obtención de una visión global del proteoma en los estudios de sobreexpresión de la cadena α en células PC12 se realizó mediante la técnica 2D-DIGE (del inglés, *2Dimensional-Differential In Gels Electrophoresis*), que permite el análisis de hasta tres muestras biológicas diferentes en paralelo, donde cada una de ellas es marcada con un fluoróforo distinto (rojo, amarillo y azul). De este modo, se pudieron identificar las proteínas que se expresaban diferencialmente en las tres condiciones experimentales y, al mismo tiempo, cuantificar esos cambios en los niveles de expresión. El estudio se realizó tanto en la fracción soluble como en la porción enriquecida en mitocondrias, aisladas según lo dispuesto en el apartado 6.6.1.2. En el primer caso, se empleó un total de 50 μ g de muestra, mientras que en el segundo fue suficiente con 20 μ g.

El protocolo para el marcaje con fluoróforos (CyDye DIGE fluor, *GE Healthcare*) y la separación bidimensional por electroforesis se realizó siguiendo las indicaciones del manual *Ettan DIGE System, núm. 18-1173-17 Edition AA (GE Healthcare)*, utilizando tiras de pH con un rango de 3-11, no lineal (Immobiline™ Drystrip, pH 3-11 NL, 18 cm, *GE Healthcare*), para conseguir una representación de todo el proteoma de las células. Las tiras se hidrataron previamente (DeStreak Rehydration Solution, *GE Healthcare*), tal como recomendaba el fabricante.

El material utilizado tanto para el isoelectroenfoque (1ª dimensión) como para la electroforesis SDS-Page (2ª dimensión) fue de la casa comercial *GE Healthcare*. La separación de proteínas según su punto isoelectrónico requirió una primera etapa de tres horas a un voltaje constante de 300 V, seguida de un gradiente hasta 3000 V de seis horas y hasta 8000 V en las tres horas siguientes. El voltaje de 8000 V se mantuvo hasta que se alcanzó la fase de estabilización.

Para el revelado de las imágenes se dispuso de un lector *Typhoon 9400 Variable Mode Imagen (GE Healthcare)*, en el que se ajustó el láser específico para cada fluoróforo. La utilización del software *DeCyder Differential Analysis* (tal como indica el manual mencionado anteriormente) permitió procesar las imágenes obtenidas de los geles y la consiguiente comparativa entre las tres condiciones experimentales mediante el cálculo del volumen correspondiente a cada punto proteico. Aquellas proteínas que presentaron una diferencia de expresión significativa se seleccionaron para su posterior identificación.

Una vez determinadas las proteínas de interés en el mapa del proteoma celular representado en el gel, se realizó nuevamente una electroforesis bidimensional, esta vez a partir de 300 μ g de la misma muestra utilizada como patrón interno en el caso anterior, y que se había almacenado conscientemente para este paso. Dado

que el objetivo de esta fase experimental fue obtener un único gel con una representación del proteoma de los tres subtipos de células PC12 comparadas, no se realizó un marcaje con fluoróforos, si bien el resto del protocolo fue idéntico a la 2D-DIGE del apartado previo. En este caso, una vez obtenida la separación electroforética de las proteínas según su peso molecular, el gel bidimensional resultante se incubó en una solución de fijación¹ durante unos treinta minutos. A continuación, se sustituyó por una solución de Sypro Ruby (SYPRO[®] Ruby Protein gel Stain 1X, *BIO-RAD*), para conseguir una tinción fluorescente susceptible de ser escaneada en el lector de imagen. El contacto con esta solución se mantuvo durante toda la noche, en agitación moderada y protegido de la luz. Al día siguiente, se eliminó la solución del marcaje por decantación y se fijó nuevamente durante treinta minutos, tras lo cual se realizaron dos lavados con H₂O_d de quince minutos de duración. Seguidamente, con cuidado de mantener el gel hidratado en todo momento y de mantenerlo alejado de posibles contaminaciones de queratina humana, se envió a la Unidad de proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) (Universidad de Córdoba), que se encargó de picar en el gel las proteínas seleccionadas y de su identificación mediante la tecnología MALDI-TOF/TOF.

6.7. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS

La caracterización fenotípica de los clones de sobreexpresión de la cadena α de la hemoglobina en células PC12 se completó con un análisis del contenido intracelular de catecolaminas. Para ello, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*).

Así, a partir de un cultivo cercano a la confluencia, crecido sobre una placa de 10 cm de diámetro, las células se transfirieron a un tubo estéril de 15 mL en un volumen de unos 5 mL de PBS, previo lavado sobre la placa en este mismo tampón. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 167 g durante cinco minutos, y el pellet se resuspendió en unos 150 μ L de solución de estabilización², teniendo en cuenta que, desde este momento, la muestra debía permanecer en frío para evitar la degradación de las monoaminas. A continuación, se centrifugó nuevamente, esta vez a velocidad máxima (16100 g) durante diez minutos, resultando un sobrenadante que se transfirió a una columna (Ultrafree MC, *Amicon Bioseparations, Millipore*) para someterlo a una centrifugación de treinta minutos, también a máxima velocidad. El pellet obtenido anteriormente se resuspendió en 100 μ L de NaOH 0,01N para cuantificar el total de proteínas de la muestra por el método de Bradford y normalizar así los datos resultantes tras la se

¹ Solución de fijación: 7% Ácido acético (v/v); 10% EtOH (v/v), en H₂O_d.

² Solución de estabilización: 0,1 M Ácido perclórico-11,71 M; 0,02% EDTA-100 mM (v/v); 1% Etanol, en H₂O_d.

paración cromatográfica. El volumen que se inyectó en la columna (ALB-215; 150 x 2,1 mm, 3 μ m C18) de HPLC (Alexys, Antec Leyden), a partir del eluido tras la última centrifugación, fue de 10 μ L.

Para la detección, se dispuso de un detector electroquímico con un electrodo de trabajo de 3 mm *glassy carbon* y un electrodo de referencia *in situ* ISAAC. Los análisis se realizaron a 35°C y un flujo de 200 μ L/min. El potencial del detector se mantuvo a +590 mV y la fase móvil¹ utilizada consistió en una solución de pH 4,15. La concentración de catecolaminas en las muestras se calculó mediante comparación con las curvas de calibración obtenidas de la inyección de soluciones de los patrones puros (SIGMA).

6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos se analizaron mediante test *t de Student* cuando se trató de comparar dos grupos independientes. Cuando se trabajó con más de dos poblaciones de estudio, se recurrió al análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de *Tukey* o del test *Student-Newman-Keuls*. Se utilizó para ello el programa *SigmaStat 2.0*. Los valores se expresaron como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM, del inglés *Standard error of the mean*).

Cuando el nivel de significación (*p*) obtenido en cada test fue menor de 0,05, las diferencias se consideraron significativas, y altamente significativas si lo fue de 0,01.

6.9. PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS

En la Tabla A-11 se especifican los programas utilizados tanto para la consecución de determinadas técnicas experimentales como para el análisis de los resultados obtenidos.

¹ **Fase móvil:** 50 mM Ácido ortofosfórico; 50 mM Ácido cítrico; 8 mM Cloruro potásico; 0,1 mM EDTA; 0,04 mg/mL Ácido 1-octano-sulfónico; 3% Metanol, en H₂O_d; pH 4,15.

ANEXO
(METODOLOGÍA)

Tabla A-1: Soluciones enzimáticas para la dispersión de órganos y tejidos.

Solución enzimática	Composición	Casa comercial
Solución de dispersión (Cuerpo carotídeo)	<ul style="list-style-type: none"> PBS; pH 7,4 1% CaCl₂ 5 mM (preparado en H₂O) 1% Colagenasa tipo II (aislada de <i>Clostridium histolyticum</i>) (Stock: 50 mg Colagenasa/mL PBS) 1% Tripsina tipo I (aislada de páncreas bovino) (Stock: 25 mg Tripsina/mL PBS) 	GIBCO SIGMA SIGMA-ALDRICH SIGMA-ALDRICH
Solución de dispersión I (Médula adrenal)	<ul style="list-style-type: none"> Solución de extracción (154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 11 mM Glucosa; 10 mM Hepes) 425 U/mL Colagenasa tipo IA (aislada de <i>Clostridium histolyticum</i>) 4-5 mg Albúmina bovina 	SIGMA-ALDRICH SIGMA
Solución de dispersión II (Médula adrenal)	<ul style="list-style-type: none"> PBS; pH 7,4 425 U/mL Colagenasa tipo IA (aislada de <i>Clostridium histolyticum</i>) 7650 U/mL Tripsina tipo I (aislada de páncreas bovino) 	GIBCO SIGMA SIGMA-ALDRICH

Tabla A-2: Medios de cultivo primario.

Medio de cultivo	Composición	Casa comercial
Cuerpo carotídeo	<ul style="list-style-type: none"> DMEM F-12 (1:1) (Ham) (-) L-Glutamina 10% FBS Origen: Sudamérica 1% Penicilina/Estreptomina (Stock: 10000 U/mL; 10000 U/mL) 1% L-Glutamina 200 mM 	GIBCO BioWhittaker BioWhittaker BioWhittaker
Cresta neural	<ul style="list-style-type: none"> DMEM F-12 (1:1) (Ham) (-) L-Glutamina 20% FBS Origen: sudamérica 1% Penicilina/Estreptomina (Stock: 10000 U/mL; 10000 U/mL) 1% L-Glutamina 200 mM 1% N2 Suplemento (100X), líquido 2% B-27 Suplemento 50X 0,16% FGF básico recombinante humano (del inglés, <i>fibroblast growth factor</i>) 0,08% IGF-I recombinante humano (del inglés, <i>insuline growth factor</i>) 0,2% EGF recombinante humano (del inglés, <i>endothelial growth factor</i>) 	GIBCO BioWhittaker BioWhittaker BioWhittaker GIBCO GIBCO R&D Systems R&D Systems R&D Systems
Médula adrenal	<ul style="list-style-type: none"> DMEM (+4,5 g/L Glucosa, +L-Glutamina, +0,1 g/L Piruvato sódico) 10% FBS Origen no estadounidense 1% Penicilina/Estreptomina (Stock: 10000 U/mL; 10000 U/mL) 1% L-Glutamina 200 mM 	GIBCO SIGMA BioWhittaker BioWhittaker

Nota: en todos los casos, las proteínas del complemento del suero fueron previamente inactivadas mediante incubación a 56°C durante treinta minutos.

Tabla A-3: Medios de cultivo de líneas celulares.

Medio de cultivo	Composición	Casa comercial
PC12	<ul style="list-style-type: none"> DMEM (+4,5 g/L Glucosa, +L-Glutamina, +0,1 g/L Piruvato sódico) 10% Suero de caballo (Origen: Nueva Zelanda) 5% FBS Origen no estadounidense 1% Penicilina/Estreptomicina (Stock: 10000 U/mL; 10000 U/mL) 1% L-Glutamina 200 mM 	GIBCO GIBCO SIGMA BioWhittaker BioWhittaker
BRL	<ul style="list-style-type: none"> DMEM F-12 (1:1) (Ham) (-) L-Glutamina 10% FBS Definido Recogido y procesado en EEUU 1% Penicilina/Estreptomicina (Stock: 10000 U/mL; 10000 U/mL) 1% MEM NEAA 100X (del inglés, non-essential aminoacids) 	GIBCO HyClone BioWhittaker GIBCO
ES	<ul style="list-style-type: none"> DMEM (+4,5 g/L Glucosa, +L-Glutamina, +0,1 g/L Piruvato sódico) 100% Medio condicionado (de células BRL) 10% FBS Definido Recogido y procesado en EEUU 0,5% MEM NEA 100X 0,5% Penicilina/Estreptomicina (Stock: 10000 U/mL; 10000 U/mL) 0,1% 2-mercapto-ethanol(12,3 mM) 0,1% Esgro-LIF (10⁶ u/mL) 	GIBCO HyClone GIBCO BioWhittaker SIGMA Chemicon Int.

Nota: en todos los casos, las proteínas del complemento del suero fueron previamente inactivadas mediante incubación a 56°C durante treinta minutos.

Tabla A-4: Plásmidos de origen comercial.

Plásmido	Características relevantes	Aplicación	Origen
pUC	Ap ^r , ori, lacZ.	Análisis de transformabilidad de bacterias <i>E. coli</i> .	Stratagene
pur-CRE	Contiene el gen de la recombinasa CRE de mamíferos.	Selección de clones de células ES recombinantes.	Cedido por el Dr. García de Frutos
pGEM-T	Plásmido linealizado con extremos "T" protuberantes.	Clonación de productos de PCR.	Promega
pBluescriptII	Ap ^r , oriF1, colE1, ori, lacZ.	Clonación de secuencias para la generación del plásmido floxeado de <i>Kcnk3</i> .	Stratagene
pIRES2-EGFP	Contiene una secuencia IRES que permite la expresión de dos genes desde un único mRNA bicistrónico, bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV), en pUC.	Producción de dos proteínas desde mRNA único.	Cedido por el Dr. García de Frutos
pGEM7-Neo-loxP	Contiene dos secuencias loxP y el gen de resistencia a neomicina en eucariotas, ba-	Construcción de plásmido floxeado de <i>Kcnk3</i> .	Cedido por Dr. M. Miedema

	jo el control del promotor del fago T7.		
pExpress-Hba1	Contiene el gen <i>Hba-a1</i> bajo el control del promotor del fago T7, en pUC.	Sobreexpresión del gen de la α globina en células PC12.	ImaGenes
pExpress-ERAF	Contiene el gen <i>Eraf</i> bajo el control del promotor del fago T7, en pUC.	Sobreexpresión <i>in vitro</i> del gen de la AHSP en células PC12.	ImaGenes

Tabla A-5: Plásmidos construídos.

Plásmido	Vector	Inserto	Aplicación
pTerel	pBluescriptII	Exón 2(<i>Kcnk3</i>)	Generación de alelo floxeado del gen de TASK-1.
pTerel-loxP	pBluescriptII	loxP-Exón 2(<i>Kcnk3</i>)	Generación de alelo floxeado del gen de TASK-1.
pTerel-loxP-Neo-loxP	pBluescriptII	loxP-Exón 2(<i>Kcnk3</i>)-neo-loxP	Generación de alelo floxeado del gen de TASK-1.
pIRES2-AHSP-Hba1	pIRES2	AHSP- α globina	Sobreexpresión de los genes <i>Hba-a1</i> y <i>Eraf</i> en células PC12.

Tabla A-6: Oligonucleótidos para PCR convencional.

Producto (utilidad)	Secuencia sentido (5'→3')	Secuencia antisentido (5'→3')
Alfa-1 globina	GGAAGATTGGTGCCATGGT	GAGGCGGCTTAACGGTACTT
Beta globina <i>major form</i>	GCCTCTGTATCATGGGTAA	TAGTGGTACTTGTGAGCCAG
Mioglobina	TCCTTGACTTGGCAGCAAT	GAAAAGTTCGACAAGTTCAA
Gliceraldehído 3P-DH	CAAATGGTGAAGGTGGTGTG	TTTGATGTTAGTGGGGTCTCGC
Task1 (genotipado silvestre)	CAGAAATGTGCGCACGTTGGCTCTC	TTACCGATGGTGGTGATGACGGTGAT
Task1 (genotipado <i>knock-out</i>)	TTCTATCGCCTTCTTGACGAGT	TTACCGATGGTGGTGATGACGGTGAT
Task3 (genotipado silvestre y <i>knock-out</i>)	CTCTGTCCCGCTACCGATCCTGC	TTCCGTGGGCGCAGCGGGTCCGC
Task1	CACCGTCATCACCACAATCG	TGCTCTGCATCACGCTTCTC
Task3	ACGAGGCCCATGCAAGAAAAGAAG	ATGAGATGCGCGAGGAGGAGAAAC
Task1 loxP13 (genotipado de alelo silvestre y alelo escindido de ratón <i>knock-out</i> condicional)	GGTCTTCTTAGGGATTTGG	GCACAAATGTGGAGGATGGA
Task1 loxP23 (genotipado de alelo floxeado de ratón <i>knock-out</i>)	GGCTCACCTACAGATGTCCA	GCACAAATGTGGAGGATGGA
Mutagénesis α-globina	CCACTCTGAGCGACCTGCGT	AGTTTGTGGGCACGCAGGTC

Tabla A-7: Condiciones de reacción para la amplificación de DNA por PCR convencional.

Inicio	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Nº ciclos	Extensión Taq	Fragmento amplificado
95°C 1 min	95°C 30 segundos	54°C 30 segundos	72°C 1 minuto	35	72°C 10 minutos	α globina (389 bp)
95°C 1 min	95°C 30 segundos	54°C 30 segundos	72°C 1 minuto	35	72°C 10 minutos	Beta globina <i>major form</i> (289 bp)
95°C 1 min	95°C 30 segundos	54°C 30 segundos	72°C 1 minuto	35	72°C 10 minutos	Mioglobina (323 bp)
94°C 3 min	94°C 30 segundos	59°C 30 segundos	72°C 1 minuto	39	72°C 10 minutos	TASK-1 (515 bp)
94°C 3 min	94°C 30 segundos	64°C 30 segundos	72°C 1 minuto	39	72°C 10 minutos	TASK-3 (413 bp)
95°C 1 min	95°C 30 segundos	60°C 30 segundos	72°C 1 minuto	37	72°C 10 minutos	GAPDH (255 bp)
95°C 3 min	95°C 30 segundos	60°C 30 segundos	72°C 30 segundo	35	72°C 10 minutos	TASK-1 (genotipado silvestre y <i>knock-out</i>) (270 y 400 bp)
95°C 3 min	95°C 30 segundos	70°C 45 segundos	72°C 30 segundo	35	72°C 10 minutos	TASK-3 (genotipado silvestre y <i>knock-out</i>) (350 y 400 bp)
94°C 3 min	94°C 30 segundos	55°C 30 segundos	72°C 1 minuto	34	72°C 10 minutos	Alelo silvestre TASK-1 (317 bp)
94°C 3 min	94°C 30 segundos	55°C 30 segundos	72°C 1 minuto	34	72°C 10 minutos	Alelo floreado TASK-1 (436 bp)
94°C 3 min	94°C 30 segundos	55°C 30 segundos	72°C 1 minuto	34	72°C 10 minutos	Alelo escindido TASK-1 (317 bp)

Tabla A-8: Oligonucleótidos para PCR en tiempo real.

Producto	Secuencia sentido (5'→3')	Secuencia antisentido (5'→3')
Ciclofilina	GCACTGGTGGCAAGTCCAT	GCCAGGACCTGTATGCTTCAG
TH	TCGGAAGCTGATTGCAGAGA	TTCCGCTGTGTATTCCACATG
VEGF	CGCAAGAAATCCCGGTTTAA	CAAATGCTTTCTCCGCTCTGA
Task1	GCCGGCTCCTTCTACTTCG	CGCATGACCATAGCCGATG
Task3	TTCTACTTCGCCATCACTGTCATC	AGGCCTTGCCAGCATCAG
Task5	GCCTACTACTACTGTTTCATCACTCTCA	ACGAAGTCGCCGAAGCCT
Subunidad α-Maxi K ⁺	CATGGCTTTCAACGTGTTCTTC	GCCAGAACCACAGCTTATCATTG
Alfa-1 globina	GTGTGGATCCTGTCAACTTCAAGT	AGGTCACCAGCAGGCAGTG
Beta globina <i>major form</i>	GATCCTGAGAACTTCAGGCTCCT	GGTGGCCCAACACAATCAC
Beta globina	GATCCTGAGAACTTCAGGCTCCT	GCCATCATAATCACAATCATATTG
Epsilon 1 globina	GCTACATGTTGATCCTGAGAACTTCA	ATCACCAGCACATTACCCAAGA
Epsilon 2 globina	GATCCCGAGAACTTTAAGCTCCT	AAGAAGAAAGAACAATCACCAGCA
Gamma globina	TGGATCCTCAGAACTTCAAGCTC	GTAGAAAGGACAATCACCACATGTT
Hbq1-predicted	TGGACCCTGTAACCTTCAGTTC	GGGCAAGAGTCACCAGCAGA

Zeta globina	TGGACCCGGTCAACTCAAG	GCCAGTGTGACCAGCAGACA
AHSP	GCTGGATCAGCAGGTCTTTGAT	TTCATGTCTTCTTCAGGCATG
Catalasa	GTGCGGACATTCTATACGAAGGT	AGGTGGTTGGCAATGTTCTCA
Superóxido dismutasa1	GGACCTCATTTTAATCCTCACTCTAAG	GTCCTTCCAGCAGCCACAT
Glutación peroxidasa	GCAAGGTGCTGCTCATCGA	GCAGATCATTCAATTCGGTGTAGT
Alas2	CTCAGCGCTCTTCTCCTCTG	CACCACTGTTGCGAATGC

Tabla A-9: Anticuerpos.

Anticuerpo primario	Antígeno	Origen	Técnica de aplicación	Dilución óptima	Casa comercial
Mouse monoclonal to TH	TH	Monoclonal (ratón)	Inmunohistoquímica fluorescente.	1:1000	SIGMA
Rabbit polyclonal anti TH	TH	Policlonal (conejo)	Inmunohistoquímica fluorescente y con DAB. <i>Western blot.</i>	1:5000	Novus
Rabbit polyclonal to GFP	EGFP	Policlonal (conejo)	Inmunohistoquímica fluorescente.	1:1000	Abcam
Mouse anti-Nestin monoclonal	Nestina	Monoclonal (ratón)	Inmunohistoquímica fluorescente.	1:100	Chemicon
CAM Folio anti-human CD57	CD57	Monoclonal (ratón)	Separación de células por citometría.	1:600	PharMinger
Anti-Ribosomal Protein L26 (N-terminal)	RPL26	Policlonal (conejo)	<i>Western blot.</i>	1:1000	SIGMA
Anticuerpo secundario		Origen	Técnica de aplicación	Dilución óptima	Casa comercial
Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG		Policlonal (mono)	Inmunohistoquímica fluorescente.	1:400	Molecular Probes
Rhodamine Red-X-conjugated donkey anti-rabbit IgG (H-L)		Policlonal (mono)	Inmunohistoquímica fluorescente.	1:10000	Jackson ImmunoResearch
Fluorescein FITC-conjugated		Policlonal (cabra)	Separación de células por citometría.	1:200	Jackson ImmunoResearch
Goat anti-rabbit-P IgG		Policlonal (cabra)	<i>Western blot.</i>	1:10000	Molecular Probes

Tabla A-10: Programas bioinformáticos.

Programa	Casa comercial	Objetivo	Técnica de aplicación
Primer Express™ (v2.0)	Applied Biosystems	Diseño de oligonucleótidos.	PCR en tiempo real
AbiPrism™7500	Applied Biosystems	Cuantificación de mRNA.	PCR en tiempo real
DeCyder Differential Analysis Software (v5.0)	GE Healthcare	Análisis de expresión diferencial de proteínas.	2D-DIGE
Multiskan Spectrum (v1.10)	ThermoLabsystems	Medida de la proliferación celular en cultivo.	<i>Cell Proliferation Kit</i>

Cast Grid	Olympus	Estimación volumétrica de órganos.	Morfometría
ImageQuant	GE Healthcare	Cuantificación de proteínas	<i>Western blot</i>

Apartado 7:

BIBLIOGRAFÍA



1. Green J, Crack JC, *et al.* (2009). Bacterial sensors of oxygen. *Current opinion in microbiology* 12:145-51.
2. Acker H (1989). PO₂ chemoreception in arterial chemoreceptors. *Annual review of physiology* 51:835-44.
3. Ito S, Ohtal T, Nakazato Y (1999). Characteristics of 5-HT-containing chemoreceptor cells of the chicken aortic body. *The Journal of physiology* 515:49-59.
4. López-Barneo J, Pardal R, Ortega-Sáenz P (2001). Cellular mechanisms of oxygen sensing. *Annual review of physiology* 63:259-87.
5. Weir EK, López-Barneo J, *et al.* (2005). Acute oxygen-sensing mechanisms. *The New England journal of medicine* 353:2042-55.
6. Bugelski PJ, Nesspor T, *et al.* (2008). Pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in murine bone marrow. *Pharmaceutical research* 25:369-78.
7. Semenza GL (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology* 88:1474-80.
8. Fu XW, Nurse CA, *et al.* (1999). Selective modulation of membrane currents by hypoxia in intact airway chemoreceptors from neonatal rabbit. *The Journal of physiology* 514:139-50.
9. Youngson C, Nurse C, *et al.* (1993). Oxygen sensing in airway chemoreceptors. *Nature* 365:153-5.
10. Hampl V, Bibova J, *et al.* (2002). Hypoxic fetoplacental vasoconstriction in humans is mediated by potassium channel inhibition. *The American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 283:H2440-9.
11. Kenneth Weir E, López-Barneo J, *et al.* (2005). Acute oxygen-sensing mechanisms. *The New England journal of medicine* 353:42-55.
12. García-Fernández M, Mejías R, López-Barneo J (2007). Developmental changes of chromaffin cells secretory responses to hypoxia studied in thin adrenal slices. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 454:93-100.
13. López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, *et al.* (2008). Carotid body oxygen sensing. *The European respiratory journal* 32:1386-98.
14. Mochizuki-Oda N, Takeuchi Y, *et al.* (1997). Hypoxia-induced catecholamine release and intracellular Ca²⁺ increase *via* suppression of K⁺ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells. *Journal of neurochemistry* 69:377-87.
15. Mojet MH, Mills E, Duchon MR (1997). Hypoxia-induced catecholamine secretion in isolated newborn rat adrenal chromaffin cells is mimicked by inhibition of mitochondrial respiration. *The Journal of physiology* 504:175-89.
16. Rychkov GY, Adams MB, *et al.* (1998). Oxygen sensing mechanisms are present in the chromaffin cells of the sheep adrenal medulla before birth. *The Journal of physiology* 509:887-93.
17. Thompson RJ, Jackson A, Nurse CA (1997). Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. *The Journal of physiology* 498:503-10.
18. Post JM, Hume JR, *et al.* (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *The American journal of physiology* 262:C882-90.
19. Yuan XJ, Goldman WF, *et al.* (1993). Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *The American journal of physiology* 264:L116-23.
20. González C, Rocher A, Zapata P (2003). Arterial chemoreceptors: cellular and molecular mechanisms in the adaptative and homeostatic function of the carotid body. *Revista de neurología* 36:239-54.
21. González, C, Almaraz L, *et al.* (1994). Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiological reviews* 74:829-98.
22. Kumar P, Bin-Jalial I (2007). Adequate stimuli of the carotid body: more than an oxygen sensor? *Respiratory physiology and neurobiology* 157:12-21.
23. Moon RY, Horne RS, Hauck FR (2007). Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370:1578-87.

24. Pardal R, López-Barneo J (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nature neuroscience* 5:197-8.
25. Eden GJ, Hanson MA (1987). Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat. *The Journal of physiology* 392:1-9.
26. Hatton CJ, Carpenter E, et al. (1997). Developmental changes in isolated rat type I carotid body cell K⁺ currents and their modulation by hypoxia. *The Journal of physiology* 501:49-58.
27. Kholwadwala D, Donnelly DF (1992). Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: in vitro studies in the newborn rat. *The Journal of physiology* 453:461-73.
28. Wasicko MJ, Sterni LM, et al. (1999). Reseting and postnatal maturation of oxygen chemosensitivity in rat carotid chemoreceptor cells. *The Journal of physiology* 514:493-503.
29. Ureña J, López-López J, et al. (1989). Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *The Journal of general physiology* 93:979-99.
30. Duchen MR, Caddy KWT, et al. (1988). Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. *Neuroscience* 26:291-311.
31. Pardal R, Ortega-Sáenz P, et al. (2007). Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 131:364-77.
32. Nurse C (2005). Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. *Autonomic neuroscience: basic and clinical* 120:1-9.
33. Prabhakar NR (2006). O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Experimental physiology* 91:17-23.
34. González C, Almaraz L, et al. (1992). Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends in neurosciences* 15:146-152.
35. Delpiano MA, Hescheler J (1989). Evidence for a PO₂-sensitive K⁺ channel in the type-I cell of the rabbit carotid body. *FEBS letters* 249:195-8.
36. López-Barneo J, López-López JR, et al. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241:580-2.
37. Peers C (1990). Hypoxic suppression of K⁺ currents in type I carotid body cells: selective effect on the Ca²⁺-activated K⁺ current. *Neuroscience letters* 119:253-6.
38. Stea A, Nurse CA (1991). Whole-cell and perforated-patch recordings from O₂-sensitive rat carotid body cells grown in short and long-term culture. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 418:93-101.
39. Ureña J, Fernández-Chacón R, et al. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:10208-11.
40. Buckler KJ, Vaughan-Jones RD (1994). Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells. *The Journal of physiology* 476:423-8.
41. Montoro RJ, Ureña J, et al. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *The Journal of general physiology* 107:133-43.
42. Varas R, Alcayaga J, Iturriaga R (2003). ACh and ATP mediate excitatory transmission in cat carotid identified chemoreceptor units in vitro. *Brain research* 988:154-63.
43. Conforti L, Millhorn DE (1997). Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K⁺ channel in rat PC12 cells by hypoxia. *The Journal of physiology* 502:293-305.
44. O'Kelly I, Stephens RH, et al. (1999). Potential identification of the O₂-sensitive K⁺ current in a human neuroepithelial body-derived cell line. *The American journal of physiology* 276:L96-L104.
45. Zhu WH, Conforti L, et al. (1996). Membrane depolarization in PC-12 cells during hypoxia is regulated by an O₂-sensitive K⁺ current. *The American journal of physiology* - 271:C658-65.
46. López-Barneo J (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Current opinion in neurobiology* 13:493-9.

47. López-López J, González C, *et al.* (1989). Low PO₂ selectively inhibits K⁺ channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *The Journal of general physiology* 93:1001-15.
48. Wyatt CN, Peers C (1995). Ca²⁺-activated K⁺ channels in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *The Journal of physiology* 483:559-65.
49. Teppema LJ, Dahan A (2010). The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement and analysis. *Physiological reviews* 90:675-754.
50. Ganfornina MD, López-Barneo J (1992). Gating of O₂-sensitive K⁺ channels of arterial chemoreceptor cells and kinetic modifications induced by low PO₂. *The Journal of general physiology* 100:427-55.
51. Ganfornina MD, López-Barneo J (1991). Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:2927-30.
52. Jiang C, Haddad GG (1994). A direct mechanism for sensing low oxygen levels by central neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:7198-201.
53. López-Barneo J (1994). Oxygen-sensitive ion channels: how ubiquitous are they? *Trends in neurosciences* 17:133-5.
54. Osipenko ON, Tate RJ, Gurney AM (2000). Potential role for kv3.1b channels as oxygen sensors. *Circulation research* 86:534-40.
55. Pérez-García MT, López-López JR, González C (1999). Kvb1-2 subunit coexpression in HEK293 cells confers oxygen sensitivity to Kv4.2 but not *Shaker* channels. *The Journal of general physiology* 113:897-907.
56. Conforti L, Bodi I, *et al.* (2000). O₂-sensitive K⁺ channels: role of the Kv1.2 α -subunit in mediating the hypoxic response. *The Journal of physiology* 524:783-93.
57. Hulme JT, Coppock EA, *et al.* (1999). Oxygen sensitivity of cloned voltage-gated K⁺ channels expressed in the pulmonary vasculature. *Circulation research* 85:489-97.
58. Patel AJ, Lazdunski M, Honoré E (1997). Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K⁺ channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *The EMBO journal* 16:6615-25.
59. Wang J, Juhaszova M, *et al.* (1997). Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K⁺ channel α subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* 100:2347-53.
60. López-Barneo J. Canales de potasio regulados por oxígeno Monografías Dr. Antonio Esteve. Farmacología de los canales iónicos 43-53.
61. Karlin KD (1993). Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science* 261:701-8.
62. López-López JR, González C (1992). Time course of K⁺ current inhibition by low oxygen in chemoreceptor cells of adult rabbit carotid body. Effects of carbon monoxide. *FEBS letters* 299:251-4.
63. Poss KD, Thomas MJ, *et al.* (1995). Hippocampal long-term potentiation is normal in heme oxygenase-2 mutant mice. *Neuron* 15:867-73.
64. Doré S, Takahashi M, *et al.* (1999). Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2445-50.
65. Willians SE, Wootton P, *et al.* (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 306:2093-7.
66. Wang R, Wu L (1997). The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 272:8222-6.
67. Ortega-Sáenz P, Pascual A, *et al.* (2006). Acute oxygen sensing in hemeoxygenase-2 null mice. *The Journal of general physiology* 128:405-11.
68. Ortega-Sáenz P, Pascual A, Piruat JI, López-Barneo J (2007). Mechanisms of acute oxygen sensing by the carotid body: lessons from genetically modified animals. *Respiratory physiology and neurobiology* 157:140-7.
69. Biagioli M, Pinto M, *et al.* (2009). Unexpected expression of α - and β -globin in mesence

- phalic dopaminergic neurons and glial cells. *PNAS* 106:15454-9.
70. Newton DA, Krishna Rao KM, *et al.* (2006). Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 281:5668-76.
 71. Schelshorn DW, Schneider A, *et al.* (2009). Expression of hemoglobin in rodent neurons. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 29:585-95.
 72. Liu L, Zeng M, Stamler JS (1999). Hemoglobin induction in mouse macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6643-7.
 73. Bhaskaran M, Chen H, *et al.* (2005). Hemoglobin is expressed in alveolar epithelial type II cells. *Biochemical and biophysical research communications* 33:1348-52.
 74. Nishi H, Inagi R, *et al.* (2008). Hemoglobin is expressed by mesangial cells and reduces oxidant stress. *Journal of the American Society of Nephrology* 19:1500-8.
 75. Kinoshita A, Tsukada K, *et al.* (2007). Roles of hemoglobin allosterity in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes. *The Journal of biological chemistry* 282:10731-41.
 76. Walder JA, Chatterjee R, *et al.* (1984). The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *The Journal of biological chemistry* 259:10238-46.
 77. Motais R, García-Romeu F, Borgese F (1987). The control of Na^+/H^+ exchange by molecular oxygen in trout erythrocytes. A possible role of hemoglobin as a transducer. *The Journal of general physiology* 90:197-207.
 78. Lauf PK (1998). K^+/Cl^- cotransport "to be or not to be" oxygen sensitive. *The Journal of general physiology* 51:1.
 79. Archer SL, Huang J, *et al.* (1993). A redox-based O_2 sensor in rat pulmonary vasculature. *Circulation research* 73:1100-12.
 80. Benot AR, Ganfornina MD, López-Barneo J (1993). Potassium channel modulated by hypoxia and the redox status in glomus cells of the carotid body. In *Ion flux in pulmonary vascular control*, ed. EK Weir, JR Hume JT Reeves, pp177-87. New York: Plenum.
 81. López-Barneo J, Montoro R, *et al.* (1998). Oxygen-regulated ion channels: functional roles and mechanisms. *Ver Ref. 2*, pp 127-44.
 82. Yuan XJ, Tod ML, *et al.* (1994). Deoxyglucose and reduced glutathione mimic effects of hypoxia on K^+ and Ca^{2+} conductances in pulmonary artery cells. *The American journal of physiology* 267:L52-L63.
 83. Acker H (2005). The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360:2201-10.
 84. Archer SL, Reeve HL, *et al.* (1999). O_2 sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7944-9.
 85. He L, Chen J, *et al.* (2002). Characteristics of carotid body chemosensitivity in NADPH oxidase-deficient mice. *The American journal of physiology* 282:C27-C33.
 86. He L, Dinger B, *et al.* (2005). Effect of p47^{phox} gene deletion on ROS production and oxygen sensing in mouse carotid body chemoreceptor cells. *American journal of physiology. Lung Cellular and molecular physiology* 289:L916-L924.
 87. Obeso A, Gomez-Nino A, González C (1999). NADPH oxidase inhibition does not interfere with low PO_2 transduction in rat and rabbit CB chemoreceptor cells. *The American journal of physiology* 276:C593-C601.
 88. Roy A, Rozanov C, *et al.* (2000). Mice lacking in gp91 phox subunit of NADPH oxidase showed glomus cell $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and respiratory responses to hypoxia. *Brain research* 872:188-93.
 89. Buckler KJ, Vaughan-Jones RD (1998). Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells. *The Journal of physiology* 513:819-33.
 90. Wyatt CN, Buckler KJ (2004). The effect of mitochondrial inhibitors on the membrane -

- currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *The Journal of physiology* 556:175-91.
91. González C, Sanz-Alyate G, *et al.* (2004). Effects of reducing agents on glutathione metabolism and the function of carotid body chemoreceptor cells. *Biological chemistry* 385:265-75.
 92. Varas R, Wyatt CN, Buckler KJ (2007). Modulation of TASK-like background potassium channels in rat arterial chemoreceptor cells by intracellular ATP and other nucleotides. *The Journal of physiology* 583:521-36.
 93. Wyatt CN, Pearson SA, *et al.* (2008). Key roles for AMP-activated protein kinase in the function of the carotid body? *Advances in experimental medicine and biology* 605:63-8.
 94. Ortega-Sáenz P, Pardal R, *et al.* (2003). Rotenone selectivity occludes sensitivity to hypoxia in rat carotid body glomus cells. *The Journal of physiology* 548:789-800.
 95. Baysal BE (2003). On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma. *Trends in endocrinology and metabolism* 14:453-9.
 96. Baysal BE, Ferrell RE, *et al.* (2000). Mutations in *SDHD*, a mitochondrial complex II gene in hereditary paraganglioma. *Science* 287:848-51.
 97. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, *et al.* (2001). The R22X mutation of the *SDHD* gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *American journal of human genetics* 69:1186-97.
 98. Rustin P, Munnich A, Rötig A (2002). Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *European journal of human genetics* 10:289-91.
 99. Piruat JI, Pintado CO, *et al.* (2004). The mitochondrial *SDHD* gene is required for early embryogenesis, and its partial deficiency results in persistent carotid body glomus cell activation with full responsiveness to hypoxia. *Molecular and cellular biology* 24:10933-40.
 100. Clementi E, Brown GC, *et al.* (1999). On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1559-62.
 101. Fung ML, Ye JS, Fung PCW (2001). Acute hypoxia elevates nitric oxide generation in rat carotid body *in vitro*. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 442:903-9.
 102. Prabhakar NR (1999). NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body. *Respiration physiology* 115:161-8.
 103. Kline DD, Yang T, *et al.* (1998). Altered respiratory responses to hypoxia in mutant mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *The Journal of physiology* 511:273-87.
 104. Campanucci VA, Zhang M, *et al.* (2006). Expressing of multiple P2X receptors by glossopharyngeal neurons projecting to rat carotid body O₂-chemoreceptors: role in nitric oxide-mediated efferent inhibition. *The Journal of neuroscience* 26:9482-93.
 105. Kline DD, Overholt JL, Prabhakar NR (2002). Mutant mice deficient in NOS-1 exhibit attenuated long-term facilitation and short-term potentiation in breathing. *The Journal of physiology* 539:309-15.
 106. Lahiri S, Roy A, *et al.* (2006). Oxygen sensing in the body. *Progress in biophysics and molecular biology* 91:249-86.
 107. Ortega-Sáenz P, García-Fernández M, *et al.* (2003). Studies on glomus cell sensitivity to hypoxia in carotid body slices. *Advances in experimental medicine and biology* 536:65-73.
 108. Masson N, Ratcliffe PJ (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *Journal of cell science* 116:3041-9.
 109. Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2005). Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and biophysical research communications* 338:617-26.
 110. Semenza GL (2004). Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 19:176-82.
 111. Kline DD, Peng YJ, *et al.* (2002). Defective carotid body function and impaired ventilator responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible

- factor 1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:821-6.
112. Peng YJ, Yuan G, *et al.* (2006). Heterozygous HIF-1 deficiency impairs carotid body-mediated cardio-respiratory responses and ROS generation in mice exposed to chronic intermittent hypoxia. *The Journal of physiology* 577:705-16.
 113. Del Toro R, Levitsky KL, *et al.* (2003). Induction of T-type calcium channel gene expression by chronic hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 278:22316-24.
 114. Jaakkola P, Mole DR, *et al.* (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-72.
 115. Peng YJ, Nanduri J, *et al.* (2010). H₂S mediates O₂ sensing in the carotid body. *PNAS* 107:10719-24.
 116. López-Barneo J, López-López JR, *et al.* (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241:580-2.
 117. López-López JR, Perez-Garcia MT (2007). Oxygen sensitive Kv channels in the carotid body. *Respiratory, physiology and neurobiology* 157:65-74.
 118. Peers C, Wyatt CN (2007). The role of maxiK channels in carotid body chemotransduction. *Respiratory, physiology and neurobiology* 157:75-82.
 119. Goldstein SA, Price LA, *et al.* (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13256-61.
 120. Ketchum KA, Joiner WJ, *et al.* (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376:690-5.
 121. Lesage F, Guillemare E, *et al.* (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *The EMBO journal* 15:1004-11.
 122. Pardal R, Ludewig U, *et al.* (2000). Secretory responses of intact glomus cells in thin slices of rat carotid body to hypoxia and tetraethylammonium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:2361-6.
 123. Duprat F, Lauritzen I, *et al.* (2007). The TASK background K₂P channels: chemo- and nutrient sensors. *Trends in neurosciences* 30:573-80.
 124. Mulkey DK, Stornetta RL, *et al.* (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nature neuroscience* 7:1360-9.
 125. Talley EM, Lei Q, *et al.* (2000). TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* 25:399-410.
 126. Talley EM, Solorzano G, *et al.* (2001). CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *The Journal of neuroscience* 21:7491-505.
 127. Washburn CP, Sirois JE, *et al.* (2002). Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K⁺ conductance. *The Journal of neuroscience* 22:1256-65.
 128. Hartness ME, Lewis A, *et al.* (2001). Combined antisense and pharmacological approaches implicate hTASK as an airway O₂ sensing K⁺ channel. *The Journal of biological chemistry* 276:26499-508.
 129. Gurney AM, Osipenko ON, *et al.* (2003). Two-pore domain K⁺ channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation research* 93:957-64.
 130. Olschewski A, Li Y, *et al.* (2006). Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation research* 98:1072-80.
 131. Baumann TK, Chaudhary P, Martenson ME (2004). Background potassium channel block and TRPV1 activation contribute to proton depolarization of sensory neurons from humans with neuropathic pain. *The European journal of neuroscience* 19:1343-51.
 132. Cooper BY, Johnson RD, Rau KK (2004). Characterization and function of TWIK-related acid sensing K⁺ channels in a rat nociceptive cell. *Neuroscience* 129:209-24.
 133. Rau KK, *et al.* (2006). Expression of TWIK-related acid sensitive K⁺ channels in capsaicin sensitive and insensitive cells of rat dorsal root ganglia. *Neuroscience* 141:955-63.
 134. Lin W, Burks CA, *et al.* (2004). Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *Journal of neurophysiology* 92, 2909-19.

135. Richter TA, Dvoryanchikov GA, *et al.* (2004). Acid-sensitive two-pore domain potassium (K_{2p}) channels in mouse taste buds. *Journal of neurophysiology* 92:1928-36.
136. Burdakov D, Jensen LT, *et al.* (2006). Tandem-pore K⁺ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* 50, 711-22.
137. Williams RH, Jensen LT, *et al.* (2007). Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:10685-90.
138. Yamamoto Y, Kummer W, *et al.* (2002). TASK-1, TASK-2, TASK-3 and TRAAK immunoreactivities in the rat carotid body. *Brain research* 950:304-7.
139. Barbe C, Al-Hashem F, *et al.* (2002). A possible dual site of action for carbon monoxide-mediated chemoexcitation in the rat carotid body. *The Journal of physiology* 543:933-45.
140. Buckler KJ, Williams BA, Honore E (2000). An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *The Journal of physiology* 525:135-42.
141. Berg AP, Talley EM, *et al.* (2004). Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *The Journal of neuroscience* 24:6693-702.
142. Czirjak G, Enyedi P (2001). Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two pore domain potassium channel subunits. *The Journal of biological chemistry* 277:5426-32.
143. Kang D, Han J, *et al.* (2004). Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *The Journal of physiology* 554:64-77.
144. Lauritzen I, Zanzouri M, *et al.* (2003). K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis: role of TASK leak K⁺ channels. *The Journal of biological chemistry* 278, 32068-76.
145. Kim D, Cavanaugh EJ, *et al.* (2009). Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *The Journal of physiology* 587:2963-75.
146. Wyatt CN, Peers C (2009). Hetero or homo, hypoxia has them all. *The Journal of physiology* 587:2717-8.
147. Trapp S, Aller MI, *et al.* (2008). A role for TASK-1 KCNK3 channels in the chemosensory control of breathing. *The Journal of neuroscience* 28:8844-50.
148. Buckler KJ (2007). TASK-like potassium channels and oxygen sensing in the carotid body. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 157:55-64.
149. Buckler KJ, Williams BA, Honoré E (2000). An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *The Journal of physiology* 525:135-42.
150. Lewis A, Hartness ME, *et al.* (2001). Recombinant hTASK1 is an O₂-sensitive K⁺ channel. *Biochemical and biophysical research communications* 285:1290-4.
151. Johnson RP, O'Kelly IM, Fearon IM (2004). System-specific O₂ sensitivity of the tandem pore domain K⁺ channel TASK-1. *American journal of physiology. Cell Physiology* 286:C391-7.
152. Maingret F, Patel AJ, *et al.* (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁺ channel TASK-1. *The EMBO journal* 20:47-54.
153. Williams BA, Buckler KJ (2004). Biophysical properties and metabolic regulation of a TASK-like potassium channel in rat carotid body type 1 cells. *American journal of physiology. Lung Cellular and molecular physiology* 286:L221-30.
154. Lee YM, Kim BJ, *et al.* (2006). NOX4 as an oxygen sensor to regulate TASK-1 activity. *Cellular signalling* 18:499-507.
155. González C, Agapito MT, *et al.* (2007). Chemoreception in the context of the general biology of ROS. *Respiratory physiology and neurobiology* 157:30-44.
156. Lauf PK (1998). K⁺-Cl⁻ cotransport: "to be or not to be" oxygen sensitive. *The Journal of physiology* 511:1.
157. Berenbrink M, Volkel S, Heisler MN (2000). O₂-dependent K⁺ fluxes in trout red blood

- cells: the nature of O₂ sensing revealed by the O₂ affinity, cooperativity and pH dependence of transport. *The Journal of physiology* 526:69-80.
158. Gilles-González MA, González G, *et al.* (1994). Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, are a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry* 33:8067-73.
 159. Gilles-González MA, González G, *et al.* (2008). Oxygen-sensing histidine-protein kinases: assays of ligand binding and turnover of response-regulator substrates. *Methods in enzymology* 437:173-89.
 160. Gilles-González MA, González G (2004). Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99:1-22.
 161. Chang AL, Tuckerman JR, *et al.* (2001). Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* 40:3420-6.
 162. Dioum EM, Rutter J, *et al.* (2002). NPAS2: a gas-responsive transcription factor. *Science* 298:2385-7.
 163. Dunham CM, Dioum EM, *et al.* (2003). A distal arginine in oxygen-sensing heme-PAS domains is essential to ligand binding, signal transduction, and structure. *Biochemistry* 42:7701-8.
 164. Gilles-González MA, Ditta GS, Helinski DR (1991). A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350:170-2.
 165. Gilles-González MA, González G (2004). Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *Journal of applied physiology* 96:774-83.
 166. Gilles-González MA, González G (1993). Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *The Journal of biological chemistry* 268:16293-7.
 167. Gong W, Hao B, *et al.* (1998). Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15177-82.
 168. Lois AF, Weinstein M, *et al.* (1993). Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* that are coordinately regulated by oxygen. *The Journal of biological chemistry* 268:4370-5.
 169. Monson EK, Weinstein M, *et al.* (1992). The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a hemebinding oxygen-sensing domain and functional C-terminal kinase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:4280-4.
 170. Tuckerman JR, González G, Gilles-González MA (2001). Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of molecular biology* 308:449-55.
 171. Gilles González MA, González G, Perutz MF (1995). Kinase activity of oxygen sensor FixL depends on the spin state of its heme iron. *Biochem* 34:232-6.
 172. Stamler JS, Jia L, *et al.* (1997). Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276:2034-7.
 173. Sousa EHS, Tuckerman JR, *et al.* (2007). A memory of oxygen binding explains the dose response of the heme-based sensor FixL. *Biochemistry* 46:6247-57.
 174. Ross P, Mayer R, Benziman M (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological reviews* 55:35-58.
 175. Delgado-Nixon VM, González G, Gilles-González MA (2000). Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry* 39: 2685-91.
 176. Tanaka A, Takahashi H, Shimizu T (2007). Critical role of the heme axial ligand, Met95, in locking catalysis of the phosphodiesterase from *Escherichia coli* (*EcDos*) toward cyclic di GMP. *The Journal of biological chemistry* 282:21301-7.
 177. Sasakura Y, Yoshimura-Suzuki T, *et al.* (2006). Structure-function relationships of *EcDos*, a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. *Accounts of chemical research* 39:37-43.
 178. Hou S, Larsen RW, *et al.* (2000). Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and --

- Bacteria. *Nature* 403:540-4.
179. Freitas TA, Hou S, Alam M (2003). The diversity of globin-coupled sensors. *FEBS Letters* 552:99-104.
 180. Hou S, Freitas T, et al. (2001). Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9353-8.
 181. Hardison RC (1996). A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5675-9.
 182. Óscar Andrés Peñuela (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica* 36:215-25.
 183. Hardison RC, Chui DH, et al. (2001). Databases of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server. *Hemoglobin* 25:183-93.
 184. Zhou S, Olson JS, et al. (2006). Biochemical fates of hemoglobin bound to hemoglobin-stabilizing protein AHSP. *The Journal of biological chemistry* 281:32611-8.
 185. Yu X, Kong Y, et al. (2007). An erythroid chaperone that facilitates folding of α -globin subunits for hemoglobin synthesis. *The Journal of Clinical Investigation* 117:1856-65.
 186. Adamson SD (1968). Factors affecting the rate of protein synthesis in lysate systems from reticulocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 125:671-83.
 187. Howard GA (1970). Studies on cessation of protein synthesis in a reticulocyte lysate-free system. *Biochimica et biophysica acta* 213:237-40.
 188. Hardison R (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protest and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5675-9.
 189. Vinogradov SN, Hoogewijs D, et al. (2005). Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11385-9.
 190. Brunori M (2001). Nitric oxide, cytochrome-c oxidase and myoglobin. *Trends in biochemical sciences* 26:21-3.
 191. Giardina B, Messina I, et al. (1995). The multiple functions of hemoglobin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 30:165-96.
 192. Hardison R (1998). Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *The Journal of experimental biology* 201:1099-117.
 193. Gardner PR, Gardner AM, et al. (1998). Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10378-83.
 194. Hausladen A, Gow AJ, Stamler JS (1998). Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14100-5.
 195. Cosby K, Partovi KS, et al. (2003). Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature medicine* 9:1498-505.
 196. Huang Z, Shiva S, et al. (2005). Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *The Journal of Clinical Investigation* 115:2099-107.
 197. Appleby CA, Bradbury JH, et al. (1983). Leghemoglobin. Kinetic, nuclear magnetic resonance, and optical studies of pH dependence of oxygen and carbon monoxide binding. *The Journal of biological chemistry* 258:2254-9.
 198. Goodman M, Pedwaydon J, et al. (1988). An evolutionary tree for invertebrate globin sequences. *Journal of molecular evolution* 27:236-49.
 199. Vinogradov SN, Moens L (2008). Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage and sensing. *The Journal of biological chemistry* 283:8773-7.
 200. Burmester T, Weich B, et al. (2000). A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* 407:520-3.
 201. Burmester T, Ebner B, et al. (2002). Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Molecular biology and evolution* 19:416-21.

202. Pesce A, Bolognesi M, *et al.* (2002). Neuroglobin and Cytoglobin: fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Reports* 3:1146-51.
203. Trent J, Watts R, Hargrove M (2001). Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *The Journal of biological chemistry* 276:30106-10.
204. Burmester T, Hankeln T (2004). Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News in physiological sciences* 19:110-3.
205. Couture M, Burmester T, *et al.* (2001). The heme environment of mouse neuroglobin. *The Journal of biological chemistry* 276:36377-82.
206. Dewilde S, Kiger L, *et al.* (2001). Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *The Journal of biological chemistry* 276:38949-55.
207. Mammen P, Shelton J, *et al.* (2002). Neuroglobin, a novel member of globin family, is expressed in focal regions of the brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 50:1591-8.
208. Sun Y, Jin K, *et al.* (2001). Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:15306-11.
209. Hankeln T, Ebner B, *et al.* (2005). Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *Journal of inorganic biochemistry* 99:110-9.
210. Brune B, Gotz C, *et al.* (1997). Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 272:7253-8.
211. Drapier JC, Hibbs JB Jr. (1988). Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *Journal of immunology* 140:2829-38.
212. Drapier JC, Pellar C, Henry Y (1991). Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *The Journal of biological chemistry* 266:10162-7.
213. Miesel R, Kurpisz M, Kroger H (1996). Suppression of inflammatory arthritis by simultaneous inhibition of nitric oxide synthase and NADPH oxidase. *Free radical biology and medicine* 20:75-81.
214. Zhuang JC, Wogan GN (1997). Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:11875-80.
215. Fraser P, Gribnau J, Trimborn T (1998). Mechanisms of developmental regulation in globin loci. *Current opinion in hematology* 5:139-44.
216. Crandall ED, Matthay MA (2001). Alveolar epithelial transport. Basic science to clinical medicine. *American journal of respiratory and critical care medicine* 163:1021-9.
217. Fehrenbach H (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory research* 2:33-46.
218. Mallory GB Jr. (2001). Surfactant proteins: role in lung physiology and disease in early life. *Paediatric respiratory reviews* 2:151-8.
219. Poynter SE, LeVine AM (2003). Surfactant biology and clinical application. *Critical care clinics* 19:459-72.
220. Warburton D, Bellusci S (2004). The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair. *Paediatric respiratory reviews* 5 (Suppl. A):S283-7.
221. Wright JR (2003). Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. *The Journal of Clinical Investigation* 111:1453-5.
222. Elger M, Drenckhahn D, *et al.* (1993). Cultured rat mesangial cells contain smooth muscle alpha-actin not found in vivo. *The American journal of pathology* 142:497-509.
223. Schnaper HW, Kopp JB, *et al.* (1996). Increased expression of extracellular matrix proteins and decreased expression of matrix proteases after serial passage of glomerular mesangial cells. *Journal of cell science* 109:2521-8.
224. Nangaku M (2006). Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common path-

- way to end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 17:17-25.
225. Pautz A, Franzen R, *et al.* (2002). Cross-talk between nitric oxide and superoxide determines ceramide formation and apoptosis in glomerular cells. *Kidney international* 61:790-6.
226. Inoguchi T, Li P, *et al.* (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49:1939-45.
227. Jaimes EA, Galceran JM, Raij L (1998). Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney international* 54:775-84.
228. Kobori H, Nangaku M, *et al.* (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological reviews* 59:251-87.
229. Li JM, Shah AM (2003). ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 14(Suppl 3):S221-6.
230. Digicaylioglu M, Bichet S, *et al.* (1995). Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:3717-20.
231. Morishita E, Masuda S, *et al.* (1997). Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents *in vitro* glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76:105-16.
232. Siren AL, Knerlich F, *et al.* (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathologica* 101:271-6.
233. Bugelski PJ, Nessor T, *et al.* (2008). Pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in murine bone marrow. *Pharmaceutical research* 25:369-78.
234. Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-8.
235. Choi HK, Won LA, *et al.* (1991). Immortalization of embryonic mesencephalic dopaminergic neurons by somatic cell fusion. *Brain Research* 552:67-76.
236. Choi WS, Yoon SY, *et al.* (1999). Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP⁺-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *Journal of neuroscience research* 57:86-94.
237. Chung CY, Seo H, *et al.* (2005). Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Human molecular genetics* 14:1709-25.
238. Greene JG, Dingledine R, Greenamyre JT (2005). Gene expression profiling of rat midbrain dopamine neurons: Implications for selective vulnerability in parkinsonism. *Neurobiology of disease* 18:19-31.
239. Grimm J, Mueller A, *et al.* (2004). Molecular basis for catecholaminergic neuron diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:13891-6.
240. Mann VM, Cooper JM, *et al.* (1992). Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115:333-342.
241. López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, *et al.* (2006). O₂-sensing by ion channels and mitochondrial function in carotid body glomus cells. *Novartis Foundation symposium* 272:54-64.
242. Pardal R, López-Barneo J (2002). Carotid body thin slices: responses of glomus cells to hypoxia and K⁺-channel blockers. *Respiratory physiology and neurobiology* 132:69-79.
243. Talavera A, Martín F, Sánchez H (1996). Los virus en la terapia génica. Publicación Oficial de la *Sociedad Española de Virología*, 4:3-15.
244. Barton GM, Medzhitov R (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *PNAS* 99:14943-5.
245. Park F, Kay MA (2001). Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on transduction efficiency and gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Therapy* 4:164-73.

246. Li Z, Düllmann J, *et al.* (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296:497-8.
247. Negishi A, Chen J, *et al.* (2004). Analysis of the interaction between adeno-associated virus and heparin sulfate using atomic force microscopy. *Glycobiology* 14:969-77.
248. Burger C, Gorbatyuk OS, *et al.* (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2 and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Molecular Therapy* 10:302-17.
249. Grimm D, Kern A, *et al.* (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Human gene therapy* 9:2745-60.
250. Zolotukhin S (2005). Production of recombinant adeno-associated virus vectors. *Human gene therapy* 16:551-7.
251. Sun L, Li J, Xiao X (2000). Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nature medicine* 6:599-602.
252. Duan D, Yue Y, Engelhardt JF (2001). Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Molecular Therapy* 4:383-91.
253. Yan Z, Zhang Y, *et al.* (2000). Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6716-21.
254. Poole RK (1994). Oxygen reactions with bacterial oxidases and globins: binding, reduction and regulation. *Antonie Leeuwenhoek* 65:289-310.
255. Poole RK, Ioannidis N, Orii Y (1996). Reactions of the Escherichia coli flavohaemoglobin (Hmp) with NADH and near-micromolar oxygen: oxygen affinity of NADH oxidase activity. *Microbiology* 142:1141-8.
256. Yuill KH, Stansfeld PJ, *et al.* (2007). The selectivity, voltage-dependence and acid-sensitivity of the tandem pore potassium channel TASK-1: contributions of the pore domains. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 455:333-48.
257. Buckler KJ (1997). A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. *The Journal of physiology* 498:649-62.
258. Kwan KM (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 32:49-62.
259. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2nd edition.
260. Linden AM, Aller MI, *et al.* (2006). The in vivo contributions of TASK-1-containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the α_2 adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 317:615-26.
261. Ortega-Sáenz P, Levitsky KL, *et al.* (2010). Carotid body chemosensory responses in mice deficient of TASK channels. *The Journal of general physiology* 135:379-92.
262. García Fernández, M (2005). Células neurosecretoras sensoras de oxígeno y glucosa. Tesis doctoral.
263. López-Barneo J, del Toro R, *et al.* (2003). Regulation of oxygen sensing by ion channels. *Journal of applied physiology* 96:1187-95.
264. Peers C, Buckler KJ (1995). Transduction of chemostimuli by the type I carotid body cell. *The Journal of membrane biology* 144:1-9.
265. Munakata H, Yamagami T, *et al.* (1993). Purification and structure of rat erythroid-specific delta aminolevulinic synthase. *Journal of biochemistry* 114:103-11.
266. Munakata H, Sun JY, *et al.* (2004). Role of the heme regulatory motif in the heme-mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinic synthase. *Journal of biochemistry* 136:233-8.
267. Greene LA y Tischler AS (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 2424-8.
268. Del Toro R, Levitsky KL, López-Barneo J, Chiara MD (2003). Induction of T-type calcium

- channel gene expression by chronic hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 278:22316-24.
269. Hewitson KS, Schofield CJ (2004). The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug discovery today* 9:704-11.
270. Epstein AC, Gleadle JM, *et al.* (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107:43-54.
271. Jaakkola P, Mole DR, *et al.* (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-72.
272. Aller MI, Veale EL, *et al.* (2005). Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience* 25:11455-67.
273. Brickley SG, Aller MI, *et al.* (2007). TASK-3 two-pore domain potassium channels enable sustained high-frequency firing in cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience* 27:9329-40.
274. Mulkey DK, Talley EM, *et al.* (2007). TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemo-sensitivity. *The Journal of neuroscience* 27:14049-58.
275. Heitzman D, Derand R, *et al.* (2008). Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO journal* 27:179-87.
276. Carabelli V, Marcantoni A, *et al.* (2007). Chronic hypoxia up-regulates α 1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *The Journal of physiology* 584:149-65.
277. Levitsky KL y López-Barneo J (2009). Developmental change of T-type Ca²⁺ channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia. *The Journal of physiology* 587:1917-29.
278. Feron O y Godfraind T (1995). Regulation of the L-type calcium channel α -1 subunit by chronic depolarization in the neuron-like PC12 and aortic smooth muscle A7r5 cell lines. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 430:323-32.
279. Yamaguchi S, Lande B, *et al.* (2004). Patch clamp study of mouse glomus cells using a whole carotid body. *Neuroscience letters* 357:155-7.
280. García-Fernández M, Ortega-Sáenz P, *et al.* (2007). Mechanisms of low-glucose sensitivity in carotid body glomus cells. *Diabetes* 56:2893-900.
281. Faustino EV, Donnelly DF (2006). An important functional role of persistent Na⁺ current in carotid body hypoxia transduction. *Journal of applied physiology* 101:1076-84.
282. Kemp PJ (2006). Detecting acute changes in oxygen: will the real sensor please stand up? *Experimental physiology* 91:829-34.
283. Carpenter E, Peers C (2001). A standing Na⁺ conductance in rat carotid body type I cells. *Neuroreport* 12:1421-5.
284. Brunori M, Vallone B (2007). Neuroglobin, seven years after. *Cellular and molecular life sciences* 64,1259-68.
285. Fordel E, Thijs L, *et al.* (2007). Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging. *The FEBS journal* 274,1312-17.
286. Bishop AE (2004). Pulmonary epithelial stem cells. *Cell proliferation* 37,89-96.
287. Williams MC (2003). Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annual Review of physiology* 65,669-95.
288. Kotton DN, Ma BY, *et al.* (2001). Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 128,5181-8.
289. Krause DS, Theise ND, *et al.* (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105,369-77.
290. Dichter MA, Tischler AS, Greene LA (1977). Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature* 268,501-4.

291. Luzzatto L, Notaro R (2002). Hemoglobin's chaperone. *Nature* 417:703-5.
292. Cao A, Moi P (2002). Regulation of the globin genes. *Pediatric research* 51, 415-21.
293. Stamatoyannopoulos G (2005). Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental hematology*. 33:259-71.
294. Waggoner SA, Liebhaber SA (2003). Regulation of α -globin mRNA stability. *Society for Experimental Biology and Medicine* 228:387-95.
295. Aviv H, Voloch Z, et al. (1976). Biosynthesis and stability of globin mRNA in cultured erythroleukemic Friend cells. *Cell* 8:495-503.
296. Bonaventura C, Godette G, et al. (2005). Overproduction of α chains provides a proton-insensitive component to the bluefish hemoglobin system. *The Journal of biological chemistry* 280:40509-14.
297. Samaja M, Crespi T, et al. (2003). Oxygen transport in blood at high altitude: role of the hemoglobin-oxygen affinity and impact of the phenomena related to hemoglobin allosterism and red cell function. *European journal of applied physiology* 90:351-9.
298. Hoppeler H, Vogt M (2001). Muscle tissue adaptations to hypoxia. *The Journal of experimental biology* 204:3133-9.
299. Levine BD, Stray-Gundersen J (2001). The effects of altitude training are mediated primarily by acclimatization, rather than by hypoxic exercise. *Advances in experimental medicine and biology* 502:75-88.
300. Schmidt M, Gerlach F, et al. (2004). Cytoglobin is a respiratory protein expressed in connective tissue and neurons that is up-regulated by hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 279:8063-9.
301. Fordel E, Geuens E, et al. (2004). Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 319:342-8.
302. Roesner A, Hankeln T, Burmester T (2006). Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of experimental biology* 209:2129-37.
303. Timmerman CM, Chapman LJ (2004). Behavioral and physiological compensation for chronic hypoxia in the sailfin molly (*Poecilia latipinna*). *Physiological and biochemical zoology: PBZ* 13:97-106.
304. Person-Le Ruyet J, Boeuf G, et al. (1998). Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comparative biochemistry and physiology* 119A:511-8.
305. Nikinmaa M (2001). Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Respiration physiology* 128:317-29.
306. Jensen FB (2004). Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta physiologica Scandinavica* 182:215-27.
307. Richter F, Meuers BH, et al. (2009). Neurons express hemoglobin α - and β - chains in rat and human brains. *The Journal of comparative neurology* 515:538-47.
308. Vandenberg DJ, Mori N, Anderson DJ (1991). Co-expression of multiple neurotransmitter enzyme genes in normal and immortalized sympathoadrenal progenitor cells. *Developmental biology* 148:10-22.
309. Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC (2006). Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacology and therapeutics* 111:327-45.
310. Wang GL, Semenza GL (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:4304-8.
311. Caramelo C, Peña-Deudero JJ, et al. (2006). Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo basado en el control de la expresión génica. *Medicina* 66:155-64.
312. Olson JS, Eich RF, et al. (1997). Protein engineering strategies for designing more stable hemoglobin-based blood substitutes. *Artificial cells blood substitutes and immobilization biotechnology* 25:227-41.
313. Bauer AL, Paulding WR, et al. (2002). Endogenous von Hippel-Lindau tumor suppressor

- protein regulates catecholaminergic phenotype in PC12 cells. *Cancer research* 62:1682-7.
314. Goldstein S, Samuni A (2005). Intra- and intermolecular oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin induced by hydroxyl and carbonate radicals. *Free radical biology and medicine* 39:511-9.
315. Masuoka N, Kodama H, *et al.* (2003). Characterization of hydrogen peroxide removal reaction by hemoglobin in the presence of reduced pyridine nucleotides. *Biochimica et biophysica acta* 1637:46-54.
316. Youdim MB, Lavie L (1994). Selective MAO-A and B inhibitors, radical scavengers and nitric oxide synthase inhibitors in Parkinson's disease. *Life sciences* 55:2077-82.
317. Haffner SM (2000). Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism: clinical and experimental* 49:30-4.
318. Richer SP, Rose RC (1998). Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vision research* 38:2881-8.
319. Fridovich, Irwin (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology.*, 201: 1203-1209.
320. Cheng W, Fu YX, *et al.* (1999). Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids and protein. *The FASEB journal* 13:1467-75.
321. Maas E, Bisswanger H (1990). Localization of the alpha-oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes within the mitochondrion. *FEBS Letters* 277:189-90.
322. Reeder B, Wilson M (2005). Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease States. *Current medicinal chemistry* 12:2741-51.
323. Hui AS, Striet JB, *et al.* (2003). Regulation of catecholamines by sustained and intermittent hypoxia in neuroendocrine cells and sympathetic neurons. *Hypertension* 42:1130-6.
324. Schnell PO, Ignacak ML, *et al.* (2003). Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible transcription factors. *Journal of Neurochemistry* 85:483-91.
325. Decker MJ, Hue GE, *et al.* (2003). Episodic neonatal hypoxia evokes executive dysfunction and regionally specific alterations in markers of dopamine signaling. *Neuroscience* 117:417-25.
326. Flatmark T (2000). Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta physiologica Scandinavica* 168:1-47.
327. Zolotukhin S, Potter M, *et al.* (2002). Production and purification of serotype 1, 2 and 5 recombinant adeno-associated viral vector. *Methods* 28:158-67.
328. Kameda Y, Yamatsu Y, *et al.* (1994). Glomus cell differentiation in the carotid body region of chick embryos studied by neuron-specific class III beta-tubulin isotype and Leu-7 monoclonal antibodies. *The Journal of comparative neurology* 348:531-43.
329. Birnboim HC y Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7(6):1513-23.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5-aminolevulinato sintasa _____	Alas2
American Type Culture Collection _____	ATCC
Área tegmental ventral _____	VTA
Cadena α de la hemoglobina _____	α -Hb
Capacitancia _____	C
Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla _____	CYPEA
Cistationina- γ -liasa _____	CSE
Citoglobina _____	Cygb
Cuerpo carotídeo _____	CC
Dimetiloxalilglicina _____	DMOG
Dimetilsulfóxido _____	DMSO
Dominio Per-ARNT-Sim _____	PAS
Eritropoyetina _____	EPO
Especies reactivas de nitrógeno _____	NOS
Especies reactivas de oxígeno _____	ROS
Factor inducible por hipoxia-1 α _____	HIF-1 α
Fosfodiesterasa-1 de <i>Acetobacter xylinium</i> _____	AxpDEA1
Ganglio cervical superior _____	GCS
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa _____	GAPDH
Glutación peroxidasa dependiente de Selenio _____	Gpx1
Hemo oxigenasa-2 _____	HO-2
Hemoglobina A _____	HbA
Hemoglobina fetal _____	HbF
Luria Broth _____	LB
Médula adrenal _____	MA
Nervio del seno carotídeo _____	NCS
Neuroglobina _____	NGB
Nicotina-adenin-dinucleótido-fosfato _____	NADPH
Nicotina-adenin-dinucleótido-fosfato oxidasa-4 _____	NOX4
Presión parcial de oxígeno _____	PO ₂
Prolil hidroxilasa _____	PHD

Proteína estabilizante de la cadena α _____	AHSP
RNA de interferencia _____	RNAi
Succinato deshidrogenasa _____	SDHD
Superóxido dismutasa (isoforma citoplasmática) _____	Sod1
Tirosina hidroxilasa _____	TH
Virus adenoasociado _____	AAV
Virus adenoasociado recombinante _____	AAVr



M. TERESA MARCOS ALMARAZ

SEVILLA, 2011