



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
030G SEÑALIZACIÓN CELULAR Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

**PAPEL DE COX-2 EN LA FISIOPATOLOGÍA
CARDÍACA**

Memoria presentada por

María Soledad Alvarez

Para optar al grado de Doctor

Director:

Dra. Marta Casado Pinna

Unidad de Patología Metabólica Experimental (UPME)

Valencia, a 26 de Septiembre de 2014



Dña. Marta Casado Pinna, Doctora en Farmacia y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

INFORMA:

Que Dña. María Soledad Alvarez, licenciada en Bioquímica por la Universidad Nacional de San Luis, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “*Papel de COX-2 en la fisiopatología cardíaca*”.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora.

En Valencia, a 26 de Septiembre de 2014

Dra. Marta Casado Pinna

A Mariano y a mis padres



Para la realización de esta Tesis, la autora ha disfrutado de una Beca JAEPre del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Efecto cardioprotector de las prostaglandinas: papel en la función mitocondrial. (SAF2012-39732)” del Ministerio de Economía y Competitividad, “Papel de la ciclooxigenasa-2 en la fisiopatología cardiaca. (SAF2009-12602) del Ministerio de Ciencia e Innovación, y la ayuda “Papel de la ciclooxigenasa-2 en la fisiopatología cardiaca” (ACOMP/2011/120) de la Conselleria d’educació de la Generalitat Valenciana

Agradecimientos

Quizás no haya sido la mejor decisión apartarme de la clínica para adentrarme en la investigación... Empecé esta etapa lejos de mi gente y mi país. Mis ansias por aprender me llevaron además, a cambiar de laboratorio y volver a empezar un proyecto de tesis doctoral en el IBV. Hoy que el tiempo ha pasado, puedo decir que he aprendido mucho, y también de ciencia. Quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado porque ellas han hecho este camino mas fácil y dichoso.

En primer lugar quiero agradecer a Marta Casado Pinna, mi directora, por darme un lugar en su grupo y por la confianza depositada en mí. Trabajar con libertad es muy productivo para un becario pre doctoral que se está formando contando siempre con la tranquilidad de trabajar en equipo.

Quiero agradecer a mi compañera de laboratorio de todos estos años, Carme, por las charlas científicas y por su buena predisposición a resolver los problemas que aparecían y siempre con muchas ganas de enseñar y a Ana, con la que sólo compartimos los primeros años del trabajo de esta tesis pero que tanto me enseñó y que siempre hizo todo más alegre. Gracias también para Carlos “ el veterinario” por las charlas y por su compañerismo.

Agradezco profundamente al Dr. Rodrigue Rossignol y su excelente grupo, por tanta ciencia por tantas ganas y motivación. Por todo lo que me han enseñado... “¡Porque el optimismo hace la vida mas fácil!” Muchas gracias Toni, Mimi y Su.

Agradezco al servicio de extranjería de la Universidad de Valencia por simplificar la burocracia de todos estos años de renovación del visado de estudios y permitirme más tiempo para mis trabajar. A todos... muchas gracias!

Agradezco muy especialmente a todos los que hacen del IBV un lugar donde vale la pena trabajar. Los pasillos del IBV son una fuente inagotable de recursos y herramientas para intentar o incluso solucionar problemas. Siempre recordaré a Gema, Luis, Jordi, Lisa, Elena, Miguel, Ada, Carmen, Raquel, Belén, Arantxa y Belén. Muchas gracias a Laura. Por supuesto que han sido imprescindibles en esta tesis todos aquellos que nos permiten trabajar cada día: Pili, Ana, Amparo, Raúl, Amparo, Pepe, Manolo, Quico, Benito, Mari Luz, Irene, Éster, Carlos y María José.

Agradezco a mis entrañables vecinos de UGM y UMA por su compañerismo, por las charlas en la sala de cultivos, donde la balanza analítica de precisión, esperando ascensores y siempre que alguien lo necesitara... Quizás ellos ni sepan cuan importantes han sido para mí.

Agradezco al Prof. Enrique O'Connor por haberme sumado a su grupo de trabajo cuando recién llegue a España, será inolvidable esa primer beca. Ese grupo de trabajo me aceptó e integró con mis diferencias... hoy son un preciado tesoro, hoy Laura, Angie, Sandra, Marta, Carmen y Nuria son mis amigas!

Gracias a mi familia en España, por el día a día, por formar un equipo, por quererme: Martín, Luz María, Miquel e Iñaqui. A Nati. S. y su flía por tantas navidades "como en casa" por su amistad, apoyo y comprensión. Gracias

a Marta, Rebe, Amparo y Alba por darme un hogar y hermosas palabras de aliento y fuerzas para hacer mas liviana la cuesta de escribir esta tesis. Agradezco a Amparo y José Juan por su amabilidad y comprensión.

Muchísimas gracias a Isa porque su amistad, por estar siempre sin importar nada, por escucharme.

Quiero agradecer a mis amigos pampeanos o argentinos porque son la fuerza y el remanso para cumplir mis proyectos.

Siempre han estado presentes con una palabra de aliento, consuelo y mucha experiencia que enseña más que aconseja: Luis, Buby y Valeria. Gracias por escucharme y preocuparse por mí.

Agradezco profundamente a mis padres y a mi hermano por alentarme en este proyecto de hacer el doctorado tan lejos de casa, por enseñarme y mejorarme, por tanto ejemplo. No hubiera llegado hasta aquí, sin su apoyo incondicional. Agradezco a toda mi familia por aceptar la idea loca del doctorado y por creer en mí.

Agradezco a Mariano, por las charlas y rigurosas revisiones científicas, por el apoyo técnico para poner a punto tantas técnicas, por la pasión por hacer las cosas bien, por darme mucha felicidad, fuerzas cuando ya no tuve y razones para cada día pensar, que lo mejor esta por venir.

Muchas gracias a todos por todo lo que me han enseñado... el laboratorio ya tiene su tesis doctoral en COX-2!

Abreviaturas no usuales

AA: Acido araquidónico

ADNc: ADN complementario

AINEs: Anti inflamatorios no esteroideos

ARE: Elementos ricos en Adenina-Uracilo

mARN: ácido ribonucleico mensajero

CNV: Cardiomiocitos ventriculares neonatales

CI: Complejo respiratorio I ó NADH ubiquinona reductasa

CII: Complejo respiratorio II ó Succinato deshidrogenasa

CIII: Complejo respiratorio III ó Ubiquinol citocromo c reductasa

CIV: Complejo respiratorio IV ó Citocromo c oxidasa

CV: Complejo respiratorio CV ó ATP sintasa

COX: Ciclooxygenasa

hCOX-2 TG: Ratón transgénico con expresión constitutiva de h COX-2 en
corazón

CRE: Elemento de respuesta a cAMP

DFU: 5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metil-sulfonil)fenil-2(5H)-furanona

EPs: Receptores de PGE₂

FCC: Fallo cardíaco congestivo

IAM: Infarto agudo de miocardio

IM: Inhibición metabólica

IMF: intensidad media de fluorescencia

Indo: Indometacina

I-R: isquemia-reperfusión

LACI: Ligación de la Arteria Coronaria Izquierda

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

iNOS: Oxido nítrico sintasa inducible

OXPPOS: Foforilación oxidativa

PCI: Precondicionamiento isquémico

PGs: Prostaglandinas

PGG₂: Prostaglandina G₂

PGH₂: Prostaglandina H₂

PGI₂: Prostaciclina

PGE₂: Prostaglandina E₂

PGES: Prostaglandina E sintasa

cPGES: Prostaglandina E Sintasa citosolica

mPGES: Prostaglandina E Sintasa mitocondrial

PPRE: Elemento de respuesta al peroxisome proliferator

RE: Retículo endoplásmico

SOD: Superóxido dismutasa

VDAC: Voltage Dependent Anion Channel o Porina

Índice

Índice.....	1
Introducción	7
1. Prostaglandinas.....	9
1.1. Reseña histórica de las Prostaglandinas.....	9
1.2. Generalidades	10
1.3. Biosíntesis de Prostaglandinas.....	10
1.3.1. Ciclooxygenasas	11
1.3.2. Características de la expresión de COX-1 y COX-2	14
1.3.3. Estructura génica de las ciclooxygenasas	15
1.3.4. Estructura proteica de COX-1 y COX-2	18
1.4. Isoformas de PGES.....	21
1.5. Transporte y degradación de las prostaglandinas.....	22
1.6. Receptores de Prostaglandinas.....	23
2. COX-2 en la fisiología cardíaca.....	26
3. Antecedentes de la expresión constitutiva de COX-2 en corazón	39
4. La función mitocondrial.....	43
Objetivos	49
Metodología	53

1. Reactivos.....	55
2. Plásmidos.....	55
3. Transformación de bacterias competentes y obtención de plásmidos....	58
4. Modelo celular	58
4.1. Cultivo celular.....	58
4.2. Aislamiento de cardiomiocitos de ratón	60
5. Modelo animal: Ratones con sobreexpresión de COX-2 en corazón.....	62
6. Determinación de la concentración de PGE₂.....	63
7. Aislamiento de ARN	64
8. RT-PCR a tiempo real.....	64
9. Extracción de proteínas	66
10. Obtención de la fracción proteica enriquecida en mitocondrias.....	68
11. Extracción de mitocondrias	69
12. Separación de proteínas por electroforesis	71
12.1. Western blot.....	71
12.2. Electroforesis de proteínas nativas mitocondriales (Blue Native- PAGE).....	72
13. Proteómica.....	74
14. Curva de crecimiento	76

15. Panel oxidativo	76
16. Determinación de la concentración de ATP.....	77
17. Medición de la respiración.....	79
18. Ensayo de viabilidad: MTT	80
19. Medición de la actividad enzimática citocromo c oxidasa	81
20. Determinación del RATIO CIV/CII + CIII	83
21. Determinación del contenido aa3	84
22. Microscopia electrónica	84
23. Inmunofluorescencia	85
24. Técnica histológica.....	86
25. Análisis estadístico.....	87
Resultados y desarrollo argumental.....	89
CAPITULO 1. Análisis del proteoma de cardiomiocitos de ratón con sobreexpresión de la ciclooxigenasa 2 humana (hCOX-2).....	91
1.1. Control de la expresión de hCOX-2.....	91
1.1.1.Genotipado de ratones	91
1.1.2. Expresión de hCOX-2 en corazón.....	92
1.1.3. Producción de PGE ₂	93
1.2. Proteómica en cardiomiocitos de ratones.....	95

1.3. Recuperación de mitocondrias a partir de tejido	101
1.4. Biogénesis mitocondrial	101
1.5. Análisis de los complejos respiratorios mitocondriales por inmunodetección	103
1.6. Análisis de los supercomplejos respiratorios mitocondriales por inmunodetección	105
1.7. Expresión de ARNm de las subunidades I y II del CIV y VDAC.....	108
1.8. Consumo de oxígeno en fibras cardíacas.....	110
1.9. Determinación de la actividad enzimática de Citocromo c Oxidasa	111
1.10. Relación entre CIV y complejos CII + CIII.....	113
1.11. Determinación de los niveles de ATP en el modelo animal	114
1.12. Tratamiento con Isoproterenol de ratones NO TG y TG con expresión constitutiva de hCOX-2 en corazón.....	115
CAPITULO 2. ESTUDIO DEL PAPEL DE COX-2 EN LA MITOCONDRIA EN UNA LINEA DE CELULAS CARDIACAS.....	119
2.1. Caracterización de la línea celular H9c2 hCOX-2	119
2.2. Localización de hCOX-2 en células en condiciones basales.....	121
2.3. Medición de la respiración celular	122

2.4. Capacidad de Proliferación en medio aeróbico	124
2.5. Actividad enzimática del complejo IV en extractos celulares	125
2.6. Contenido de citocromo aa3	126
2.7. Concentración de ATP en el modelo celular	127
2.8. Evaluación de la viabilidad celular en condiciones de Inhibición Metabólica	128
2.8.1 Expresión de ciclooxigenasa-2 durante tratamiento de inhibición metabólica	129
2.9. Evaluación de la viabilidad celular posterior a tratamiento con CoCl ₂	131
2.10. Panel oxidativo	132
CAPITULO 3. DESARROLLO ARGUMENTAL.....	137
Conclusiones	155
Bibliografía	161

Introducción

1. Prostaglandinas

1.1. Reseña histórica de las Prostaglandinas

La primer descripción sobre las prostaglandinas data del año 1930, fue realizada por parte de los ginecólogos Kurzrock y Lieb (Kurzrok y Lieb 1930) que observaron que el semen humano podía contraer segmentos de músculo uterino. En 1935 Golblatt (Goldblatt 1935) y en 1936 Von Euler (von Euler 1936) en dos trabajos independientes, describen como ciertas sustancias contenidas en el líquido seminal tenían actividad estimuladora del musculo liso (útero) y vasodepresora en glándulas genitales accesorias y semen. Dado que estos factores estaban contenidos en el liquido seminal, asumieron que debían haber sido sintetizadas por la glándula prostática, por lo que las denominaron Prostaglandinas (PGs).

Más tarde, Bergström y Sjoval aislaron PGE₂ a partir de homogenados de vesícula seminal de carnero (Bergstrom y col. 1959). Ya en 1964 se describe por primera vez el mecanismo de conversión del acido araquidónico (AA) en prostablandinas (Bergstroem y col. 1964), aunque hasta diez años más tarde no se identificó la enzima responsable de la conversión de acido araquidónico (AA) en PGG₂ y PGH₂, la ciclooxigenasa (COX), descubierta por Hamber y Samuelsson (Hamberg y Samuelsson 1974) en sus estudios en vesículas seminales; además, es Samuelsson quien averiguó como se sintetizan las protaglandinas y descubrió su metabolismo (Samuelsson 1972).

Más tarde, un científico británico, Sir John Robert Vane descubrió la Prostaciclina (PGI₂), describiendo también sus efectos biológicos y la inhibición de COX por parte del ácido acetil salicílico (Ferreira y col. 1973; Flower y Vane 1974; Whittaker y col. 1976).

En el año 1982 le fue entregado el premio Nobel en Fisiología o Medicina a Sir John Vane, Sune Bergström y Bengt Samuelsson por sus trabajos en Prostaglandinas.

1.2. Generalidades

Las prostaglandinas actúan como mediadores celulares en procesos tales como inflamación, coagulación, regulación del flujo renal, fiebre y sensibilidad al dolor. Son sintetizados en la mayor parte de los tejidos del organismo (Funk 2001), no se acumulan en forma soluble ni en vesículas, siendo de esta forma liberadas inmediatamente después de ser sintetizadas.

Las PGs tienen una vida media corta y alta potencia, por esto han sido denominadas hormonas lipídicas (Shimizu y Nakamura 1985) aunque su mecanismo de acción actúa a distancias cortas, así sus efectos pueden desencadenarse de forma autocrina o paracrina (Mbonye y Song 2009).

1.3. Biosíntesis de Prostaglandinas

Las Prostaglandinas (PGs) se sintetizan a partir de ácidos grasos de 20 átomos de carbono (eicosanoides); por su abundancia el precursor mayoritario

de las PGs en los mamíferos es el ácido araquidónico (AA) que se encuentra esterificado en la posición S2 de los fosfolípidos de las membranas celulares y que proviene a su vez del ácido linoleico, un ácido graso esencial que se encuentra en la carne.

Las enzimas responsables de hidrolizar los enlaces éster de los fosfolípidos son las fosfolipasas, en particular la fosfolipasa A2 citosólica, que es la responsable de catalizar la liberación del AA contenido del fosfatidilinositol de membrana (Funk 2001) en respuesta a ciertos estímulos tales como: adrenalina, colágeno o trombina.

Las PGs son el producto de las reacciones enzimáticas catalizadas por las ciclooxigenasas (Hamberg y Samuelsson 1974).

1.3.1. Ciclooxigenasas

Las ciclooxigenasas (COXs), EC 1.14.99.1, también conocidas como Prostaglandina H Sintetas (PGHS) o Prostaglandina Endoperóxido Sintetas, son enzimas bifuncionales que catalizan el punto de no retorno (Chandrasekharan y Simmons 2004), en la biosíntesis de los mediadores celulares derivados del ácido araquidónico (Figura 1): Tromboxanos (TXs), Prostaglandinas (PGs), y Prostaciclina (PGI₂).

Se han descrito tres ciclooxigenasas que han sido denominadas: COX-1, COX-2 y COX-3, siendo consideradas en la actualidad, COX-1 y COX-2 las de mayor relevancia fisiológica y patológica.

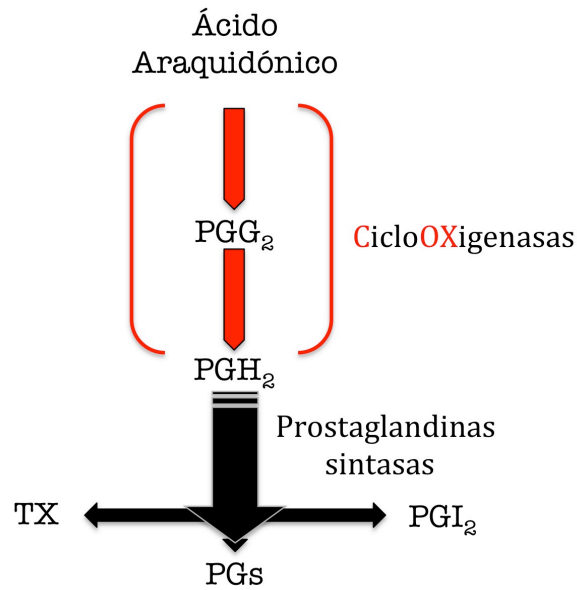


Figura 1. Esquema representativo de la vía de síntesis de las prostaglandinas. En rojo se muestran las reacciones catalizadas por las COXs.

La primer etapa de la catálisis comprende la ciclación del ácido araquidónico (AA) para formar el endoperóxido PGG₂ (Figura 2), etapa que requiere del aporte de dos moléculas de oxígeno (Smith y col. 1996). Luego, una reducción del hidroperóxido de carbono 15 da origen a la PGH₂ que es la prostaglandina precursora de todas las demás.

El producto de ambas ciclooxigenasas es la PGH₂ que es convertida a los diferentes compuestos activos por la acción de diversas enzimas conocidas como prostaglandina sintasas específicas (Figura 3).

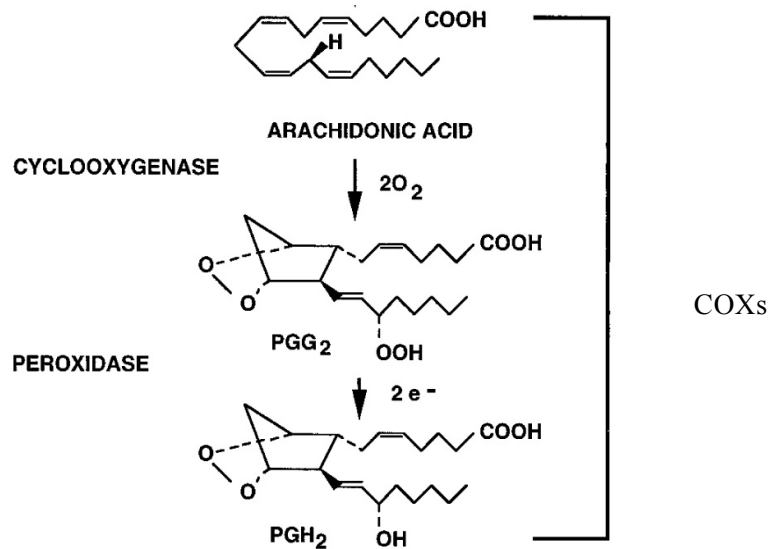


Figura 2. Reacciones catalizadas por las COXs [Adaptado de (Smith y col. 1996)].

De este modo, el producto final depende de la acción de cada una de estas isomerasas específicas y por lo tanto de su presencia. Aunque todos los tejidos tienen capacidad para sintetizar prostaglandinas, su concentración varía con el tipo y cantidad de las isomerasas individuales (Capra y col. 2014).

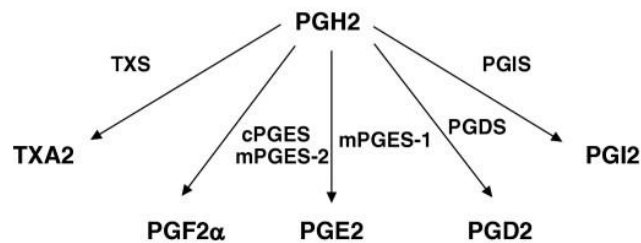


Figura 3. Biosíntesis de Prostaglandinas. Diferentes compuestos sintetizados a partir de prostaglandina H₂ (PGH₂).

Comprender la importancia de la vía metabólica de las COXs resulta sencillo al conocer los procesos fisiológicos en los cuáles intervienen. Entre éstos se pueden enumerar: el mantenimiento de la mucosa gástrica, la agregación plaquetaria, el balance electrolítico, la respuesta inflamatoria, el mantenimiento del tono vascular, la fiebre o la sensibilidad al dolor. Sin embargo, resulta especialmente clarificador saber cuales son las utilidades de inhibirlas. Sus inhibidores se utilizan como drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINEs), antipiréticas y analgésicas, y algunos de ellos son tan populares como la aspirina, el ibuprofeno o la indometacina.

1.3.2. Características de la expresión de COX-1 y COX-2

Si bien catalizan la misma reacción y, como se desarrollará más adelante, presentan muchas semejanzas estructurales, las COXs difieren enormemente en su expresión y regulación (Kang y col. 2007).

COX-1 se expresa en la mayoría de los tejidos de forma constitutiva y es responsable de funciones homeostáticas tales como: mantenimiento de la mucosa gástrica, el control de la agregación plaquetaria, el balance electrolítico y la circulación renal. Por otro lado, COX-2 es indetectable en condiciones normales en casi todos los tejidos pero su expresión puede aumentar rápidamente ante diferentes desencadenantes como patógenos, óxido nítrico, irradiación, citosinas, factores de crecimiento o promotores tumorales. Por tal motivo ha sido denominada “isoenzima inducible”. Esto es así en la mayoría de

los tejidos, sin embargo, se debe tener en cuenta que COX-2 presenta una expresión basal en cerebro (Yamagata y col. 1993), testículos (Simmons et al., 1991), epitelio traqueal (Walenga y col. 1996) y en la región de la macula densa de los riñones (Harris y col. 1994).

La síntesis aberrante de prostanoïdes debida a una expresión anormal de COX-2 ha sido descrita en diversas patologías tales como inflamación crónica (Zhang y col. 1997), fiebre (Samad y col. 2001), angiogénesis (Leahy y col. 2002) o carcinogénesis (Sinicrope 2006).

De este modo, se plantea que COX-1 y COX-2 tienen distinto tipo de expresión (continua vs. inducida-transitoria) y que la regulación de COX-2 asegura una expresión elevada pero transitoria. Se han descrito numerosos mecanismos a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona que aseguran el control y por consiguiente, una expresión finita de COX-2.

1.3.3. Estructura génica de las ciclooxigenasas

El gen de la COX-1 tiene un tamaño cercano a 22 Kb, se localiza en el cromosoma 9q32 - q33.3 en humanos y está integrado por 10 intrones y 11 exones, su ARN mensajero tiene 2,8 Kb y sus variantes poliadeniladas 4,5 y 5,2 Kb.

Por otro lado, el gen de COX-2 tiene un tamaño de 8 Kb se sitúa en el cromosoma 1q25.2 - q25.3 tanto en ratones como en humanos y está constituido por 9 intrones y 10 exones. El ARN mensajero de COX-2 tiene una extensión

de 4,5 Kb y sus variantes poliadeniladas de 4 y 2,8 (Chandrasekharan y Simmons 2004).

En el año 2002 el grupo del Dr. Daniel Simmons describió la existencia COX-3 como una nueva isoforma en la corteza cerebral canina (Chandrasekharan y col. 2002). En este trabajo se sugiere que por *splicing* alternativo, el gen COX-1 canino genera diferentes variantes de ARN mensajero: COX-3, COX-1 y dos COX-1 parciales denominadas proteínas PCOX-1 (PCOX-1a y PCOX-1b). El ARN mensajero de la COX-3 es idéntico al de COX-1 pero manteniendo el intrón 1; así a nivel de proteína, COX-3 presenta una inserción de 30-34 aminoácidos dentro del péptido señal hidrofóbico. La proteína COX-3 no sería relevante en humanos, ya que el intron 1 humano presenta un nucleótido de diferencia con respecto al canino, que produce un cambio en el marco de lectura, lo que provoca la imposibilidad de dar lugar a una proteína COX-3 catalítica (Kis y col. 2005).

El promotor del gen de COX-1 es un promotor típico de los genes implicados en las funciones de mantenimiento del organismo en condiciones basales. Se caracteriza por la ausencia de caja TATA y caja CAAT (Figura 4), es rico en GC, contiene múltiples sitios de inicio de transcripción y varios sitios SP1 siendo los más importantes el -610 y -111 (Wang y col. 1993; Xu y col. 1997).

El promotor de COX-2 en su región 5' presenta elementos regulatorios de tipo "cis-activantes" entre estos (Figura 4): E-box, elemento de respuesta a

cAMP (CRE), NF K β , AP-1, proteína de unión al enhancer CAAT o elemento de respuesta a receptores activados por Proliferador de Peroxisomas (PPRE). Además, la transcripción de COX-2 está controlada también por metilaciones y acetilaciones (Yue y col. 2011).

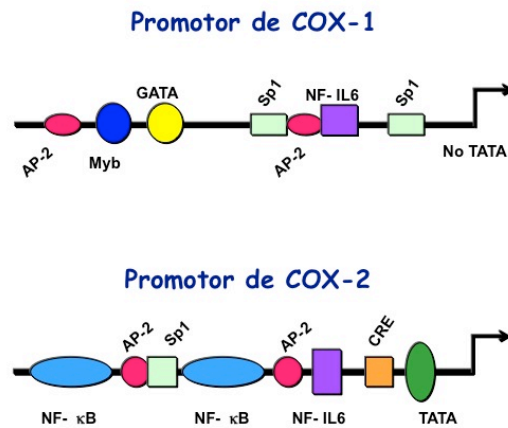


Figura 4. Esquema de los Promotores de COXs. Se puede observar la ausencia de la caja TATA en el promotor de COX-1 presente en el de COX-2.

La vida media del ARN mensajero de COX-2 es muy corta, de aproximadamente 5 horas, comparada con la correspondiente a COX-1 que es mayor de 24 horas (Mbonye y Song 2009). La estabilidad del ARN mensajero de COX-2 está sometida a, por lo menos, dos mecanismos descritos: por un lado a la presencia de Elementos Ricos en Adenina-Uracilo (del inglés AREs) en el extremo 3' de la región UTR que facilitan su degradación y, por otro, a la existencia de dos micro ácido ribonucleico (miARN) que son pequeñas moléculas de ARN de 19 a 22 nucleótidos no codificantes, codificadas en el

genoma celular y que se unen a la región 3'UTR del ARN mensajero de COX-2 y provocan su silenciamiento traslacional o degradación. Se han descrito dos para COX-2 y son: miR-101a y miR-199a.

Otro determinante en la estabilidad de COX-2 es la existencia de una secuencia de 19 aminoácidos (Asn594-Lys612), próxima al extremo C-terminal de la proteína que confiere un sitio extra de glicosilación, ausente en COX-1 (Figura 5). Este punto de glicosilación se suma a los otros tres que también presentes en COX-1 y aumenta la velocidad de degradación por el proteosoma 26s. Cuando se inserta este sitio de 19 aminoácidos en la secuencia de COX-1, ésta se vuelve más sensible a la degradación, mientras que si se muta este dominio en COX-2, se estabiliza la proteína aumentando su vida media (Mbonye y Song 2009; Mbonye y col. 2006). Por otra parte, se ha comprobado que la proteína COX-2 es más susceptible a ser degradada por poliubiquitinación (Rockwell y col. 2000), ya que mediante un inhibidor o disruptor de la degradación por proteosoma se encontró la acumulación de COX-2 y sus formas poliubiquitinadas en las células que no se observó para COX-1.

1.3.4. Estructura proteica de COX-1 y COX-2

Las ciclooxigenasas (COXs) son proteínas homodiméricas de entre 70 y 74 kDa de peso molecular según su estado de glicosilación, que se localizan en el retículo endoplásmico y en la región perinuclear.

Presentan cuatro dominios (Simmons y col. 2004) (Figura 5):

- Dominio péptido señal (Animo terminal) es el responsable de dirigir la proteína a su localización final. En COX-1 tiene una longitud de 22 a 26 aminoácidos con un núcleo altamente hidrofóbico compuesto por cuatro o más leucinas o isoleucinas mientras que en COX-2 tiene 17 aminoácidos y menor hidrofobicidad. La traslocación de COX-1 es más eficiente que la de COX-2.
- Dominio de dimerización (dominio tipo EGF) tiene 50 aminoácidos de longitud y permite la formación de puentes disulfuro, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas. Tres puentes disulfuro mantienen unidos estos segmentos del homodímero y un cuarto puente mantiene la conformación de este segmento al dominio catalítico
- Dominio de unión a membrana (dominio MBD) presenta cuatro hélices anfipáticas que anclan la proteína a la cara luminal de la bicapa lipídica. Este dominio también forma la apertura (boca) del canal hidrofóbico que es el sitio activo con función ciclooxigenasa.
- Dominio catalítico (dominio globular-catalítico-extremo carboxilo terminal) representa el 80% de la proteína, tiene dos sitios catalíticos uno con actividad peroxidasa que tiene coordinación con un grupo hemo y el otro con actividad ciclooxigenasa. Los dos sitios catalíticos están física y funcionalmente separados.

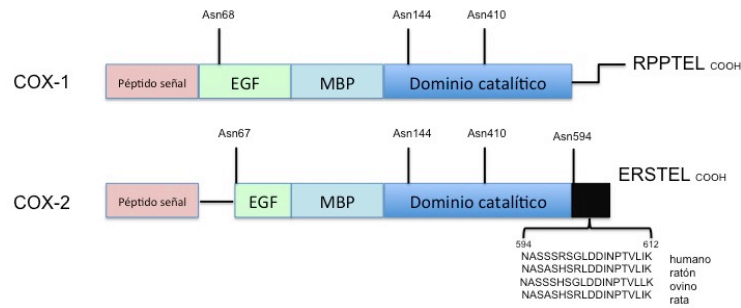


Figura 5. Comparación de los dominios funcionales de COX-1 y COX-2. Se ha asignado un color diferente a cada uno de los dominios comunes entre las dos variantes de COX. Se muestra la secuencia de un motivo del extremo C-terminal de COX-2 (residuos 594-612 de la proteína humana) de varias especies que contiene un sitio de glicosilación que no está presente en COX-1. Adaptado de (Simmons y col. 2004)

Un residuo de arginina (Arg120) del sitio con actividad ciclooxigenasa en COX-1 forma parte del sitio de unión para el sustrato y también para los anti inflamatorios no esteroideos (AINEs), sin embargo este sitio no es esencial en COX-2 (Rieke y col. 1999). Una diferencia crucial entre la estructura de COX-1 y COX-2 es la sustitución de la Ile523 en COX-1 por una valina en COX-2, que provoca una mayor apertura de COX-2 y que la vuelve más accesible a los inhibidores específicos de COX-2 (Kurumbail y col. 1996) (Figura 6).

COX-2 es una enzima menos específica ya que puede reaccionar con los endocannabinoides: araquidoniletanolamida y 2 araquidonilglicerol oxidándolos para dar productos tipo-prostanoides (Kozak y col. 2000). Además, utiliza estos endocannabinoides tan eficientemente como el ácido araquidónico y sus productos pueden ser sustratos de las demás isomerasas.



Figura 6. Esquema representativo del cambio estructural del sitio activo entre COX1 y COX-2. (Extraído de la serie de actualización profesional, J. M. Chaverri, Universidad de Costa Rica, 2004).

Las características enzimáticas de COX-1 y COX-2 son muy similares. Así encontramos que ambas tienen valores de consumo de sustrato por unidad de tiempo por mol de dímero de aproximadamente 3500 (Barnett y col. 1994; Kulmacz y col. 1994), una K_m para ácido araquidónico de 5 μM (Barnett y col. 1994; Laneuville y col. 1994) y para O_2 de 5 μM (Lands y col. 1978). En tal sentido, la mayor parte de los residuos catalíticos están conservados en ambas y sus estructuras son esencialmente superponibles (Smith y col. 1996). Esto concuerda con que COX-1 y COX-2 presentan un 60 % de identidad en su estructura primaria (Kurumbail y col. 1996; Xiao y col. 1998; Yuan y col. 2006).

1.4. Isoformas de PGES

La transformación de PGH_2 en PGE_2 es catalizada por la enzima Prostaglandina E Sintasa (PGES) (EC 5.3.99.3), que presenta tres isoformas:

una isoforma citosólica denominada cPGES y dos isoformas de membrana: mPGES-1 y mPGES-2.

Según la preferencia por PGH₂ de estas enzimas, es posible clasificarlas. Así, mPGES-1 usa PGH₂ procedente de COX-2 mientras que cPGES usa como sustrato PGH₂ producida por COX-1 y, por último, mPGES-2 es capaz utilizar indistintamente PGH₂ proveniente de cualquier COX (Samuelsson y col. 2007).

A nivel subcelular, mPGES-1 se encuentra en la región perinuclear y en el retículo endoplásmico, al igual que COX-2 (Lazarus y col. 2002; Murakami y col. 2003; Murakami y col. 2000).

El hecho de que mPGES-1 y COX-2 están correguladas, colocalicen y que estén metabólicamente emparejadas indica la importancia de la fina regulación de la producción de PGE₂ especialmente en el ajuste de vías conflictivas (Samuelsson y col. 2007).

1.5. Transporte y degradación de las prostaglandinas

Después de ser sintetizadas las prostaglandinas (PGs) difunden a través de la membrana plasmática celular hasta el medio extracelular. Este comportamiento tiene principalmente dos causas: la primera es que las PGs son aniones a pH fisiológico (Schuster 1998). Como el voltaje dentro de la célula es unas 20 veces más negativo que el del exterior, la tendencia es a salir de la célula que las sintetizó. La segunda es consecuencia de que la concentración de PGs dentro de la célula es mayor que fuera por tanto se favorece su salida.

La magnitud de los efectos de las PGs no sólo depende de su síntesis, sino también de su degradación. El tiempo transcurrido hasta que son catabolizadas *in situ* suele ser del orden de segundos a minutos evitándose así que puedan alcanzar la circulación general (Ferreira y Vane 1967; Piper y col. 1970; Samuelsson 1972). El responsable de la captura de las PGs hacia el interior celular para poner fin a la estimulación de los receptores, ha sido identificado y denominado: Transportador de Prostaglandinas (PGT, SLCO2A1) (Kanai y col. 1995). Así, las PGs son re-incorporadas a las células para ser oxidadas e inactivadas por el enzima 15-hidroxi-prostaglandina dehidrogenasa (PGDH), que inhabilita a la PG a unirse a su receptor (Nomura y col. 2004; Schuster 2002).

1.6. Receptores de Prostaglandinas

Estudios bioquímicos han demostrado que las acciones de la mayoría de los prostanoides (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ o prostaciclina y TXA₂ o Tromboxano) están mediadas por receptores de membrana acoplados a proteína G, de siete dominios transmembrana. Cada uno de estos receptores está codificado por un gen diferente y están altamente conservados en mamíferos, incluso las variantes de corte y empalme alternativo que se han descrito para los receptores EP3, FP (PGF_{2α}) y Tp (Tromboxano A) sólo divergen en el extremo C-terminal (Narumiya y FitzGerald 2001; Narumiya y col. 1999). Los

efectos de estos receptores de prostanooides pueden cambiar en función de la concentración y de la estructura del ligando (Narumiya y FitzGerald 2001).

En el caso particular de las Prostaglandinas (PGs) se han identificado al menos ocho receptores: dos receptores para PGD₂ (DP1 y DP2) (Hirai y col. 2001; Monneret y col. 2001), cuatro subtipos de receptores para PGE₂ (EP1, EP2, EP3 y EP4; Figura 7) (Sugimoto y Narumiya 2007), un receptor para PGF_{2α} (FP) y un receptor para PGI₂ (IP) (Narumiya y FitzGerald 2001).

Los receptores IP, DP1, EP2 y EP4 median un aumento de cAMP (Figura 7) y han sido denominados “receptores de tipo relajante”, mientras que el grupo integrado por los receptores TP, FP y EP1 que están asociados a G_q (Figura 7) y activan el metabolismo del fosfatidil inositol e inducen la movilización de calcio, se denominan “receptores de tipo contractor” (Ricciotti y FitzGerald 2011). Las isoformas de TP activan la enzima fosfolipasa y además TP_α estimula la adenilato ciclasa, en tanto que TP_β la inhibe. Además en el caso de FP, puede estar asociado a la proteína Rho unida a proteína G pequeña por vía independiente de G_q.

El receptor DP2 pertenece a un subgrupo diferente y se lo considera miembro del subgrupo de receptores quimioattractantes (Hirai y col. 2001; Monneret y col. 2001). Está asociado a proteína G inhibitoria (G_i) que inhibe la síntesis de cAMP y aumenta la concentración de Ca²⁺ intracelular (Ricciotti y FitzGerald 2011).

El receptor EP3 (Figura 7), antiguamente denominado “receptor inhibitorio” puede unirse a proteína G_i o a proteína G_{12} disminuyendo los niveles intracelulares de cAMP, aumentando la concentración de Ca^{2+} y activando la proteína Rho asociada a una familia de proteínas G pequeñas (Hatae y col. 2002; Narumiya y FitzGerald 2001; Ricciotti y FitzGerald 2011).

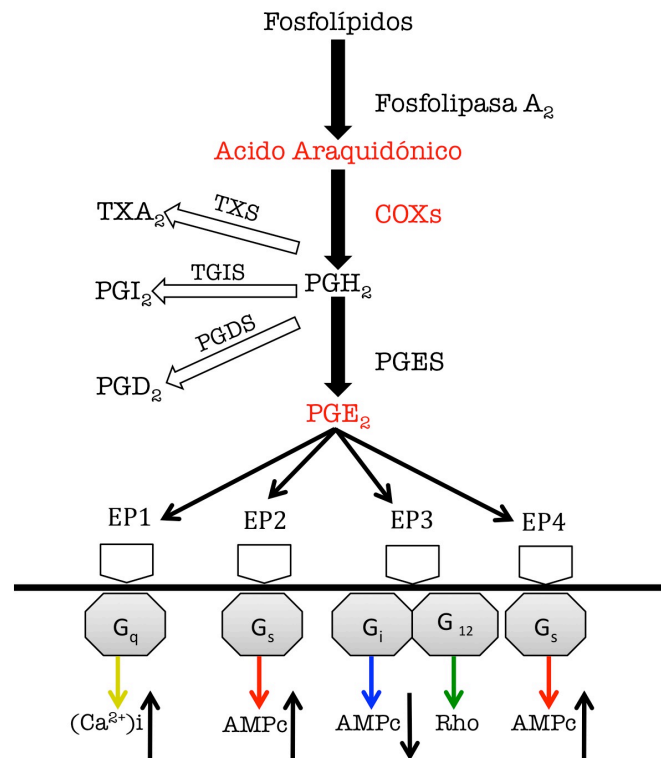


Figura 7. Esquema sintético del metabolismo de PGE₂. Se indican los cuatro subtipos de receptores para PGE₂ (pentágonos), las proteínas G a las que están asociados (hexágonos grises) y la señal intracelular que disparan.

2. COX-2 en la fisiología cardíaca

El infarto agudo de miocardio (IAM) es una causa importante de muerte en países desarrollados (Figura 8, OMS) y es debido mayoritariamente a la oclusión aguda de arterias coronarias provocada por trombos. El mecanismo patofisiológico del IAM es el daño ocasionado durante la isquemia y la reperfusión (I-R). Durante la isquemia, hay una profunda caída en el ratio ATP/ADP y un incremento en la concentración de fosfato inorgánico que estimulan la síntesis de ATP a través de la glucólisis causando un aumento del ácido láctico y por consiguiente, una caída del pH intracelular. Esto activa el anti transportador Na^+/H^+ cargando a la célula con Na^+ que no puede ser bombeado por la Na^+/K^+ ATPasa porque los niveles de ATP son bajos. Esto provoca que el anti-transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cargue las células con Ca^{2+} incluyendo las mitocondrias. En la reperfusión, cuando se renueva el flujo sanguíneo, el oxígeno suministrado junto con una disminuida actividad en la cadena respiratoria, provocan la formación de especies reactivas del oxígeno que llevan a la muerte celular. Podemos finalmente decir que la principal consecuencia en la isquemia de miocardio es la crisis energética, mientras que en la reperfusión el acontecimiento más relevante y perjudicial es la producción de especies reactivas del oxígeno llevando a la muerte celular por apoptosis o necrosis (Gottlieb 2011).

Durante los episodios de I-R, ha sido descrita la síntesis de mediadores celulares tales como óxido nítrico, adenosina, endotelina y COX-2 (Schorr y col. 1998; Xiao y col. 2004).

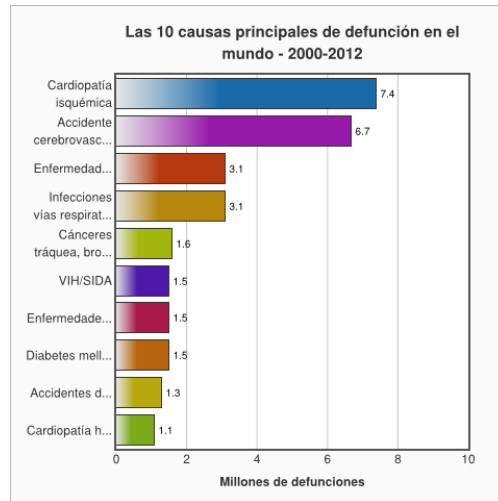


Figura 8. Principales causas de muerte entre 2000 y 2012. Datos oficiales de la ONU (<http://www.who.int/>)

La función de COX-2, en el sistema circulatorio está sujeta a un debate complejo. A nivel vascular, se ha encontrado una expresión aumentada de COX-2 en placas ateroscleróticas en casi todos los estadios y tipos celulares en humanos. Además, la expresión de COX-2 acelera la ruptura de la placa aterosclerótica (Baker y col. 1999; Egan y col. 2005; Schonbeck y col. 1999). También ha sido descrito que la Prostaciclina o PGI₂, tiene un efecto atero-protector en hembras de ratón a través del receptor de estrógenos (Egan y col. 2004).

En cuanto a la expresión de COX-2 en corazón, se ha determinado que no se expresa en el miocardio sano y que su expresión es inducida en respuesta a situaciones de estrés o agresión tales como la isquemia (Abbate y col. 2006). Tampoco se encuentra en cardiomiocitos fetales (Goren y col. 2004). Sin embargo, su expresión está presente en cardiomioblastos neonatales donde junto a COX-1 median el cierre del ductus arteriosus, vaso que transporta la sangre oxigenada de la placenta al feto, un proceso de vital importancia después del nacimiento (Yu y Funk 2007). Por tanto, la expresión de COX-2 está limitada a estados de desdiferenciación y de estrés.

Un estudio pionero sobre el efecto de la deficiencia de las ciclooxigenasas en episodios de isquemia-reperfusión fue el realizado por Camitta y col. en el año 2001 (Camitta y col. 2001), donde, mediante la utilización de ratones deficientes en COX-1 (COX-1^{-/-}) o COX-2 (COX-2^{-/-}) y ratones silvestres (WT), tratados a distintos tiempos con indometacina (Indo) con el fin de conseguir una inhibición química de las COXs. Los autores concluyeron que tanto la manipulación génica como la química de larga duración (dos días) aumentaban el daño causado por isquemia-reperfusión. Sin embargo, en la perfusión de corta duración de ratones WT con Indo durante 40 minutos no se observó daño y la recuperación de la función cardíaca fue casi completa (Figura 9).

Basados en la observación de que el tratamiento en ratones silvestres con Indo durante 40 minutos antes de la isquemia y mantenido durante la fase de

reperusión no causaba un efecto perjudicial en la recuperación de la capacidad cardíaca, mientras que la inhibición crónica si lo hacía, los autores plantean que la protección no está mediada por la generación de metabolitos de las COXs durante la isquemia o la reperusión y que tampoco está mediada por la presencia de metabolitos de vida media corta en el comienzo de la isquemia [Figura 9, (Camitta y col. 2001)].

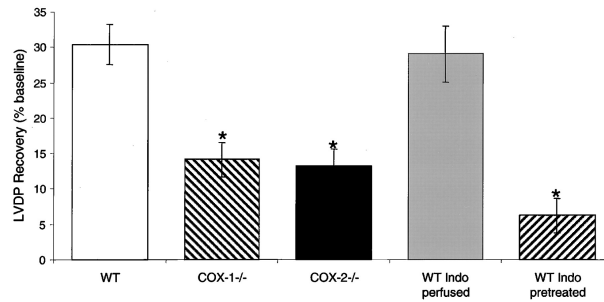


Figura 9. Porcentaje de recuperación de la presión en el ventrículo izquierdo con respecto a los valores basales previos a la isquemia. WT y WT con tratamiento de 40 minutos (WT Indo perfused) con inhibidores de COXs presentan mejores valores de recuperación. La inhibición genética o química de larga duración (WT Indo pretreated) impide la recuperación de forma significativa (Camitta y col. 2001).

Resulta interesante el estudio de Saito y col. en ratas sometidas a ligación de la arteria coronaria izquierda (LACI) (Saito y col. 2004), donde se describe que tanto en infarto de miocardio (IM) como el fallo cardíaco congestivo (FCC), la inhibición de COX-2 mejora la función cardíaca (Figura 10). En este trabajo se compara el efecto de la aplicación de un inhibidor selectivo de COX-2, el 5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metil-sulfonil)fenil-2(5H)-furanona (DFU) y el efecto del tratamiento con aspirina en dosis baja (1 mg/Kg/día) y en

dosis alta (25 mg/Kg/día) con respecto al grupo control (que fue sometido a la misma intervención quirúrgica pero sin ligación) y al grupo vehículo (sometido a la cirugía completa y tratamiento con aplicaciones de una solución vehículo de nitrocelulosa) (Figura 10). El tiempo de tratamiento fue de 3 meses. Los autores concluyen que la inhibición selectiva de COX-2 mejora de manera significativa la función cardíaca y reduce el tamaño de la zona infartada en un modelo de IM y FCC (Saito y col. 2004).

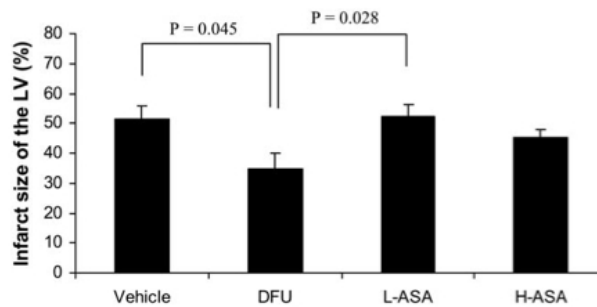


Figura 10. Valoración del área infartada después de un tratamiento de I-R. El tratamiento con el inhibidor específico de COX-2, DFU, significativamente reduce el tamaño del área infartada. No se encuentran diferencias entre los tratamiento con aspirina de baja (L-ASA) o de alta (H-ASA) dosis y el grupo sin inhibidor (Saito y col. 2004).

En concordancia con estos resultados, donde la expresión de COX-2 parece ser perjudicial en la fisiopatología cardíaca, se encuentran los trabajos del grupo del Dr A. Abbate (Abbate y col. 2007; Abbate y col. 2004; Straino y col. 2007). En el año 2004, este autor publicó un trabajo en el que evaluó la expresión de COX-2 mediante inmunotinción específica en 23 muestras humanas de miocardio de pacientes que murieron entre 10 y 60 días después de

un infarto de miocardio (Abbate y col. 2004). Encontraron que cerca de un 40% de los casos presenta tinción positiva para COX-2 en infarto de miocardio agudo, y que esta expresión se asocia a una alta tasa de apoptosis (Figura 11). Posteriormente este grupo, ha descrito que el uso del inhibidor selectivo de COX-2, Parecoxib, reduce significativamente la pérdida de cardiomiocitos por apoptosis en infarto agudo de miocardio en ratones y ratas (Straino y col. 2007) y que mejora la función del corazón en el fallo cardíaco crónico en ratas (Abbate y col. 2007) (Figura 12).

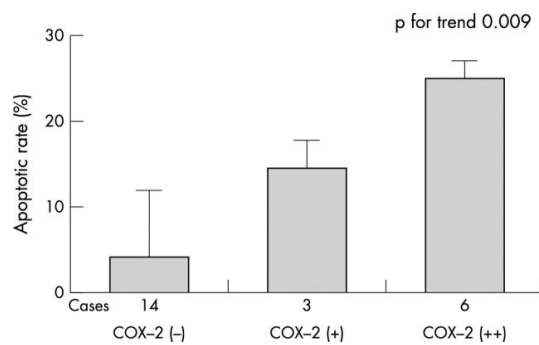


Figura 11. Relación entre la expresión de COX-2 en muestras humanas de infarto de miocardio y porcentaje de apoptosis (Abbate y col. 2004).

Por otro lado, los trabajos de la Dra. M. C. LaPointe y sus colaboradores han abarcado el estudio de COX-2 en el tejido cardiovascular desde diferentes aspectos. En un estudio realizado en cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares neonatales (CVN) de rata han encontrado que PGE₂ tiene efecto hipertrófico sobre cardiomiocitos y que en éstos co-localizan COX-2 y mPGES-1 perinuclearmente (Mendez y LaPointe 2002).

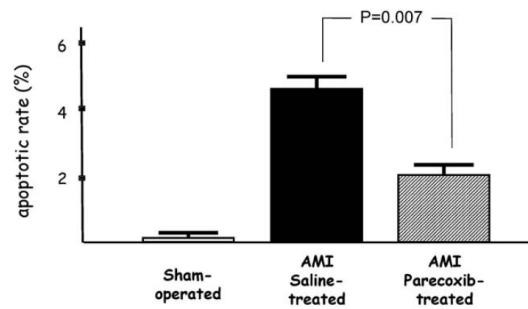


Figura 12. Porcentaje de apoptosis después de un infarto agudo de miocardio (en inglés AMI) en ratas sin tratamiento (Sham- operated), tratadas con solución salina (AMI Saline-treated) o tratadas con el inhibidor de COX-2, Parecoxib (AMI Parecoxib-treated) (Abbate y col. 2007).

En el año 2004, este grupo publicó un estudio en ratones sometidos a ligación de la arteria coronaria descendiente anterior izquierda, seguido por una recuperación de 48 hs y finalmente tratados con el inhibidor selectivo de COX-2, NS-398, durante dos semanas (LaPointe y col. 2004). De acuerdo a los resultados obtenidos, los autores concluyen que COX-2 juega un rol dañino en el corazón después de un infarto de miocardio causado por una oclusión crónica de la arteria coronaria. Así, el infarto induce la expresión de COX-2, que aumenta la concentración de PGE₂, el contenido de colágeno y la hipertrofia cardíaca disminuyendo la función cardíaca (Figuras 13 y 14). La inhibición selectiva de COX-2 revertía estos efectos (LaPointe y col. 2004). Un estudio posterior llevado a cabo por el mismo grupo en cardiomiocitos de ratones deficientes en el receptor EP4 de PGE₂, mostró que estos ratones no presentan diferencias de parámetros ecocardiográficos con respecto al grupo control. Sin embargo, cuando son sometidos a ligación coronaria, no presentan diferencias

en el tamaño del infarto, tras la repetición de la ecocardiografía dos semanas más tarde, pero muestran una reducida remodelación y función cardíaca. También se ha descrito un aumento en la expresión de STAT3 en los ratones control que se relaciona con la protección en daño isquémico pero no en los deficientes para EP4 (Qian y col. 2008).

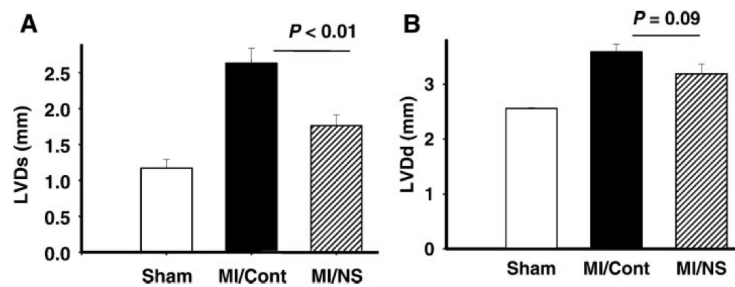


Figura 13. Gráficas del volumen del ventrículo izquierdo, en sístole (LVDs) y en diástole (LVDd) después de un infarto de miocardio en grupo control (MI/Cont) y en grupo con tratamiento inhibidor de COX-2 (MI/NS). El grupo “Sham” muestra los valores debidos al procedimiento quirúrgico sin la ligación. El IM aumenta los valores de LV y el tratamiento de inhibición los reduce significativamente en LVDs (LaPointe y col. 2004).

Entre muchos otros trabajos de este grupo, he considerado relevante comentar que en un modelo animal deficiente de mPGES-1 han referido una disminución en la función cardíaca seguida a una infusión de Angiotensina II (Harding y col. 2011), y estudiando los fibroblastos cardíacos, han descrito que PGE₂ ejerce una acción estimuladora de su crecimiento y de la matriz extracelular que llevaría a una disminución de la capacidad de contracción mediada por los receptores EP1 y EP3 (Harding y LaPointe 2011).

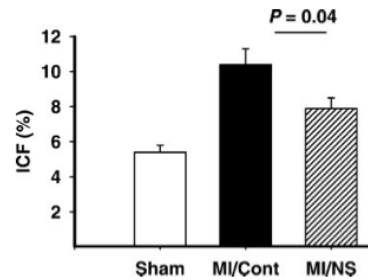


Figura 14. Porcentaje del colágeno depositado en el área infartada. Se observa un menor contenido de colágeno en el grupo que recibió un tratamiento inhibitorio de COX-2 (LaPointe y col. 2004).

Los trabajos del Dr. Roberto Bolli han transformado la cardiobiología, en especial la observación de que el miocardio tiene “memoria relacionada a la isquemia” (Bolli 2007), este fenómeno denominado “Precondicionamiento Isquémico” (PCI) fue descrito por primera vez en el año 1986 por Charles Murry (Murry y col. 1986). El PCI consiste en que cortos y moderados episodios de isquemia confieren al miocardio una mayor resistencia ante episodios de isquemia de mayor intensidad. Es un mecanismo de protección endógeno que consta de dos fases: una temprana que transcurre muy rápidamente, en los primeros minutos desde el estímulo y no se prolonga más de 1 ó 2 horas, y una tardía que se desarrolla lentamente, requiere de 6 a 12 horas extendiéndose hasta 3 ó 4 días.

Dentro de los estímulos que desencadenan la fase tardía del PCI se encuentran: el óxido nítrico, las especies reactivas del oxígeno, los agonistas opioides y la adenosina (Bolli 2007). Estos agentes causan la activación en cascada de un complejo mecanismo que incluye protein kinasa C (PKC),

Src/Lck tirosina quinasas, quinasas 1 y 2 activadoras de Janus (JACK 1 /2), que activan factores de transcripción tales como NF-KB, STAT1 y STAT3 que finalmente conducen a la activación de genes con efectos cardioprotectores como oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), COX-2 y superoxido dismutasa (SOD).

iNOS fue el primer intermediario descrito en PCI. Dentro de los mediadores inducidos por iNOS para aumentar la resistencia celular después de un episodio de isquemia-reperfusion se incluyen: la inhibición del ingreso celular de calcio, antagonismo a la estimulación β adrenérgica, reducción de la demanda de oxígeno miocárdica, apertura de los canales sarcolémicos o mitocondriales de ATP sensibles a potasio, acción antioxidante, activación de la síntesis de COX-2 y su consecuente producción de prostanoïdes cardioprotectores. En ausencia de iNOS, la fase tardía de preconditionamiento isquémico no se produce (Guo y col. 1999).

Un estudio puntero publicado por el grupo del Dr. Roberto Bolli en 2003 ha facilitado la comprensión global del proceso de preconditionamiento isquémico. En éste se utiliza la terapia génica con iNOS (oxido nítrico sintasa inducible) en ratones para estudiar los efectos de esta enzima en los daños provocados por la isquemia (Li y col. 2003). La fase experimental consistía en inyectar en la pared ventricular izquierda del miocardio, el vector adenoviral 5 (Ad5) al que previamente se le habían eliminado las regiones E1, E2a y E3 volviéndolo más seguro por su reducido potencial transformante de células y

que contenía la secuencia de iNOS. Para el estudio se dividieron los animales en cinco grupos: un grupo 1 o control de cirugía que fue operado aunque no se le realizó la oclusión coronaria con posterior reperfusión; un grupo 2 que fue tratado 30 minutos antes de la cirugía de oclusión-reperfusión con seis ciclos de 4 minutos de isquemia, seguidos de 4 minutos de reperfusión, para provocarles preconditionamiento isquémico (PCI). Los grupos 3, 4 y 5 fueron inyectados tres días antes de la cirugía de oclusión-reperfusión con las siguientes soluciones: grupo 3, solución vehículo; grupo 4 solución con virus indicador (Ad5/LacZ); y grupo 5 solución con Ad5-iNOS. Para completar el estudio, los grupos 6 y 7 recibieron la inyección con virus indicador o con AD5-iNOS tres días antes de la oclusión-reperfusión y 30 minutos antes de la oclusión se les suministró vía intraperitoneal el inhibidor selectivo de COX-2 NS-398 a razón de 5 mg/kg para analizar la función de COX-2. Los resultados se grafican en función del porcentaje del tamaño de la lesión isquémica respecto al área de riesgo (Figura 15).

Los autores concluyen que iNOS es suficiente para iniciar el PCI y que lo consigue mediante la estimulación de la síntesis de COX-2, ya que el daño en el miocardio posterior al tratamiento de inhibición tiene prácticamente la misma magnitud que para el grupo AD5-Lacz.

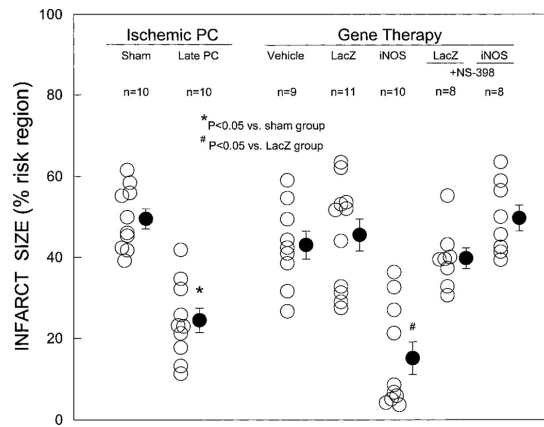


Figura 15. Tamaño del infarto en tratamiento con preconditionamiento isquémico (PCI) y en terapia génica con iNOS. El resultado obtenido en terapia génica es similar al conseguido mediante PCI y es revertido mediante tratamiento de inhibición selectivo de COX-2 (Li y col. 2003).

Avanzando en este sentido de pensamiento en donde COX-2 podría mediar una función protectora del miocardio, un estudio de Xiao y col. revelan que PGE₂ confiere protección a la isquemia mediante su receptor específico EP4 (Xiao y col. 2004). Para este trabajo se compararon dos sistemas de simulación de infarto: uno *in vivo* con cirugía cardiovascular de oclusión-reperusión y otro *in vitro* mediante el método de Langerdoff en el cual el corazón es canulado y perfundido con distintas soluciones. Este sistema es independiente de los efectos de la circulación sanguínea. Los autores estudiaron la función de EP4 en un modelo de ratón transgénico deficiente para tal subtipo de receptor (EP4^{-/-}) comparado con ratones no transgénicos y mediante tratamiento con el agonista de EP4, 4819-CD (Figura 16).

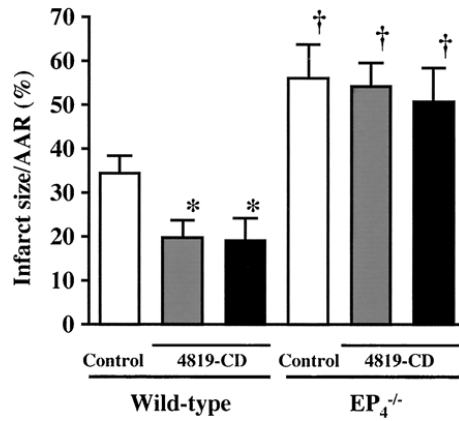


Figura 16. Tamaño del infarto tras el tratamiento con agonistas específicos de EP4 en ratones WT y ratones deficientes en EP4 ^{-/-}. Con la aplicación del agonista de EP4 en el grupo WT se observa una disminución significativa el área infartada. El grupo EP4 ^{-/-} presenta un área dañada significativamente mayor que el grupo WT (Xiao y col. 2004).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que hay un importante aumento del daño producido por la isquemia en los ratones que no expresan EP4 tanto *in vivo* como *in vitro* (Xiao y col. 2004). Asimismo la aplicación exógena de un agonista de EP4 muestra una potente acción protectora del miocardio.

De acuerdo con lo expuesto en esta sección sobre los efectos beneficiosos de COX-2 en la respuesta al infarto de miocardio (IM), resulta valioso comentar el trabajo de Timmers y col. en el que utilizan como modelo experimental el cerdo, que posee muchas similitudes cardiovasculares con los humanos (Timmers y col. 2007). Los autores investigaron los efectos de la inhibición selectiva de COX-2 durante seis semanas posteriores a un IAM. Dicha inhibición provocaba un debilitamiento de la pared del miocardio y por tanto un

ventrículo izquierdo dilatado, originado en la pronunciada disminución en el espesor de la pared debido a que la densidad del colágeno del miocardio era menor en el área infartada de los animales que recibieron el tratamiento (Figura 17). Encontraron, además, que la función sistólica estaba severamente dañada en este grupo. Estos descubrimientos correlacionaron muy bien con la alta tasa de mortalidad de este grupo causada por la rotura del ventrículo izquierdo y por fallo cardíaco congestivo.

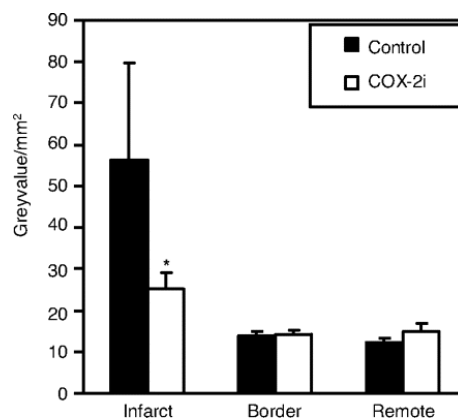


Figura 17. Depósito de colágeno en el área infartada posterior a I-R. Se observa una disminución significativa en el depósito de colágeno de la zona infartada (Infarct) con el tratamiento con el inhibidor para COX-2 (Timmers y col. 2007).

3. Antecedentes de la expresión constitutiva de COX-2 en corazón

Entre los numerosos estudios existentes sobre el papel de la enzima COX-2 en el plano cardiovascular y de los prostanoides por ésta sintetizados,

faltaba uno básico y fundamental, la expresión constitutiva de ésta proteína en corazón.

Por ello, nuestro grupo generó un modelo en ratón donde la expresión de la enzima humana ciclooxigenasa-2 (hCOX-2) estaba controlada por el promotor de la cadena pesada de la α -miosina de corazón [B6D2-Tg(MHC-PTGS2) UPME] (Inserte y col. 2009). Brevemente, el vector pBluescript II KS (+) conteniendo la secuencia del promotor α -MyHC de ratón (clon 26, cedido por Dr. J. Robbins, Children`s Hospital, Cincinnati, OH) y la secuencia con el marco abierto de lectura de hCOX-2 incluyendo la región 5'UTR, fueron clonados en el promotor α -MyHC en vector pBS II el cual tenía además la secuencia poliA de la hormona de crecimiento humana. El fragmento linealizado y purificado del plásmido recombinante fue microinyectado en el pronúcleo de un embrión monocelular de ratón (C57BL/6J x DBA2 F1, Charles River, Wilmintong, MA) y transferido al oviducto de una hembra pseudo-gestante CD1.

Se generaron 7 líneas F0 (3 machos y 4 hembras) con una eficiencia de transfección del 27,4 %. Un macho con 3 copias integradas del transgen fue seleccionado para el estudio.

Se comprobó la expresión estable y la funcionalidad de la misma. La expresión y su especificidad cardíaca fue confirmada por western blot y por RT-PCR. La actividad de hCOX-2 fue analizada midiendo los niveles de prostaglandinas en el miocardio. Se observó un aumento de 8 veces en los

niveles de PGE₂ y de 2 veces en los niveles de PGI₂. No se observaron diferencias en los niveles de PGF_{2α} y TXA₂ entre silvestres (WT) y transgénicos (TG). El tratamiento con DFU, un inhibidor selectivo de COX-2, revertía completamente los niveles de PGI₂ y reducía en un 67 % los niveles de PGE₂. Los animales TG no presentaban diferencias en el ratio entre el peso del corazón vs. el peso del cuerpo, ni cambios histológicos en corazón, endotelio o músculo liso cuando fueron analizados con tinción PECAM y para α-actina. El análisis ecocardiográfico no reveló diferencias significativas en las dimensiones del ventrículo izquierdo ni en su función.

Mediante el empleo del sistema de Langerdoff se sometieron corazones de ratones silvestres (WT) y de ratones transgénicos (TG-hCOX-2) a una isquemia global de 40 minutos y posterior reperusión durante 60 minutos. Un tercer grupo para el análisis estaba constituido por ratones transgénicos con tratamiento de inhibición selectiva de COX-2 durante 3 días previos con una última administración 40 minutos antes de inducir la isquemia-reperusión (TG + DFU). Para completar la información, ratones WT y TG-hCOX-2 fueron tratados para inducirles preconditionamiento isquémico con dos ciclos de 5 minutos de isquemia y 5 minutos de reperusión.

Durante la fase de isquemia, producida por el cese total de flujo, se observó la falta de actividad contráctil y también el desarrollo de una contractura isquémica que afectó por igual a todos los grupos en estudio. No obstante, durante la fase de reperusión el grupo de corazones transgénicos con

sobreexpresión de COX-2 humana (TG-hCOX-2), mejoró su función contráctil y redujo el estado de hipercontracción a diferencia del resto. Además, como se describió, la liberación de la enzima LDH, que clínicamente representa lisis celular, fue significativamente menor en este grupo al igual que el tamaño del infarto producido (Figura 18). Se encontró además, una relación directa entre la concentración de PGE₂ y la menor liberación de LDH (Figura 19).

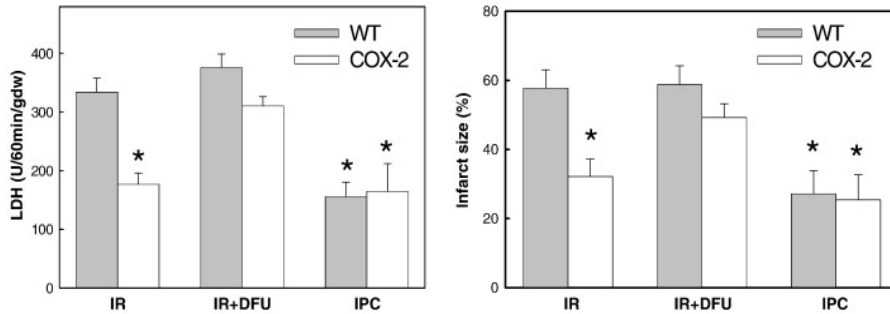


Figura 18. Liberación de LDH y porcentaje de área infartada tras el tratamiento de IR, IR con inhibición selectiva de COX-2 (IR+DFU) y PCI (IPC). El grupo TG mostró valores similares de LDH y área infartada a los obtenidos con los grupos con preconditionamiento isquémico (PCI) (Inserte y col. 2009).

En el grupo TG-hCOX-2 tratado con DFU se observó un aumento del nivel de LDH hasta los valores observados en el grupo WT y además que se revertía la cardioprotección conseguida en el grupo TG-hCOX-2 (Figura 18). Es importante destacar que los grupos WT y TG-COX-2 con tratamiento de preconditionamiento isquémico presentaban el mismo nivel de protección que el grupo TG-hCOX-2 (Figura 18).

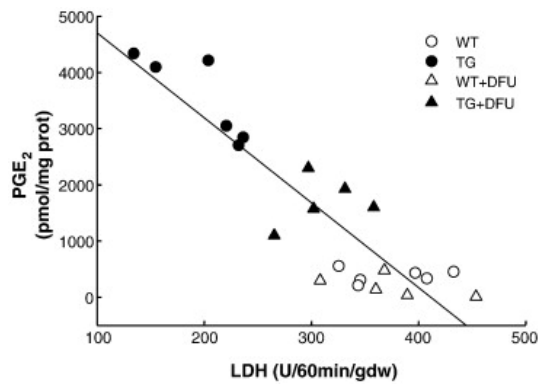


Figura 19. Relación entre los niveles de PGE₂ y la liberación de LDH. Se observa una clara relación entre el aumento en los valores de PGE₂ y la disminución de la liberación de LDH. Extraído de (Inserte y col. 2009).

Los autores concluían en este trabajo que la expresión constitutiva de hCOX-2 en cardiomiocitos confería un estado de cardioprotección permanente contra los daños producidos en la reperfusión (Inserte y col. 2009).

4. La función mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que llevan a cabo numerosas funciones vitales en las células eucariotas, están involucradas en el metabolismo energético, en la síntesis bioquímica, en la señalización intracelular de calcio, en la regulación redox y en la apoptosis (Lodish 2005).

Presentan forma alargada u oval, su tamaño es de 0,5 a 1 μm por aproximadamente 2 μm de longitud. Están formadas por dos membranas altamente especializadas, la externa que es lisa y la interna que está muy plegada (Figura 20). Cada pliegue de la membrana mitocondrial interna se

denomina cresta y tiene por finalidad aumentar la superficie de dicha membrana. El espacio delimitado por la membrana interna es la matriz mitocondrial (Figura 20).

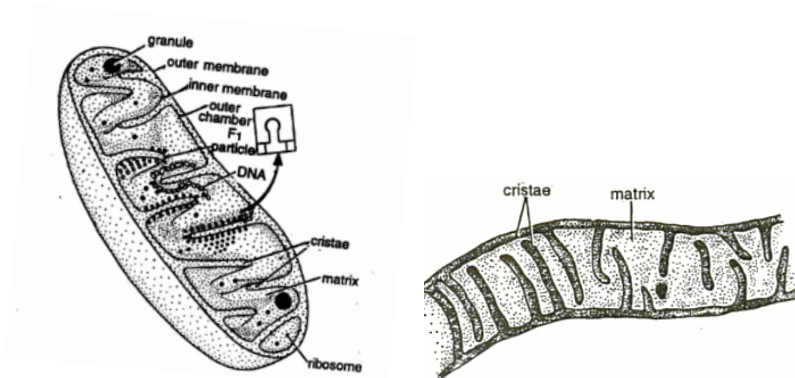


Figura 20. Representación esquemática de la mitocondria. Se distingue la membrana externa (lisa) y la membrana interna (con las crestas mitocondriales). El espacio contenido dentro de la membrana interna es la matriz mitocondrial.

En la membrana mitocondrial interna tiene lugar el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa cuyo principal resultado es la síntesis de ATP (Figura 21). En estos procesos intervienen los siguientes complejos multi-subunidades:

- Complejo I o NADH ubiquinona reductasa
- Complejo II o Succinato deshidrogenasa
- Complejo III o Ubiquinol Citocromo c reductasa
- Complejo IV o Citocromo c Oxidasa
- Complejo V o ATP sintasa

En el transporte de electrones, se transfieren los equivalentes de reducción NADH y FADH obtenidos en la glucólisis, en la oxidación de ácidos grasos, de piruvato, de aminoácidos y en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs, hasta el oxígeno molecular (Figura 21). Los electrones son transportados desde un complejo a otro por difusión de la Coenzima Q en la membrana y por el citocromo c en el espacio intermembrana. Este transporte está acoplado al bombeo de protones en los complejos I, III y IV desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana [Figura 21, (Lodish 2005)]. La fuerza protón motriz así contenida a través de la membrana mitocondrial interna, proporciona el mecanismo para la fosforilación oxidativa (abreviado en inglés OxPhos), ya que en la ATP sintasa o complejo V tiene lugar la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico utilizando la energía liberada por el paso de protones a favor del gradiente de concentración.

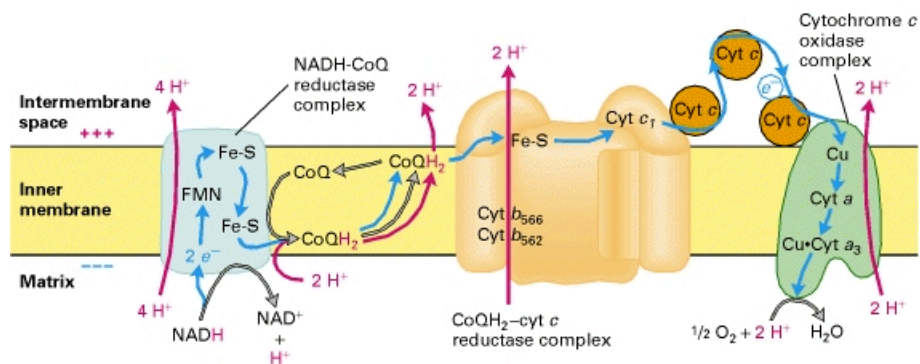


Figura 21. Los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Los complejos enzimáticos están localizados en la membrana mitocondrial interna y en el interior de la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas que participan en las vías de oxidación del piruvato, ácidos grasos y el ciclo de Krebs (Lodish 2008).

En nuestro trabajo a sido importante estudiar la función del Complejo IV (CIV) o citocromo c oxidasa. CIV es la enzima terminal de la cadena mitocondrial de transporte de electrones y cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo c reducido al oxígeno molecular. En mamíferos, esta enzima está compuesta de 13 subunidades que son codificadas por el ADN mitocondrial y por el ADN nuclear. El ADN mitocondrial codifica para tres subunidades: sub I, II y III que son el centro catalítico de la enzima. Las diez subunidades restantes (en mamíferos: IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc y VIII) están codificadas por el ADN nuclear, son sintetizadas en el citosol y finalmente importadas dentro de la mitocondria. Durante la catálisis, el citocromo c reducido se une a la sub II de la citocromo c oxidasa y transfiere electrones al sitio CuA, que es reducido y transfiere los electrones al grupo hemo a y al grupo hemo a₃ del sitio CuB del centro de reacción binuclear, ambos asociados con la subunidad I, donde son utilizados para reducir el oxígeno molecular a agua. De este modo, las subunidades I y II por si mismas llevan adelante el ciclo redox completo de la citocromo c oxidasa (Galati y col. 2009).

Con respecto a la membrana mitocondrial externa, es importante mencionar que en ella se encuentra la proteína VDAC (del inglés Voltage Dependent Anion Channel) o Porina, que forma poros o canales acuosos no específicos y permite la libre difusión de moléculas de hasta 5.000 Da de peso molecular (Colombini 1980).

El número de mitocondrias en cada tejido depende de la actividad del mismo. En el corazón las mitocondrias son especialmente abundantes y constituyen un 20 - 40 % del volumen celular (Marin-Garcia y col. 2001).

El daño miocárdico por isquemia-reperfusión es una causa importante de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Hasta la fecha, el único tratamiento de la isquemia es el restablecimiento del flujo sanguíneo, pero esto puede agravar el daño miocárdico (Mosca 2011). Así, la isquemia resulta en una insuficiente disponibilidad de oxígeno para la función mitocondrial que lleva rápidamente a la interrupción de la síntesis de ATP aeróbico. Cuando la isquemia es prolongada, tiene lugar la permeabilización de la membrana mitocondrial y se produce la muerte celular, principalmente por dos procesos: necrosis y apoptosis, ambos regulados a nivel mitocondrial. Por ello, las mitocondrias se han convertido en objeto de creciente interés en los procesos de isquemia-reperfusión.

Objetivos

En un estudio previo de nuestro laboratorio (Inserte et al 2009) fue descrito que animales con expresión constitutiva de hCOX-2 estaban protegidos frente a episodios de isquemia y reperfusión. En éste trabajo se profundizará el estudio de este efecto buscando contestar los siguientes objetivos:

I- Encontrar la diana celular responsable de la protección mediada por hCOX-2

II- Caracterizar los factores que median dicha protección

III- Obtener un modelo en una línea de cultivo celular de expresión estable de hCOX-2 que permita el estudio profundizar el estudio.

Metodología

1. Reactivos

Los reactivos utilizados en el desarrollo de este trabajo han sido suministrados por Bio-Rad (CA, USA), Invitrogen (Life Technologies Corporation, CA, USA), Lonza (Valais, SWZ), Panreac (BCN, ES), Scharlau (BCN,ES), Sigma (MO, USA), Abcam (Cam, UK), Roche (BSL, SWZ), Proteintech (CHI, USA) y Takara Bio (Otsu, JPN).

El inhibidor selectivo de COX-2, DFU (5,5- dimetil-3(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil)fenil-2(5H)-furanona, fue cedido por Merk (Rahway, New York, USA).

Los niveles de PGE₂ se midieron usando el kit para tal fin de Arbor Assays (Ann Arbor, MI, USA).

2. Plásmidos

Usando como molde el plásmido pCDNA1 hCOX-2 full-length cedido por Dr. S. Prescott (Jones y col. 1993) se amplificó por PCR el fragmento que corresponde a la secuencia de 1800 pb de la región codificante del gen hCOX-2.

Para la amplificación se utilizaron 10 ng de ADN molde, 200 μM de dNTPs, 0,2 μM de oligonucleótidos directo y reverso, 2,5 U de DNA polimerasa Pfu Turbo (Stratagene) en 50 μl de volumen final conteniendo tampón de reacción 1X con una concentración final de Mg²⁺ 2 mM. El

programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60 °C y 90 segundos a 72 °C, finalizando con un ciclo de 10 minutos a 72°C. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se diseñaron mediante el programa Primer Express V2.0 (Life technologies) y fueron: hCOX-2 directo: 5'-gcggccCTCGAGatgetcgcccgcgcctg-3' y hCOX-2 reverso 5'-ctgcgcGCGGCCGCctacagttcagtcgaacg-3', ambos oligos incluían los sitios de corte para las enzimas de restricción que se usarían para la clonación en el vector final.

Los dos fragmentos obtenidos fueron tratados con dATP durante 15 minutos a 70 °C e insertados en el vector pGEMT-easy (Promega) para construir el vector denominado hCOX-2pGEMT-easy. La construcción se verificó por secuenciación y se utilizó como ADN molde para la construcción de los plásmidos de expresión de hCOX-2.

A partir del vector hCOX-2pGEMT-easy se construyó el plásmido CAGIP-hCOX-2 mediante corte con enzimas de restricción XhoI y NotI e inserción del fragmento.

El vector usado para la clonación y expresión en células fue pPyCAGIP amablemente cedido por Ian Chambers y Morgan Robertson (Chambers y col. 2003) (Figura 22), en el cual el gen insertado queda bajo la expresión del promotor CAG que contiene la secuencia enhancer CMV y la secuencia del promotor de β -Actina.

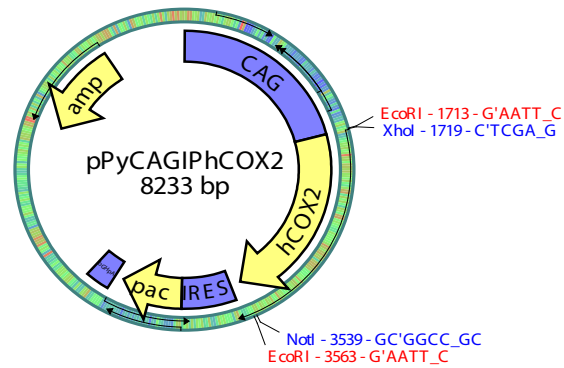


Figura 22. Vector de expresión en células de cultivo conteniendo la secuencia hCOX-2. El vector utilizado como control carecía de la secuencia hCOX-2.

En un experimento de este trabajo fue necesaria la clonación de hCOX-2 en marco de lectura con GFP. Aunque ésta clonación fue realizada por Belén Molla poco antes de mi llegada al laboratorio resumiré brevemente el procedimiento para facilitar la comprensión. Se amplificó por reacción de PCR la secuencia de hCOX-2 a partir del plásmido cedido por el Dr. S Prescott incluyendo en los extremos sitios de corte para los enzimas de restricción XhoI y EcoRI. A continuación el producto obtenido fue clonado en el plásmido pEGFP-N1. De este modo la secuencia hCOX-2 está en pauta de lectura con la secuencia de GFP creando una proteína de fusión C terminal hCOX-2EGFP. Posteriormente se digirió este plásmido con los enzimas XhoI y NotI para liberar el inserto que fue finalmente clonado en el vector pyCAGIP.

3. Transformación de bacterias competentes y obtención de plásmidos

Las construcciones se transformaron en bacterias DH5 α competentes por electroporación a 1.700 eV y se crecieron en placas LB con los antibióticos correspondientes para seleccionar su crecimiento. Los plásmidos se obtuvieron mediante sistemas de purificación de Rapid Plasmid Miniprep (Marligen) y PureLink™ Hipure Plasmid Filter Maxiprep (Invitrogen). Brevemente, un lisado de bacterias se aplica a columnas con membrana de sílica en las que el DNA plasmídico es selectivamente retenido. Tras varios lavados para disminuir los contaminantes y tras una breve centrifugación el ADN retenido se eluye con tampón TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8), 0,1 mM EDTA).

4. Modelo celular

4.1. Cultivo celular

Las células H9c2, línea mioblástica de tejido embrionario de corazón de rata BD1X (ATCC CRL-1446, Manassas, VA, USA), se cultivaron a 37 °C en atmósfera humidificada, con 5 % CO₂ en medio de cultivo DMEM conteniendo 25 mmol/L de glucosa, 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina suplementado con 10 % de suero fetal bovino.

Las células se crecieron en placas de 75 cm² de superficie para luego ser subcultivadas.

Para su transfección, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos con una densidad de 5×10^4 células por pocillo el día previo a la transfección. El reactivo que permitía la mayor tasa de transfección y menor toxicidad fue Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, por cada pocillo a transfectar se diluyeron 10 µg de plásmido en medio Opti-MEM I en un volumen final de 250 µl. En otro tubo se mezclaron 10 µl de Lipofectamina con 250 µl de medio Opti-MEM I y después de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se juntaron el ADN diluido con la Lipofectamina diluida y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos ADN- Lipofectamina. La mezcla de complejos se agregó a cada pocillo sembrado con las células en un volumen final de 1,5 ml por pocillo y se incubó durante 6 horas.

Para la obtención de una línea con expresión estable del transgen, se procedió a la selección de los clones transfectados con puromicina a concentración final de 1 µg/ml durante 3 días. Se obtuvieron así líneas estables tanto para células expresando hCOX-2 (H9c2-hCOX-2) como para células control transfectadas con vector vacío (H9c2-CAGIP).

Las células se trataron con tampón de inhibición metabólica o con solución de CoCl₂ para evaluar su viabilidad. Para estos experimentos, se

crecieron células transfectadas estables con plásmido CAGIP o CAGIP-hCOX-2 en frascos de 75 cm² de superficie hasta una confluencia del 70 %, fueron tripsinizadas y se sembraron 10.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos.

El tampón de inhibición metabólica estaba contenía: 106 mM NaCl, 4,4 mM KCl, 1 mM MgCl₂.6H₂O, 38 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂, 20 mM 2-deoxy-d-glucosa, 1mM NaCN pH 6,6. Los tiempos de incubación fueron: 30, 60, 90 y 120 minutos. Tras la incubación se aspiró el tampón y se añadió medio de crecimiento durante 1 hs. Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C.

El tratamiento con CoCl₂ se realizó reemplazando el medio de cultivo por una solución 100 ó 300 µM de CoCl₂ durante 36 hs a 37 °C.

4.2. Aislamiento de cardiomiocitos de ratón

Se siguió el procedimiento descrito por Shioya (Shioya 2007) en colaboración con María Fernández-Velasco (Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, IDIPAZ, Madrid).

Cada ratón fue heparinizado con 8.000 U/kg por vía intraperitoneal y recibió además, anestesia profunda con una sobredosis de pentobarbital sódico de 300 mg/kg intraperitoneal. Seguidamente se abrió el abdomen superior con un corte horizontal y fueron retiradas las costillas y el esternón de la zona.

Una vez expuesto el corazón, éste fue cortado y colocado inmediatamente sobre hielo en tampón de aislamiento: 130 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,33 mM NaH₂PO₄, 22 mM glucosa, 50 U/ml insulina bovina (I-5500, Sigma) y 25 mM HEPES NaOH (pH=7,4); el tampón fue suplementado con 0,4 mM de EGTA. En esta solución, se procedió a retirar los restos de tejidos acompañantes del corazón. A continuación, éste fue sumergido en tampón de aislamiento frío y canulado a través de la arteria aorta. Luego se conectó la vía de perfusión, para perfundir retrógradamente el corazón a una presión hidrostática constante de 70 cm a 37 °C. Se realizó un corte en la pared ventricular del corazón para permitir la salida de líquido. Inicialmente se perfundió con tampón de aislamiento suplementado con EGTA durante 3-4 minutos y luego, la solución de perfusión fue reemplazada por una solución de tampón de aislamiento suplementada con colagenasa, que recirculó durante 6-9 minutos. Finalmente, los ventrículos fueron cortados en múltiples trozos y digeridos nuevamente con solución fresca de colagenasa durante 15-20 minutos a 37 °C hasta que estuvo completamente digerido.

5. Modelo animal: Ratones con sobreexpresión de COX-2 en corazón

Se utilizaron ratones macho B6D2-Tg (MHC-PTGS2/UPME) de tres meses de edad.

Los detalles de la obtención de esta línea transgénica, han sido descritos en la introducción de este trabajo (Inserte y col. 2009). En algunos experimentos, los ratones fueron tratados diariamente durante 4 días, con el inhibidor selectivo de COX-2, DFU, por vía intraperitoneal en dosis a razón de 5 mg/kg de peso (Riendeau y col. 1997). Todos los procedimientos fueron desarrollados de acuerdo a la guía de cuidado animal de la Unión Europea (2010/63/EU) y aprobados por el Comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Los animales se alimentaron ad libitum siguiendo las instrucciones de cuidado de la institución (Comisión de Bioética del CSIC, España).

El genotipado de los ratones se hizo a partir de ADN extraído de la cola por el procedimiento de la proteinasa K. Los oligos específicos para la amplificación fueron: directo 5'-CAGAGTTGGAAGCACTCTATGG-3' y el oligo reverso 5'-CTGTTTTAATGAGCTCTGGATC-3'. La mezcla de reacción de la PCR contenía: 50 ng de ADN molde, 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M de oligonucleótidos directo y reverso, 1,5 mM Mg^{2+} , 2,5 U de DNA Taq Man (Promega), en 20 μ l de volumen final conteniendo tampón de reacción 1X. La reacción de PCR comprendía 5 minutos a 92 °C, y 35 ciclos

de 30 segundos a 92 °C, 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C y para finalizar la amplificación una fase de elongación de 10 minutos a 72 °C.

6. Determinación de la concentración de PGE₂

Para controlar la funcionalidad de la enzima hCOX-2, se midió la concentración de PGE₂ por ésta producida utilizando el kit comercial de la casa Arbor Assays siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el ensayo consiste en una técnica de ELISA de competición entre la PGE₂ contenida en la muestra y una concentración conocida añadida. El color desarrollado se mide a 450 nm en un espectrofotómetro.

En el modelo celular, las muestras para la determinación fueron los sobrenadantes del medio de crecimiento de las células H9c2. Para las determinaciones de PGE₂ en corazón, el tejido fue extraído e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido, y fue almacenado a -80 °C hasta su utilización. El día de la determinación, el tejido debió ser previamente pesado en balanza analítica de alta sensibilidad para normalizar la concentración obtenida por mg de tejido. Posteriormente fue colocado en un tubo eppendorf y se añadieron 200 µl de PBS frío conteniendo Indometacina a concentración final de 15 µM para la disociación del mismo por medio de douncer. A continuación, fue centrifugado a alta velocidad para separar el sobrenadante con el cual se llevó a cabo el ensayo.

7. Aislamiento de ARN

El ARN total se extrajo tanto de células de cultivos como de fracciones de tejido cardíaco usando TRI Reagent Solution (Life technologies) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante basado en el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (Chomczynski y Sacchi 1987). Brevemente, las muestras se homogenizaron en 1 ml de TRI Reagent y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió a cada tubo 200 μ l de cloroformo, se mezclaron los reactivos durante 30 segundos usando vortex y luego se centrifugaron para separar las fases. La fase acuosa superior se pasó a un tubo nuevo y se agregaron 500 μ l de isopropanol para precipitar el ARN. Tras centrifugar el precipitado se lavó con etanol al 70 % en agua libre de ARNsas en dos pasos de centrifugación a 12.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente se disolvió el ARN obtenido en agua libre de ARNsas.

La integridad y pureza del ARN extraído se analizó en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio y mediante el análisis de la relación de absorbancia a 260/280.

8. RT-PCR a tiempo real

La síntesis de ADNc (ADN complementario) se realizó por transcripción reversa a partir de 1 μ g de ARN total, con una desnaturalización mediante incubación de 10 minutos a 65 °C en presencia de 50 pmoles de hexámeros cebadores de secuencia aleatoria, seguido de una reacción de

amplificación incubando 10 minutos a 30 °C y 45 minutos a 42 °C con 37,5 U de transcriptasa reversa Expand Reverse Transcriptase (Roche) en presencia de 20 U de inhibidor de ARNasa, 10 mM DTT y 1 mM dNTPs en buffer de transcriptasa reversa 1X (el buffer 5X es 250 mM TrisHCl, 200 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2,5% v/v Tween-20, pH 8,3).

Para analizar la expresión de genes, el ADNc obtenido fue diluido 1 en 5 y se usaron 4 µl como molde para una reacción de PCR en la cual la detección de fluorescencia permitió la comparación de los niveles de expresión entre las muestras. Se utilizó el reactivo Fast Syber Green (Life Technologies) la concentración final de oligonucleótidos fue 300 nM. Las muestras se analizaron en el instrumento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies). La reacción comprende un paso a 95 °C de 20 segundos de duración, seguido de 40 ciclos que comprenden un paso a 95 °C durante 3 segundos y otro paso a 60 °C durante 30 segundos. La cantidad relativa de ARNm de VDAC, sub I y sub II de citocromo c oxidasa se calculó utilizando el método de comparación de la segunda derivada del Ct, normalizada con respecto a la cantidad de GAPDH o β-Actina como control endógeno. La secuencia de los oligos utilizados en RT-PCR a tiempo real se detalla en la Tabla 1.

La idoneidad de los oligos utilizados se verificó por una curva de hibridación comprobando que se obtenía un único producto de reacción de amplificación (Figura 23).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en Real Time PCR

Gen	Especie	Oligonucleótido
gapdh	RATON	Dir.: 5' GTATTGGGCGCCTGGTCAC 3' Rev.: 5' AATCTCCACTTTGCCACTGCA 3'
sub I- citocromo c oxidasa	RATON RATA	Dir.: 5' ACCCAATATCAGACACCTCTCTTTGT 3' Rev.: 5' GACGGCTGTAATTAGTACGGATCATAAC 3'
sub II- citocromo c oxidasa	RATON RATA	Dir.: 5' AACCAAGCTACAGTGACATCAAACC 3' Rev.: 5' GCATTGGCCATAGAATAGACCTG3'
vdac	RATON RATA	Dir.: 5' CGGACGAATCCAGCTTCAT 3' Rev.: 5' CCACCAAACCTCCGTCCCAT 3'

9. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas totales, a partir de cultivo celular, se retiró el medio de cultivo por aspiración, y se realizaron dos lavados de las células sobre hielo con PBS frío a 4 °C, y posteriormente se añadió el tampón de lisis RIPA (50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 1 % NP40; 0,5 % desoxicolato sódico; 0,1 % SDS) a 4 °C. En el caso de muestras de tejido, la trituración se realizó de forma mecánica en el mismo tampón de extracción. Los lisados se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se guardaron a -80 °C para su almacenamiento.

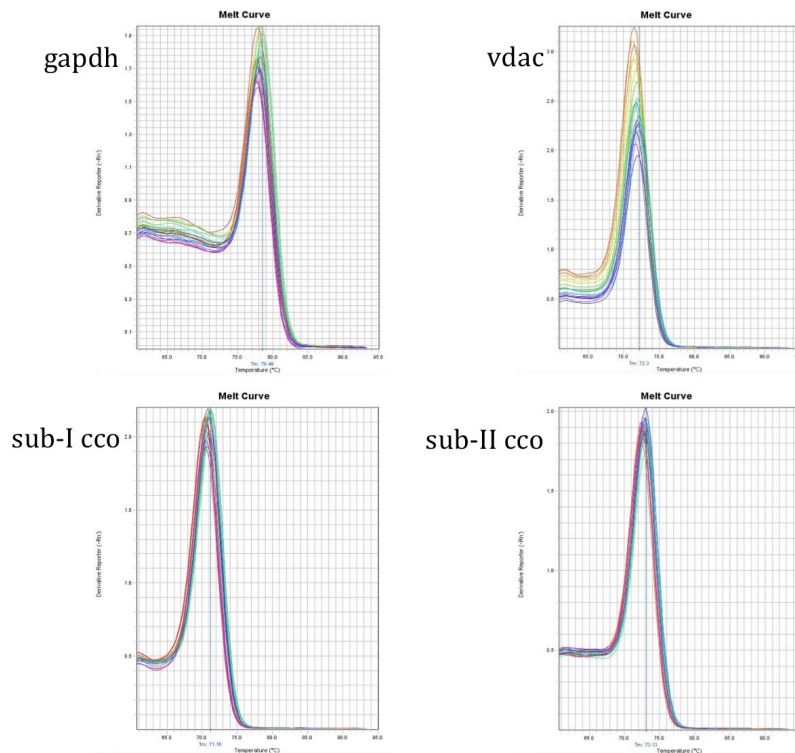


Figura 23. Curvas de hibridación para los oligos utilizados.

Cuando fue necesario obtener el extracto total, el extracto citosólico y el mitocondrial, se prosiguió según se comenta a continuación. Se preparó tampón de extracción conteniendo: 320 mM Sacarosa, 1 mM K_2EDTA y 10 mM Tris HCl pH 7,4. Este tampón se suplementó con inhibidor de proteasas. Se tripsinizaron las células y el pellet celular obtenido se resuspendió en 1 ml de tampón de extracción y fue pasado por aguja 25G 30 veces para romper las células; el homogenado fue centrifugado a 450 x g durante 5 minutos a 4 °C. Parte del sobrenadante fue reservado y representó el extracto total. Con el resto de sobrenadante se realizó una centrifugación a

10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante fue el extracto citosólico mientras que el pellet fue resuspendido en tampón y correspondió al extracto mitocondrial.

Para determinar la concentración de proteínas extraídas o utilizadas en los diferentes experimentos de este trabajo se utilizó el kit comercial “Bio-Rad DC Protein Assay” que es similar a la reacción de Lowry. El ensayo se basa en dos pasos: 1- la reacción entre los enlaces peptídicos de la proteína y el ion cobre divalente en medio alcalino y 2- la subsecuente reducción del reactivo de Folin (1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio) sobre el cobre coordinado con la proteína. El color azul es debido principalmente a los aminoácidos Tirosina y Triptofano y en menor medida a Cistina, Cisteína e Histidina. Así el desarrollo de color es proporcional a la presencia de estos aminoácidos en la muestra. La absorbancia máxima es a 750 nm. Se usó seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

10. Obtención de la fracción proteica enriquecida en mitocondrias

Este tipo de extracto fue utilizado para la determinación de la actividad enzimática del complejo IV de la cadena respiratoria o citocromo c oxidasa.

Se extrajeron los corazones de los ratones, se limpiaron de restos de tejidos acompañantes y se lavaron en PBS frío. Cada corazón fue pesado y a continuación sumergido a razón 10 % p/v en tampón isotónico mitocondrial

que contenía: 225 mM manitol, 75 mM sacarosa, 19 mM tris HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,2 suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). Con tijera quirúrgica se cortaron en pequeños trocitos y luego se pasaron a un douncer donde se disociaron las fibras cardíacas. A continuación se centrifugó el homogenado en microcentrifuga durante 20 minutos a 650 x g. Se reservó el sobrenadante en un tubo nuevo y se volvió a resuspender el pellet en 1 ml de tampón isotónico para luego ser pasado nuevamente por el douncer. Se repitió el paso de centrifugación y finalmente se juntaron los sobrenadantes obtenidos.

11. Extracción de mitocondrias

Las mitocondrias fueron aisladas por centrifugación diferencial según el protocolo de Benard, G y col. con algunas modificaciones (Benard y col. 2006). En resumen, se extrajo el corazón, se lavó en PBS a 4 °C y se quitó con tijera los restos de otros tejidos (por ejemplo circulatorio o conectivo como grasa circundante). Posteriormente, se pasó a una placa de Petri de cristal de 10 cm² que contenía tampón I de extracción a 4 °C, compuesto de: 210 mM manitol, 70 mM sacarosa, 50 mM tris HCl pH 7,4, 10 mM EDTA y una pastilla de inhibidores de proteasas (Roche) por cada 10 ml. Sumergido en este tampón cada corazón fue cortado longitudinalmente para eliminar la sangre que pudiera contener y posteriormente en fracciones menores para otras determinaciones (como por ejemplo: concentración de PGE₂, ARN,

ATP, etc). La porción de tejido reservada para el aislamiento de mitocondrias se cortó con tijera quirúrgica hasta trocitos lo más pequeños posibles y se trasvasó la suspensión a un tubo de plástico de 13 ml para ser triturada en Ultraturrax a velocidad media durante 3 ciclos de 5 segundos cada uno. A continuación el homogenado se pasó a tubo eppendorf y fue centrifugado a 4 °C durante 5 minutos a 1.000 x g. Trascorrido este tiempo, se reservó el sobrenadante en un tubo nuevo y se resuspendió el pellet en 1 ml de tampón I a 4 °C que se centrifugó en las condiciones anteriores. El sobrenadante obtenido en esta centrifugación se sumó al reservado de la primer centrifugación y fueron nuevamente centrifugados a 4 °C durante 10 minutos a 7.000 x g. El pellet resultante se resuspendió en tampón de aislamiento II (tampón II) que contenía: 225 mM manitol, 75 mM sacarosa, 10 mM tris HCl, 0,1 mM EDTA y una pastilla de inhibidor de proteasas (Roche) por cada 10 ml centrifugándose a 4 °C durante 5 minutos a 1.000 x g. Por último, el sobrenadante resultante fue centrifugado a 4 °C durante 10 minutos a 7.000 x g. Éste último pellet contenía las mitocondrias aisladas y fue resuspendido en tampón II.

Todos los pasos de éste protocolo deben hacerse lo más rápido posible y debe trabajarse a 4 °C para facilitar la mejor calidad e integridad mitocondrial.

12. Separación de proteínas por electroforesis

12.1. Western blot

Para la identificación semicuantitativa de proteínas por su peso molecular, las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. El tampón de migración usado contuvo: 25 mM Tris HCl pH: 8,3, 192 mM glicina, 0,1 % SDS. Se utilizó un marcador preteñido de peso molecular para estimar el tamaño de las proteínas (Western c Protein Plus, BioRad).

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF Hybond-P Amersham, GE Healthcare) previamente activada con metanol. El tampón de transferencia usado contenía: 48 mM Tris, 39 mM glicina, 0,04 % SDS, 20 % (v/v) metanol. El bloqueo de las membranas y la dilución del anticuerpo primario se realizó en tampón TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, adicionado con Tween 1 ml/Litro TBS) con 5 % leche en polvo desnatada.

Los anticuerpos utilizados para detectar los diferentes complejos respiratorios fueron: anti citocromo c oxidase (CIV) sub II (Santa Cruz, sc-23983) y sub IV (Abcam, ab20E8C12), anti-VDAC (Abcam, ab20B12AF2) y MitoProfile® Total OXPHOS Rodent (Mitosciences-Abcam, ab 110413). Como control de carga se utilizó la proteína anti anti NDUFA5 (CI) (Proteintech 16640-1-AP) o TOMM 20 (Sigma Aldrich, WH 0009804M1). En otros experimentos se utilizaron los anticuerpos siguientes anticuerpos:

anti hCOX-2 (Stressgene COX-030), anti- HIF1-a (Proteintech 20960-1-AP), anti PolII (N-20) (Santa Cruz sc-899), anti Actina (Sigma Aldrich A2688).

El revelado de las membranas se realizó mediante quimioluminiscencia, utilizando el reactivo ECL plus (GE Healthcare)

Las bandas observadas se cuantificaron utilizando el programa ImageJ (Schneider y col. 2012).

12.2. Electroforesis de proteínas nativas mitocondriales (Blue Native-PAGE)

Para evaluar la presencia de supercomplejos mitocondriales en animales transgénicos y control se desarrolló la estrategia de electroforesis en geles nativos. Así 100 µg de mitocondrias aisladas el mismo día del experimento, se resuspendieron en un tampón que contenía: 1 M ácido 6-aminohexanoico, 50 mM Bis-Tris-HCl pH: 7, y se añadió digitonina a razón 4 gr por gr de extracto total, incubándose en hielo durante 5 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se mezclaron en proporción 1 a 3 del volumen total con 5 % BLUE G en 1 M de ácido 6-aminohexanoico. Posteriormente, las muestras se cargaron en gel Bis-Tris nativo en gradiente 3-12 % (Life Technologies). Después de la electroforesis llevada a cabo a 4 °C a 90 volt los primeros 30 minutos y posteriormente a 300 volt durante 90 minutos, se procedió a la transferencia de los complejos a membranas de PVDF para luego proseguir con su análisis por western blot.

Los anticuerpos utilizados para detectar los diferentes supercomplejos fueron: anti NDUFA5 (CI) (Proteintech 16640-1-AP), anti proteína II del núcleo ubiquinol citocromo c reductasa (CIII) (Sigma Aldrich, GW 22153A) y anti citocromo c oxidase (CIV) sub II (Santa Cruz, sc-23983).

Después de una incubación durante toda la noche a 4 °C, las membranas se trataron con los anticuerpos secundarios, conjugados con peroxidasa, específicos anti especie y fueron analizados por quimioluminiscencia. Como control de carga se utilizó la proteína TOMM 20 (Sigma Aldrich, WH 0009804M1).

Cuando fue necesario marcar la misma membrana sucesivamente con distintos anticuerpos, ésta fue sometida a deshibridación fuerte con un tampón que contenía: SDS 10 %, 0,5 M tris HCl pH 6,8 y 0,8 % β -mercaptoetanol. Se incubó la membrana durante 45 minutos a 50 °C en agitación. Posteriormente fue lavada con agua durante 1 hora y a continuación un breve lavado de 5 minutos con TBST. Para finalizar, la membrana debe ser bloqueada durante 1 hora con 5 % de leche en TBST y evaluada por quimioluminiscencia para comprobar la ausencia de bandas. Las incubaciones con los anticuerpos primarios se realizaron durante toda la noche a 4 °C.

13. Proteómica

Para evaluar diferencias en el perfil proteico celular, se realizaron análisis de digestión de proteínas y marcaje con O^{16} y O^{18} y posterior reconocimiento de los péptidos por el algoritmo SEQUEST.

Se resuspendieron 500 μ g de extracto proteico cardíaco o de mitocondrias aisladas con un protocolo que aseguraba la alta calidad de las mismas, en 300 μ l de tampón de muestra conteniendo: 5 % (p/v) de SDS, 10 % glicerol, 25 mM Tris HCl pH: 6,8, 10 mM DTT, 0,01 % (p/v) azul de bromofenol y posteriormente fueron cargadas en un gel para electroforesis convencional, con una porción de stacking de 4 % y una de running de 10 % de Acrilamida/Bisacrilamida. Cuando las muestras alcanzaron la zona entre stacking y running, la electroforesis fue detenida y las bandas sin resolver fueron visualizadas con Coomassie y posteriormente, cortadas en cubos para luego ser digeridas en un tratamiento con tripsina disuelta en 50 mM de bicarbonato de amonio pH 8,8, 10 % (v/v) de Acetonitrilo y un 0,01 % (p/v) de 5 ciclohexil-1-pentil- β -D-maltósido (CYMAL-5) en relación 5:1 (proteína:tripsina) durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos resultantes fueron extraídos por incubación de 1 hora en 12 mM de aminobicarbonato pH 8,8. Luego se añadió ácido trifluoracético a una concentración final de 1 % y los péptidos fueron finalmente desalados y secados. A continuación, los péptidos fueron marcados con O^{16}/O^{18} en 100 mM acetato de amonio pH 6 y 20 % ACN y tripsina inmovilizada en una relación 1:200 (v/p) tripsina:

proteína. Los péptidos procedentes de las muestras control fueron marcadas con O¹⁶ mientras que las muestras con sobreexpresión de hCOX-2 fueron marcadas con O¹⁸. La actividad de tripsina fue eliminada removiendo la tripsina inmovilizada con filtros (Promega) y se agregó el inhibidor de tripsina TLCK a una concentración final de 1 mM con una incubación de 1 hora a 37 °C.

Las muestras fueron mezcladas y diluidas en 2 % ACN pH 3, desaladas y finalmente secadas. Luego, la mezcla de péptidos fue disuelta en un tampón de concentración que contenía 5 % glicerol y 2 % IPG y fue cargada en una columna IMobiline Dry Strip y separada por IEF en un gel fraccionador (ALIGENT) usando el método indicado por el fabricante. Las fracciones recuperadas fueron acidificadas a pH 3 y los péptidos fueron desalados. Después de ser eluidos en 5 mM 50 % ACN en 5 mM de formato de amonio pH 3, los péptidos fueron secados y analizados por RP-HPLC LIT.

La identificación de las proteínas fue hecha usando el algoritmo SEQUEST (Bioworks 3.2 package, Thermo Finnigan). Este experimento se realizó en colaboración con el servicio del Jesús Vázquez (Laboratorio de Proteómica Cardiovascular, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid).

14. Curva de crecimiento

Sembramos 8.000 células por pocillo de placa de 6 pocillos en un volumen final de 3 ml en el medio de crecimiento estándar de las células o en el medio Galactosa. Este último medio de crecimiento contenía: DMEM sin glucosa, 10 mM galactosa, 2 mM glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 10 mM HEPES pH 7,4, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37 °C , en atmósfera humidificada, con 5 % CO₂ y fueron tripsinizadas cada 24 hs. El recuento celular se hizo mediante tinción con Tripan Blue en cámara de Neubauer.

15. Panel oxidativo

El día previo a la determinación del panel oxidativo, se sembraron células H9c2 control y H9c2-hCOX-2 en placa de 24 pocillos, a una concentración de 100.000 células por pocillo. Al día siguiente, pasado el tiempo de incubación con los controles positivos de cada parámetro a medir, se recogió el sobrenadante de cada pocillo y se reservó en tubo de adquisición. A continuación, los pocillos se lavaron con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ y cada sobrenadante se agregó al tubo correspondiente. Luego, se despegaron las células con tripsina y se añadió a cada pocillo el fluorocromo disuelto en medio de cultivo. Finalmente se sumó éste sobrenadante al contenido en su tubo correspondiente. Tras la incubación a 37 °C en

oscuridad y se adquirieron las muestras en un citómetro de flujo Gallios (Beckman-Coulter, Brea, CA). Los valores de fluorescencia que miden los parámetros funcionales estarán restringidos a la población de células vivas.

Tabla 2. Panel oxidativo: Fluorocromos y Controles positivos

Parámetro	Fluorocromo	Solvente	Incubación (minutos)	Conc. final	Control Positivo
Potencial de membrana	TMRM (Sigma-Aldrich)	DMSO	30	2 μ M	FCCP 30 min 50 μ M
Nivel de glutation	Monoclorobimano (Sigma-Aldrich)	DMSO	15	2 μ M	BSO 24 horas 100 μ M
Oxido nítrico	DAF-FM-DA (Molecular Probes)	DMSO	30	1,25 μ M	NOR-1 250 μ M
Anión superóxido	Mitoxox (Molecular Probes)	DMSO	30	1,25 μ M	Plumagina 1 hora 2,5 μ g/ml
Viabilidad	Ioduro de Propidio (Sigma-Aldrich)	H ₂ O	5	2,5 μ g/ml	

TMRM: Tetrametilrodamina.

FCCP: carbonilcinida-p-trifluorometoxifenilhidrazona.

BSO: L-butionina-sulfoxamina.

DAF-FM-DA: 4-Amino-5-metilamino-2',7'- difluorfluoresceina diacetato.

NOR-1: (+/-)-E-metil-2-((E)-hidroxiimino)-5-nitro-6-metoxi-3-hexenemida.

mBCI: monoclorobimano.

16. Determinación de la concentración de ATP

Para esta medición se utilizó el kit de alta sensibilidad “ATP Bioluminescence Assay Kit HS II” de Roche. La reacción se basa en que en presencia de la enzima luciferasa, el ATP presente en la muestra reacciona

con la luciferina añadida y oxígeno ambiental para dar AMP, pirofosfato, CO₂, oxiluciferina y luz. Como resultado de esta reacción 0,9 fotones se liberan por molécula de ATP a una longitud de 562 nm. De este modo la cantidad de luz emitida y medida por bioluminiscencia es proporcional a la concentración de ATP inicial.

La concentración del contenido de ATP fue medida en muestras de tejido cardíaco, congelado en nitrógeno líquido inmediatamente después de su extracción, y en células. En este último caso, las células se sembraron a una concentración de 80.000 células por pocillo de placa de 24 pocillos el día previo a la medición.

El primer paso del procedimiento implicaba la homogeneización de la muestra en tampón de lisis (100 mM Tris + 4 mM EDTA, pH: 7,5). Cuando la muestra correspondió a un tejido, una vez pesado en balanza analítica de alta sensibilidad se traspasó cada muestra a un tubo eppendorf, se añadieron 300 µl del tampón a cada una y se trató con un douncer especial para ese tipo de tubo hasta su completa disociación y se dejó a 4 °C hasta el próximo paso del protocolo. Para células en cultivo, la homogeneización consiste en aspirar el medio de cultivo y añadir a cada pocillo el tampón de lisis y dejar a temperatura ambiente en agitador orbital a 200 rpm durante 5 minutos y posteriormente pipetear varias veces cada pocillo.

Una vez obtenidos los homogenados, fueron incubados durante 7 minutos a 95 °C. A continuación, fueron centrifugados a 14.000 rpm durante

3 minutos para separar el sobrenadante de las membranas celulares. Luego se traspasaron 50 μ l de cada muestra y también de patrones de concentración conocida a una placa de 96 pocillos de paredes opacas. Finalmente se llevó la placa al lector de microplacas Victor que previamente había sido programado para dispensar automáticamente 50 μ l de una dilución de luciferasa 1 en 10 del stock comercial en modalidad pocillo a pocillo y posterior lectura de la luminiscencia de cada pocillo durante 10 segundos.

17. Medición de la respiración

El consumo de oxígeno de las fibras cardíacas fue medido en un electrodo tipo Clark (Hansatech) a 37 °C. Una vez extraído, el corazón fue lavado en PBS a 4 °C y con tijera se despreciaron los restos acompañantes. Se lo pasó a una placa de Petri de 10 cm² de cristal que contenía medio de respiración compuesto por: 75 mM manitol, 25 mM sacarosa, 100 mM KCl, 10 mM Tris fosfato, pH 7,4 y 50 μ M EDTA y mediante el uso de un bisturí y una pinza se procedió a realizar cortes longitudinales de aproximadamente 3 mm de grosor. Posteriormente, se incuban las fibras obtenidas en agitación constante en el mismo medio de respiración pero conteniendo saponina 50 μ M para permeabilizar las fibras.

Cada una de estas fracciones fue puesta individualmente en la cámara del electrodo y se midió el consumo de oxígeno durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra fue recuperada, se secó con papel

absorbente y fue pesada en balanza analítica para la normalización de los resultados. El ratio de respiración se expresa en nmol O₂/minuto/mg de tejido seco.

Para medir la respiración en células, se cultivaron las células hasta una confluencia del 50 % y se tripsinizaron. A continuación, se realizó el recuento celular y se llevaron las células a una concentración final de un millón de células por ml. Para la medición del consumo de oxígeno, se traspasó 1 ml de la suspensión de celular previamente agitado a la cámara del electrodo y se midió el consumo durante 5 minutos.

18. Ensayo de viabilidad: MTT

Para medir la viabilidad celular, se utilizó el kit comercial MTT (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El fundamento del ensayo es la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que genera un compuesto de color azul-violeta (formazan). La cantidad de formazan producido, cuya absorbancia se mide en un espectrofotómetro a 570 nm, es proporcional a la cantidad de células vivas.

Se sembraron 10.000 células por pocillo en placa de 96 pocillos, y después de aplicar el tratamiento correspondiente al objetivo del experimento, se añadió la solución de MTT y se permitió la formación de los cristales de formazan durante 2 hs a 37 °C en incubador. A continuación se procedió a la

solubilización de los cristales formados añadiendo 100 µl del reactivo de solubilización durante 1 hora en agitación a baja rpm.

19. Medición de la actividad enzimática citocromo c oxidasa

El complejo IV de la cadena respiratoria o citocromo c oxidasa permite la oxidación del citocromo c siendo el aceptor natural de los electrones el oxígeno, su actividad fue evaluada entonces por la desaparición del citocromo c reducido a 550 nm a 37 °C.

Para la determinación de la actividad enzimática de la citocromo c oxidasa se preparó una solución madre 100 µM de citocromo c en 50 mM H₂KPO₄ a pH 7. A continuación se preparó una solución de referencia de citocromo c 100 % oxidado mediante la adición de K₃Fe₂(CN)₆ a 1 ml de la solución de citocromo c 100 µM previamente puesto en una cubeta de espectrofotometría de 1 ml. Esta solución resultante presentaba una coloración naranja-amarillenta.

Posteriormente, se preparó una solución de referencia de citocromo c 100 % reducido mediante la adición de Na₂S₃O₆ a 1 ml de la solución de citocromo c 100 µM previamente puesto en la cubeta de espectrofotometría de 1 ml, que presentaba color rosado salmón.

Con el espectrofotómetro cuya temperatura se había ajustado previamente a 37 °C, se realizaron lecturas a 550 nm de longitud de onda,

comenzando con un blanco en una cubeta sin ninguna solución (medición en aire). Seguidamente se midió la absorbancia de la solución de referencia 100 % oxidada que debe ser de aproximadamente 0,7 OD. Luego se repitió la lectura del blanco usando esta vez la solución 100 % oxidada de citocromo c, teniendo así una absorbancia nula para una reducción nula.

Posteriormente se midió la absorbancia de la solución de referencia 100 % reducida y se anotó la absorbancia de esta solución, que debió estar en el orden de 1,3 OD.

Finalmente, se fue reduciendo progresivamente la solución madre de citocromo c de 100 μ M con alícuotas de la solución 100 % reducida hasta obtener un porcentaje de reducción del 85-90 % en la solución madre con respecto a la solución 100 % reducida de citocromo c. Esta es la solución de trabajo para la medición de la actividad específica del citocromo c oxidasa.

Con una calibración inicial del espectrofotómetro a 37 °C, 550 nm de longitud de onda y el blanco realizado en aire, se añadieron 980 μ l de la solución de trabajo a la cubeta de 1 ml y se atemperó a 37 °C durante un par de minutos.

Para la medición, se añadieron 20 μ l de la solución de fracción proteica enriquecida en mitocondrias de concentración del orden de 2 mg/ml y se registraron todos los valores de absorbancia cada 10 segundos durante 5 minutos.

La fórmula utilizada para tal fin es la siguiente:

$$(ABS_{t_1} - ABS_{t_0}) / (t_1 - t_0) / 18,5 \times 1 / (20 \times Conc \text{ Prot}) \times 1.000.000$$

Donde: ABS t_1 : Absorbancia a tiempo final.

ABS t_0 : Absorbancia a tiempo inicial.

T_1 : tiempo final en minutos.

T_0 : tiempo inicial en minutos.

Coefficiente de extinción del citocromo c es e : $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La actividad específica se expresó en nanomoles/minutos/mg de proteína.

20. Determinación del RATIO CIV/CII + CIII

Para medir el contenido de citocromos del complejo IV de la cadena respiratoria y el correspondiente a los complejos II y III se deben medir ciertas absorbancias de las mitocondrias en diferentes soluciones a 37°C .

En un primer momento se midió la absorbancia de 1 ml de muestra de mitocondrias aisladas disueltas en tampón de respiración: 75 mM manitol, 25 mM sacarosa, 100 mM KCl, 10 mM Tris fosfato, 10 mM Tris HCl pH 7,4 y 50 μM EDTA contenida en una cubeta de espectrofotometría de 1 ml y se registraron las absorbancias correspondientes a: 603, 630, 562 y 575 nm. A continuación se añadió a la misma cubeta $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y se anotaron las absorbancias correspondientes a las mismas longitudes de onda. Para finalizar,

en la misma cubeta se añadió $K_3Fe(CN)_6$ y se registraron las mismas absorbancias.

Para calcular el ratio CIV/(CII + CIII) se aplicó la siguiente fórmula:

aa3: $ABS\ 603\ nm\ Na_2S_2O_3 - ABS\ 630\ nm\ K_3Fe(CN)_6 / (ABS\ 562\ nm - ABS\ 575\ nm)$

21. Determinación del contenido aa3

Para medir el contenido de citocromo del complejo IV de la cadena respiratoria en las células en cultivo se procedió a obtener una suspensión celular a una concentración de 100.000 células por ml de tampón de respiración: 75 mM manitol, 25 mM sacarosa, 100 mM KCl, 10 mM Tris fosfato, 10 mM Tris HCl pH 7,4 y 50 μ M EDTA. Luego se colocó 1 ml de suspensión celular en una cubeta de espectrofotometría, se redujo con $Na_2S_2O_3$ y se registraron las absorbancias a 605 y 630 nm. A continuación se preparó la cubeta con 1 ml de suspensión celular y se añadió $K_3Fe(CN)_6$ y se registraron las absorbancias.

El cálculo del contenido del citocromo aa3 es el siguiente:

aa3: $((ABS605_{red} - ABS605_{oxid}) - (ABS\ 630_{red} - ABS630_{oxid}))/24000$

22. Microscopia electrónica

Se extrajeron los corazones de los ratones, se limpiaron de restos de tejidos acompañantes y se fijaron en tampón glutaraldehído al 2 % en 0,1 M cacodilato sódico durante 6 h a 4 °C. Tras la fijación, se realizaron 3 lavados

en tampón 0,1 M cacodilato sódico a 4 °C. El Servicio de microscopía electrónica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Valencia llevó a cabo la postfijación en 1 % tetraóxido de osmio, la deshidratación en alcohol y la inclusión en resina Epoxi. Secciones ultrafinas de 60 nm se montaron en rejillas de níquel y se tiñeron con 2 % acetato de uracilo y 2,7 % de citrato de plomo. Las muestras se analizaron por microscopía electrónica de transmisión usando un microscopio Jeol JEM1010 a 60 kV. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital AMT RX80 (8 Mpx).

23. Inmunofluorescencia

Los corazones fueron perfundidos con PBS frío, posteriormente con paraformaldehído 4 % y se incubaron en esta misma solución durante toda la noche a 4 °C. A continuación, cada corazón fue crioprotegido por pasajes sucesivos en soluciones de sacarosa de 5 a 30 % durante 15 minutos en cada una o hasta que cayera al fondo del tubo. Finalmente cada corazón fue incluido en medio OCT en un molde especial para luego ser congelado en nitrógeno líquido. Mediante el uso de criostato (Leica CM1900) se obtuvieron cortes de 8 µm de espesor que luego fueron teñidos. Los portas sobre los que se colectaron las muestras habían sido previamente tratados con gelatina para evitar el desprendimiento de los cortes. El día de la tinción, se bloquearon los portas con una solución de BSA 5 % durante 30 minutos y en

esta misma solución se incubaron los cortes con el anticuerpo primario, anti hCOX-2 (Cayman). Tras un par de lavados con PBS, se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (Molecular Probes). Las muestras se analizaron en un microscopio vertical Leica DM6000 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

24. Técnica histológica

Una vez extraído el corazón, se fijó con solución de paraformaldehído 4 % durante toda la noche. Luego se lavó cada muestra con PBS y se mantuvo en solución de alcohol etílico 70 % hasta su deshidratación. A continuación se realizó la deshidratación en cada muestra por pases sucesivos en soluciones de etanol a concentraciones crecientes y finalmente se realizó el paso de infiltración en parafina (los pasos de deshidratación e infiltración fueron realizados automáticamente en el equipo Leica Microm STP 120).

Luego se confeccionó un bloque de parafina con cada corazón (Inclusor Leica Myr EC350-1-EC350-2) y se reservó a temperatura ambiente hasta ser cortado. Los cortes de corazón se realizaron utilizando un microtomo (Leica Microm HM340E) y se seleccionó un grosor para ellos de 4 μm , luego se montaron los portaobjetos con los cortes obtenidos y se reservaron a temperatura ambiente hasta ser coloreados. Para la coloración, las muestras se desparafinaron y se hidrataron en pases sucesivos por xilol y etanol a concentración decreciente y finalmente se tiñeron con solución

alcohólica-acética de eosina (Sigma Aldrich, 0,25 % p/vol) durante 5 minutos, se lavaron con abundante agua del grifo y se trataron durante 3 minutos con hematoxilina (Sigma Aldrich, 1 % p/vol). Luego de ser lavados repetidamente con agua del grifo se sumergieron en solución de Bouin durante 30 segundos y se enjuagaron con agua. A continuación, los cortes se deshidrataron mediante pases sucesivos en concentraciones crecientes de etanol y finalmente en xilol. Se dejaron secar y se montaron los portaobjetos

25. Análisis estadístico

Los datos se han expresado como medias \pm desvío estándar según el análisis estadístico realizado mediante el test de t de Student de dos colas o ANOVA, considerándose estadísticamente significativo para * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$ como se indica en cada caso.

Resultados y desarrollo argumental

CAPITULO 1. Análisis del proteoma de cardiomiocitos de ratón con sobreexpresión de la ciclooxigenasa 2 humana (hCOX-2)

1.1. Control de la expresión de hCOX-2

Una caracterización completa de la línea de ratón con expresión constitutiva y específica en corazón de la enzima humana ciclooxigenasa-2 (COX-2) fue hecha en el momento de obtención de la misma (Inserte y col. 2009). A continuación se exponen los resultados de las pruebas hechas durante esta tesis para confirmación del sistema de trabajo.

1.1.1. Genotipado de ratones

Para comprobar la inserción de la secuencia de hCOX-2 microinyectada, se extrajo ADN de la cola de cada ratón nacido y se lo evaluó por PCR convencional para detectar la amplificación correspondiente a hCOX-2, utilizando oligos específicos para el gen humano.

Como puede observarse en la Figura 24, los animales 5, 6, 8, 10, 11, 12 y 15 habían heredado el transgén en su genoma (animales transgénicos - TG). Los animales de la misma camada que no habían integrado el transgen (animales silvestres, NO TG) fueron empleados como controles en los experimentos.

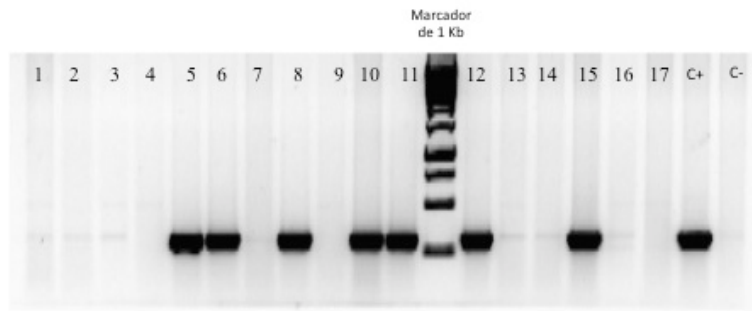


Figura 24. Foto representativa de un genotipado de una camada de ratones. Imagen de un gel de agarosa 2% para evaluar la amplificación específica de 325 pb de la secuencia perteneciente a la hCOX-2 introducida.

1.1.2. Expresión de hCOX-2 en corazón

Como desde la caracterización de los animales transgénicos B6D2-Tg (MHC-PTGS2)/Upme han transcurrido al menos 10 generaciones, lo primero que se hizo fue comprobar nuevamente la correcta expresión de la enzima hCOX-2, así como su localización específica en el cardiomiocito.

Para ello, se obtuvieron extractos proteicos totales de diferentes tejidos como: hígado, musculo esquelético o corazón y se buscó la presencia de hCOX-2. Sólo se detectó la proteína en corazón. En Figura 25 se muestran las bandas obtenidas mediante la técnica de western blot en los extractos cardíacos, utilizando anticuerpos anti-hCOX-2 (Stressgen, COX-030) y anti-Actina (Sigma). Se puede apreciar una intensa banda en las dos muestras transgénicas mientras que la banda correspondiente a hCOX-2 esta ausente en las muestras no transgénicas.

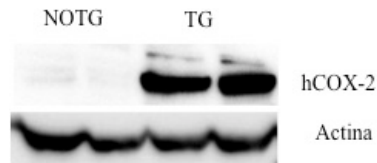


Figura 25. Expresión de hCOX-2 en ratones transgénicos (TG) y no transgénicos (NO TG). En gel 10 % acrilamida/poliacrilamida, se cargaron 50 μ g de extracto proteico total. La separación se hizo en condiciones reductoras y desnaturalizantes.

La expresión *in situ* de hCOX-2 en cortes de corazón de ratones transgénicos fue evaluada por inmunofluorescencia. Como se puede apreciar en las fotografías representativas de contraste de fases (Figura 26), el corazón presenta el estriado característico de un músculo y dado que hCOX-2 fue expresada bajo el promotor de la cadena pesada de la α -miosina que es un promotor muy fuerte y específico de cardiomiocitos, la fluorescencia procedente de la detección de hCOX-2 permite visualizar este patrón estriado homogéneo (Figura 26). Como era de esperar no se observó expresión de hCOX-2 en los cortes de corazón de animales control o NO TG (Figura 26).

1.1.3. Producción de PGE₂

Los resultados obtenidos de la expresión de hCOX-2 detectada por electroforesis e inmunodetección nos hicieron advertir la presencia de la secuencia introducida en los animales transgénicos, pero no si la enzima era funcional. Por tanto, se midió la concentración del producto de la enzima, expresándose como PGE₂ por miligramo de tejido (Figura 27).

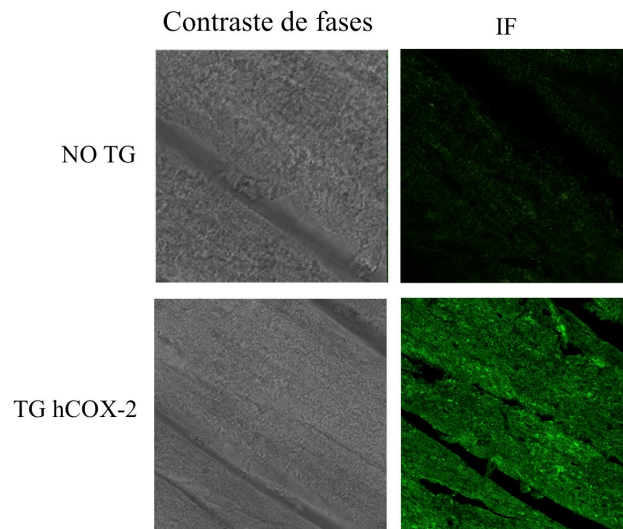


Figura 26. Detección de hCOX-2 por inmunofluorescencia (IF). Corazones de animales control (NO TG) y de animales con expresión constitutiva de hCOX-2 (TG) fueron extraídos, fijados con paraformaldehído, crioprottegidos y procesados en criostato. Los cortes de 8 micras obtenidos fueron bloqueados e incubados con el anticuerpo anti hCOX-2 (Stressgene). Se muestran fotografías a 40X.

Como se ve en la Figura 27 los niveles de PGE_2 fueron siempre mayores en los animales TG demostrando que la enzima era funcional.

Vale mencionar que la medida de la producción de PGE_2 fue usada como control de expresión de hCOX-2 en cada uno de los experimentos en que se usaron animales transgénicos a lo largo de este trabajo de tesis.

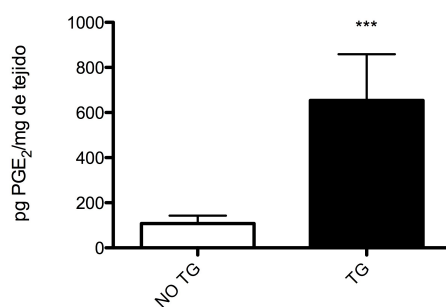


Figura 27. Concentración de PGE₂ en corazón de los animales transgénicos. La PGE₂ fue detectada por la técnica ELISA en corazones de ratones NO TG y TG referidos a mg de corazón (***) corresponde a un $p < 0,001$. $n=10$).

1.2. Proteómica en cardiomiocitos de ratones

Como ha sido mencionado en la introducción de esta tesis, los ratones con expresión constitutiva de la ciclooxigenasa-2 humana (hCOX-2) en corazón presentaban una protección basal ante episodios de isquemia-reperfusión (Inserte y col. 2009). Se decidió entonces analizar, en colaboración con el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, el perfil de proteínas expresadas en estos animales versus el de los animales control con el fin de comprender el papel de la COX-2 en el cardiomiocito.

En una primera etapa, se trabajó con cardiomiocitos aislados de ratones NO TG y TG. Se utilizó una tasa de falsos positivos (FDRq) del 10 % y se consideraron los cambios de expresión de al menos el doble entre ambas condiciones. Así, fueron detectadas 22 proteínas cuya expresión estaba aumentada, y otras 6 cuya expresión estaba disminuida en los animales transgénicos en relación a los controles (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas diferencialmente expresadas en TGhCOX-2. Se presentan ordenadas según su cambio de expresión. El valor normal estandarizado (Zq) se obtuvo dividiendo el \log_2 de cada proteína por su valor de varianza (Jorge y col. 2009). FDRq, tasa de falsos positivos.

ID	Gen	Descripción	Localización subcelular	Zq	FDRq	Nº de péptidos
P00405	Mtco2	Citocromo c oxidasa subunidad 2	Membrana mitocondrial interna	↑6,53	7,70 E-09	6
Q8R0F8	Fahd1	Proteína 1 conteniendo el doiminio Fumarilacetoacetato hidrolasa	Mitocondria	↑6,16	8,33 E-08	1
P19783	Cox4i1	Citocromo c oxidasa subunidad 4 isoform 1	Membrana mitocondrial interna	↑6,03	1,29 E-07	6
P12787	Cox5a	Citocrom c oxidasa subunidad 5A	Membrana mitocondrial interna	↑5,96	1,95 E-07	4
Q9D8B4	Ndufa11	[ubiquinona] 1 alfa NADH deshidrogenasa subunidad 11	Membrana mitocondrial interna	↑5,91	1,99 E-07	1
Q60932	Vdac1	VDAC-1	Membrana mitocondrial externa	↑5,37	4,63 E-06	7
Q6AYI5	Gpatc2	Proteína 2 conteniendo el dominio G Patch		↑5,28	7,64 E-06	1
P19536	Cox5b	Citocromo c oxidasa subunidad 5B	Membrana mitocondrial interna	↑5,20	8,58 E-06	1
Q8R2U7	Lrrc42	Proteína 42 conteniendo la repetición rica en leucina		↑4,97	2,89 E-05	1
P56392	Cox7a1	Citocromo c oxidasa subunidad 7A1	Membrana mitocondrial interna	↑4,66	0,0001	1
P00397	Mtco1	Citocromo c oxidasa subunidad 1	Membrana mitocondrial interna	↑4,55	0,0002	1
Q60930	Vdac2	VDAC-2	Membrana mitocondrial externa	↑4,42	0,0003	4
A2AL77	Asph	Aspartato-beta-hidroxilasa		↑4,35	0,0004	1

Q99KW3	Triobp	Proteína de unión a TRIO y F-actina	Citoplasma	↑4,12	0,001	1
Q60931	Vdac3	VDAC-3	Membrana mitocondrial externa	↑4,11	0,001	3
Q61292	Lamb2	Laminina subunidad beta-2	Matriz extracelular	↑3,75	0,004	1
Q791V5	Mtch2	Transportador mitocondrial 2	Membrana mitocondrial interna	↑3,58	0,007	1
Q9ES82	Popdc2	Proteína 2 conteniendo el dominio Popeye	Membrana	↑3,33	0,018	1
Q9CRY7	Gdpd1	Proteína 1 conteniendo el dominio glicerofosfodiesterfosfodiesterasa	Membrana	↑3,31	0,018	1
Q9D1R1	Tmem 126b	Proteína transmembrana 126B	Membrana	↑3,29	0,019	1
D3ZX78	Vom 2r16	Proteína Vom2r16	Membrana	↑3,28	0,019	1
Q61941	Nnt	NAD(P) transhidrogenasa	Membrana mitocondrial interna	↓2,99	0,046	12
Q9R0Y5	Ak1	Adenilato quinasa isoenzima 1	Citoplasma	↓3,20	0,025	4
Q3UJH8	Got1	Aspartatoamino transferasa	Citoplasma	↓3,94	0,002	1
Q8K3Q4	Actn2	alfa 2 Actinina		↓4,73	8,16 E-05	1
Q3V0K9	Pls1	Plastina-1	Citoplasma	↓15,9	0	1
Q6TUF7	LRRGT 00087			↓25,1	0	1

Las proteínas identificadas en el ensayo proteómico fueron analizadas *in silico* usando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA), con el fin de establecer las rutas canónicas afectadas por la sobreexpresión de la COX-2 en el cardiomiocito. Considerando proteínas con cambios superiores a 1,5 veces y un valor p menor de 0,05, las vías más significativas correspondían a

glicolisis/gluconeogénesis, fosforilación oxidativa y disfunción mitocondrial (Figura 28).

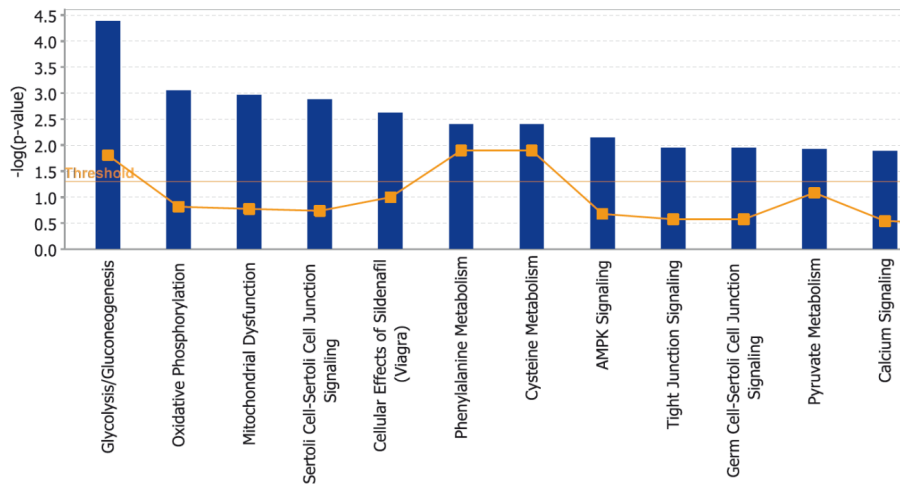


Figura 28. Las 10 vías metabólicas más afectadas por la expresión de hCOX-2 en cardiomiocitos de ratón. El análisis bioinformático fue hecho con el software IPA. Las vías se presentan según su *p value*.

Como puede observarse en la Tabla 3, además de la proteína Porina o VDAC (del inglés Voltage Dependent Anion Channel) que es la proteína fundamental para el intercambio de metabolitos y iones entre el citosol celular y la mitocondria, el perfil proteómico de los cardiomiocitos de los animales transgénicos estaba dominado por proteínas relacionadas con la cadena respiratoria (Figura 28).

Empleamos el método estadístico QUIXOT creado por el grupo del Dr. J. Vázquez para calcular la probabilidad de categoría de cambiar de significativamente con respecto al total de categorías, considerando en las gráficas el error cometido durante la cuantificación (Jorge y col. 2009). A partir

de este análisis se infirió que los cardiomiocitos aislados de los animales con expresión constitutiva de hCOX-2 presentaban un aumento grupal de las proteínas del complejo IV de la cadena respiratoria (Figura 29); si bien el aumento absoluto e individual de cada proteína no era demasiado elevado, era el incremento del conjunto de proteínas del complejo IV lo que era más significativo (Figura 29).

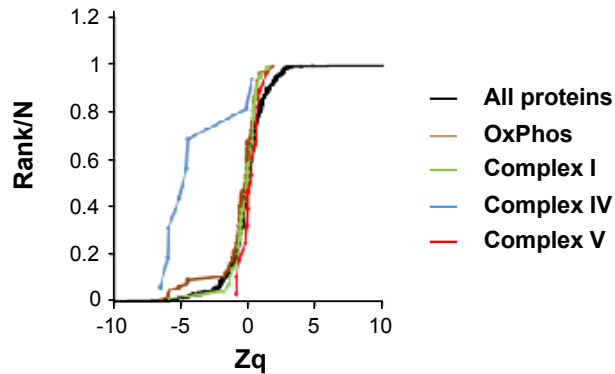


Figura 29. Resultado del análisis proteómico de cardiomiocitos. Análisis estadístico de los datos obtenidos ajustando a la curva de normalidad (All proteins). Los datos negativos implican un aumento de expresión.

En una etapa siguiente, se comprobó si este perfil proteico estaba presente también en mitocondrias aisladas de corazón de estos ratones que representa una muestra más pura y enriquecida en las proteínas de interés. Se encontró, que en este experimento el perfil proteico era semejante al observado en los cardiomiocitos aislados.

Tabla 4. Proteínas diferencialmente expresadas en mitocondrias aisladas de corazones de animales TGhCOX-2. Se presentan ordenadas según su cambio de expresión. El valor normal estandarizado (Zq) se obtuvo dividiendo el log2 de cada proteína por su valor de varianza (Jorge y col. 2009). FDRq, tasa de falsos positivos.

ID	Gen	Descripción	Localización subcelular	Zq	FDRq	Nº de péptidos
P00405	Mtco2	Citocromo c oxidasa, subunidad 2	Membrana mitocondrial interna	↑2,54	0,191	8
Q60932	Vdac1	VDAC-1	Membrana mitocondrial externa	↑2,21	0,268	10
P56392	Cox7a1	Citocromo c oxidasa, subunidad 7A1	Membrana mitocondrial interna	↑2,00	0,361	1
P19783	Cox4i1	Citocromo c oxidasa, subunidad 4 isoforma 1	Membrana mitocondrial interna	↑1,05	0,875	11
P19536	Cox5b	Citocromo c oxidasa, subunidad 5B	Membrana mitocondrial interna	↑0,70	1,001	4
Q60930	Vdac2	VDAC- 2	Membrana mitocondrial externa	↑0,57	1,006	7
P12787	Cox5a	Citocromo c oxidasa, subunidad 5A	Membrana mitocondrial interna	↑0,10	1,030	6
Q791V5	Mtch2	Transportador mitocondrial 2	Membrana mitocondrial interna	↑0,04	0,998	5
Q60931	Vdac3	VDAC-3	Membrana mitocondrial externa	↓0,32	1,052	5
P00397	Mtco1	Citocromo c oxidasa, subunidad 1	Membrana mitocondrial interna	↓0,65	0,985	2
Q9D8B4	Ndufa11	1 alfa NADH deshidrogenasa subunidad 11 [ubiquinona]	Membrana mitocondrial interna	↓1,34	0,712	2
Q61941	Nnt	NAD(P) transhidrogenasa	Membrana mitocondrial interna	↓4,27	0,002	25

1.3. Recuperación de mitocondrias a partir de tejido

Una de las cuestiones a considerar sobre el aumento de las proteínas mitocondriales observado en muestras con expresión constitutiva de ciclooxigenasa-2 humana (hCOX-2), era evaluar si el número de mitocondrias por mg de tejido cardíaco era diferente entre las muestras de ratones transgénicos (TG) y los no transgénicos (NO TG).

Para esto hicimos un análisis en 22 animales divididos equitativamente según edad y peso en los siguientes tres grupos: NO TG, TG y TG + DFU.

Se extrajo cada corazón, se limpió de tejidos acompañantes, fue pesado en balanza analítica de alta sensibilidad y a continuación, se procedió al aislamiento de las mitocondrias de cada uno. Para los cálculos se refirió la cantidad de proteína aislada de mitocondria con el peso de la porción de tejido de la que provenía.

En general, los ratones no transgénicos, transgénicos y transgénicos tratados con el inhibidor específico de COX-2, DFU, tienen una recuperación similar de mitocondrias y no se encuentran diferencias significativas entre los diferentes grupos analizados (Figura 30).

1.4. Biogénesis mitocondrial

Los resultados anteriores apuntaban a que el incremento en las proteínas mitocondriales no era debido a un incremento en la cantidad de mitocondrias.

Para confirmar definitivamente este dato, analizamos el número y estructura de las mitocondrias usando microscopía electrónica.

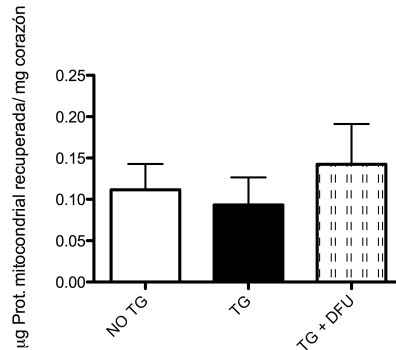


Figura 30. Recuperación mitocondrias por mg de tejido. Se representa los µg de proteína mitocondrial aislada por mg de corazón. n=8 en TG DFU y n=7 en grupos DMSO

Tras fijar los corazones en glutaraldehído, en condiciones que asegurasen la integridad mitocondrial se incluyeron en resina epoxi y se realizaron secciones ultrafinas de 60 nm montadas en rejillas de níquel, tras lo cual se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

El número de mitocondrias detectadas no fue significativamente diferente entre los corazones de los animales control y los animales transgénicos (Figura 31A). Igualmente, no se encontraron diferencias en la longitud media de las mitocondrias en ambos grupos (Figura 31B), ni observamos diferencias estructurales en las crestas mitocondriales (Figura 31C-D).

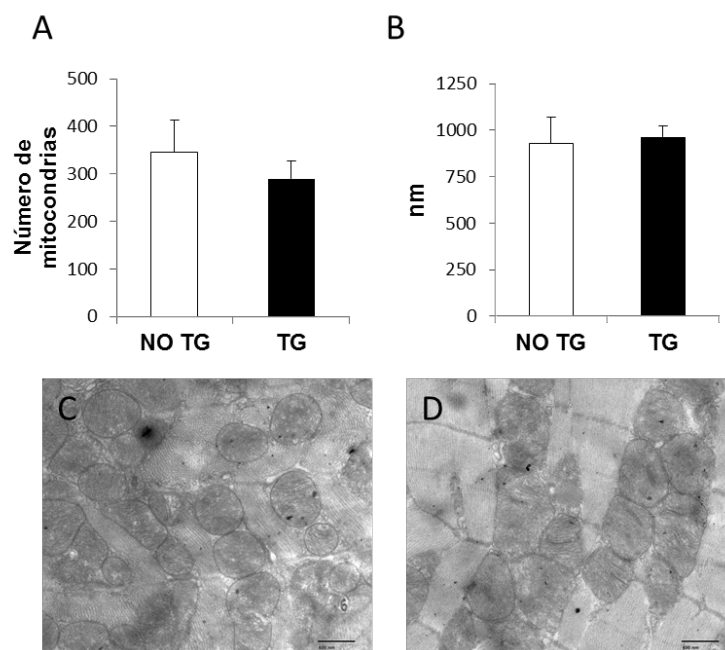


Figura 31. Microscopía de transmisión de electrones llevada a cabo en corazones de ratones control (NO TG; n=6) y ratones que sobreexpresan hCOX-2 específicamente en cardiomiocitos (TG; n=6) de 12 semanas de edad. (A) El número de mitocondrias se contó en 15 secciones de cada muestra a una magnificación x1200. Datos representan el promedio obtenido en cada sección \pm SD. (B) Longitud de las mitocondrias analizadas en 10 secciones de cada muestra a una magnificación x3000. Datos representan el promedio obtenido en cada sección y por animal \pm SD. (C-D) Imágenes representativas de corazones de animal control (C) y transgénico (D). Magnificación x6000, barra de escala=600nm.

1.5. Análisis de los complejos respiratorios mitocondriales por inmunodetección

Para validar los resultados obtenidos en el análisis del perfil proteico de ratones con expresión constitutiva de hCOX-2 a partir de sus cardiomiocitos o de sus mitocondrias aisladas, decidimos analizar la expresión de los complejos respiratorios mitocondriales por la técnica de western blot. Para este experimento,

hemos trabajado con mitocondrias aisladas por grupos de muestras (Pool) siendo estas de animales transgénicos (TG) o no transgénicos (NO TG).

En un primer paso, con el fin de acercarnos al estudio de todos los complejos de la cadena respiratoria, utilizamos una mezcla comercial de anticuerpos contra diferentes subunidades de los complejos respiratorios, específicamente: Anti CI: 20 KDa, Anti CII: 30 KDa, Anti CIII core 2: 48 KDa, Anti sub I CIV: 40 KDa y Anti ATPsa s CV: 55 KDa. En la Figura 32A se muestran los complejos respiratorios obtenidos a partir 30 µg de mitocondrias aisladas por carril en gel al 10 % acrilamida/bisacrilamida (detalles en Material y Métodos). No se detectaron cambios en la expresión de las subunidades estudiadas en muestras de proteínas aisladas de mitocondrias de ratones NO TG y TG.

A continuación, se procedió al estudio individual de las subunidades II y IV del complejo IV en geles con un 15 % de acrilamida/bisacrilamida. La selección de estas subunidades respiratorias para el estudio se realizó de acuerdo a los valores estadísticos del análisis proteómico (mostrados en la Tabla 3), siendo los criterios: la cuantificación, el error estadístico y el número de péptidos contabilizados por proteína.

La Figura 32B (panel izquierdo) muestra una foto representativa de la expresión de la Sub II del CIV; la densitometría de la banda específica frente a la banda de NDUFA5 utilizada como control de carga (Figura 32B panel inferior izquierdo), revela una expresión levemente aumentada de esta subunidad en la

muestra TG. Por su parte, el resultado de la densitometría de la subunidad IV del complejo IV, indica una expresión similar en ambas muestras, NO TG y TG utilizando como control de carga la proteína NDUFA5 del complejo CI, (Figura 32B, paneles derechos).

Por otro lado, estudiamos la proteína Porina, también llamada VDAC, cuya expresión apareció fuertemente modificada en el análisis proteómico, como se observa en la Tabla 3. En la Figura 32C se muestra la expresión de esta proteína en gel al 10 % acrilamida/bisacrilamida; el estudio de la densidad de las bandas reveló una expresión significativamente mayor en las muestras TG respecto de las NO TG (Figura 32C, panel inferior). Como control de carga se utilizó la proteína de expresión mitocondrial TOMM20.

1.6. Análisis de los supercomplejos respiratorios mitocondriales por inmunodetección

Además de los complejos respiratorios tradicionalmente conocidos, se ha descrito la existencia de asociaciones entre estos y han recibido el nombre de supercomplejos respiratorios [revisado en (Acin-Perez y Enriquez 2014; Genova y Lenaz 2014; Vartak y col. 2013)].

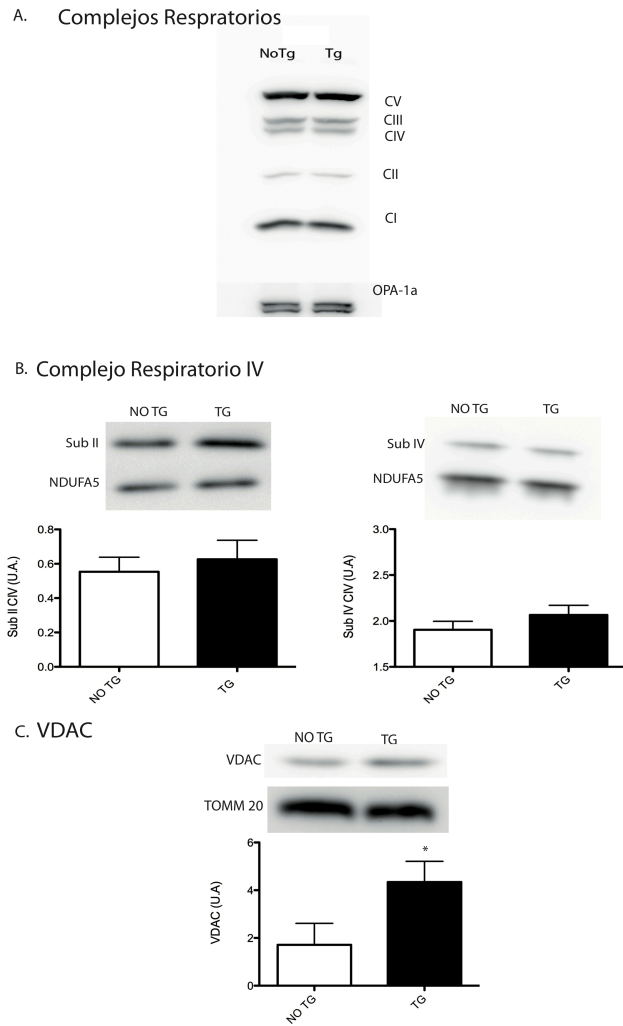


Figura 32. Análisis de la expresión de los complejos respiratorios mitocondriales en condiciones desnaturizantes y reductoras. 30 μ g por calle de gel acrilamida-bisacrilamida al 10 % (VDAC y Mitoprofile) o 15 % (subII y sub IV). A. Complejos respiratorios CI, CII, CIII, CIV y CV en mitocondrias aisladas analizados con la mezcla de anticuerpos Mitoprofile. B, panel derecho. Expresión de la subunidad II del CIV. B, panel izquierdo. Expresión de la subunidad IV del CIV. C. Expresión de VDAC en mitocondria Se observa una diferencia significativa con un $p < 0,05$. $n=5$.

Dado que no encontramos diferencias significativas en electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras mediante el uso de anticuerpos

específicos anti Sub II y Sub IV, decidimos profundizar nuestro estudio analizando la presencia de los supercomplejos respiratorios en condiciones nativas en las mitocondrias aisladas de ratones con expresión cardíaca estable de hCOX-2 y en ratones control. Se detectó la formación de 3 supercomplejos (Figura 33A):

- El supercomplejo formado por CI-CIV, banda *1
- El supercomplejo de CIII y CIV, banda *2
- El supercomplejo de CI-CIII-CIV, banda *3 y además se detectó una banda adicional (banda 4*) que corresponde al CIV.

Con el anticuerpo que reconoce la subunidad NDUFA5 que forma parte del CI, se encuentra el mismo perfil de bandas entre las muestras NO TG y TG (Figura 33A, segundo panel). Sin embargo, con el anticuerpo anti CIII en la muestra TG es posible reconocer una banda prácticamente imperceptible en la muestra NO TG, observándose también una mayor expresión de todas las bandas para la muestra TG (Figura 33A, tercer panel). El resultado de la detección del anticuerpo anti subunidad II del CIV demuestra que las bandas superiores de la muestra TG prácticamente no están expresadas en la muestra NO TG (Figura 33A, cuarto panel). Los resultados de este último indican que la intensidad de las bandas en las que participa el CIV son mayores en los ratones TG que en los NO TG (Figura 33B).

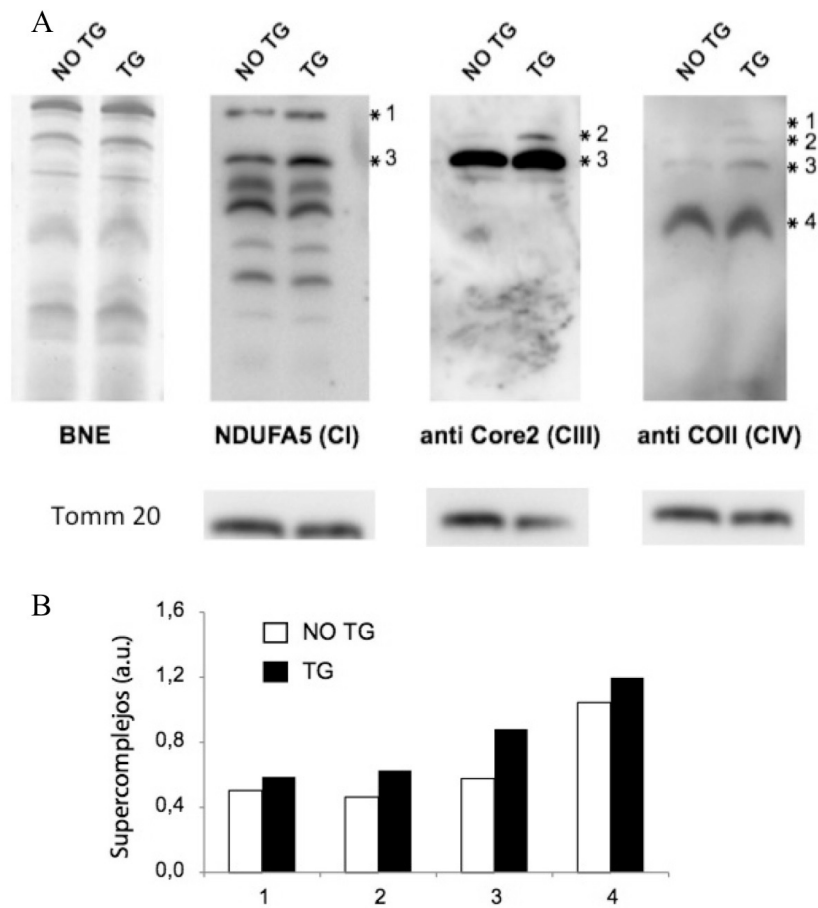


Figura 33. Expresión de supercomplejos respiratorios. A. Primer panel, gel nativo teñido con Azul de Coomassie (BNE). Membranas marcadas con anticuerpos anti CI, CIII y CIV (paneles 2º, 3º y 4º). Se sembraron 100 µg de mitocondrias aisladas frescas por calle. B. Cuantificación de bandas obtenidas correspondientes a los supercomplejos. Utilizando TOMM 20 como control de carga.

1.7. Expresión de ARNm de las subunidades I y II del CIV y VDAC

Para elucidar si las alteraciones en los niveles de proteínas eran debidas a cambios en la transcripción, se estudió el nivel de expresión génica de la

subunidad I del complejo respiratorio IV (*Sub I*), la subunidad II del mismo complejo (*Sub II*) y el gen *Vdac*. La elección de estos tres genes se llevó a cabo teniendo en cuenta las diferencias observadas en los niveles de expresión de la proteína codificada encontrados en el análisis proteico. Así, la subunidad II y la proteína VDAC mostraban mayores niveles de expresión, mientras que la subunidad I no variaba y, por ello, la consideramos como control del análisis. Para el experimento se utilizaron tres grupos de muestras: animales control (NO TG), animales que expresaban la hCOX-2 en el cardiomiocito (TG) y los mismos animales tratados con el inhibidor DFU (TG DFU).

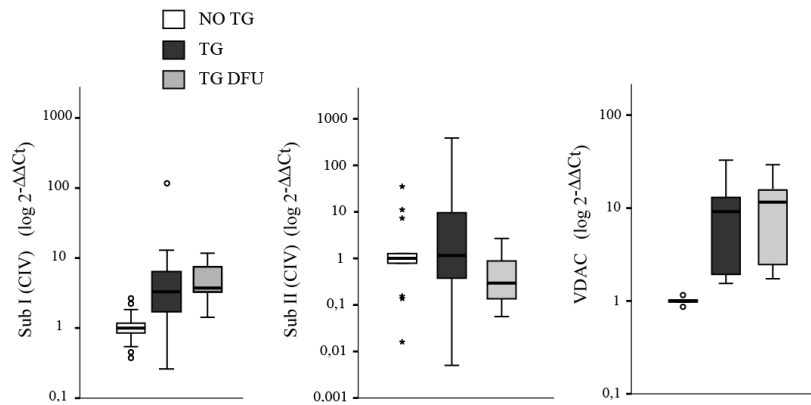


Figura 34. Expresión génica de la subunidad I (*Sub I*), II (*Sub II*) del complejo IV de la cadena respiratoria y del gen *Vdac*. El análisis de la expresión se realizó a partir de ratones silvestres (NO TG, n=14), ratones que sobreexpresan hCOX-2 (TG, n=15) y animales transgénicos tratados con DFU (TG DFU, n=9). Los cambios de expresión se representan como log de la segunda derivada del Ct, normalizada con respecto a la cantidad de GAPDH y tomando como control los valores obtenidos en los animales NO TG. Los resultados se grafican como medias \pm SD

En cualquiera de los tres genes estudiados, dada la variabilidad inter e intramuestras, no observamos diferencias significativas bien entre grupo control y

el grupo transgénico (como es el caso de la *Sub II*), como entre el grupo transgénico y transgénico DFU (especialmente evidente en el gen *Vdac*) (Figura 34).

Para corroborar que la enzima hCOX-2 era activa en los animales transgénicos, medimos la concentración de PGE₂ en cada una de las muestras utilizadas en este experimento. Encontramos también, una alta variabilidad en los tres grupos de muestras estudiados. Como puede observarse en la Figura 35, los animales transgénicos presentaban niveles de PGE₂ significativamente elevados, mientras que el grupo de animales transgénicos tratados con DFU presentaban valores de PGE₂ similares al grupo NO TG, indicando que había sido efectivo el tratamiento con el inhibidor de COX-2.

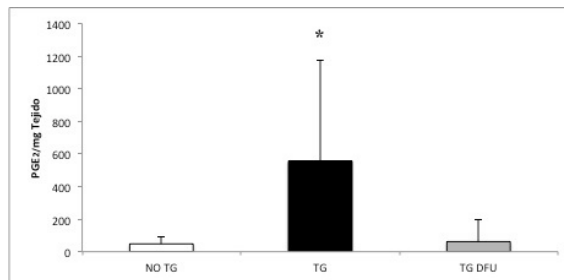


Figura 35. Niveles de PGE₂ en las muestras estudiadas para la expresión génica de sub I y sub II de CIV y VDAC. Los resultados se grafican como medias \pm SD. * p 0,01. NO TG n= 14. TG n = 15 y TG DFU n=9.

1.8. Consumo de oxígeno en fibras cardíacas

Dado que los resultados de la proteómica destacaban una mayor expresión de proteínas mitocondriales en los ratones con expresión constitutiva de hCOX-2

decidimos estudiar la funcionalidad de las mitocondrias de estos animales con respecto a las de animales control. Así en un primer acercamiento a la función mitocondrial medimos el consumo de oxígeno.

Tras el aislamiento de fibras cardíacas de ratones NO TG y TG se midió su consumo de oxígeno utilizando un electrodo de Clark. La media de consumo de O_2 para el grupo NO TG fue de 2,4 $\text{pmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$ de tejido y la correspondiente al grupo TG de 3,5 $\text{pmolO}_2/\text{min}/\text{mg}$ de tejido (Figura 36). Lo que corresponde a un aumento del 45,8 % el consumo de oxígeno del grupo TG respecto al NO TG.

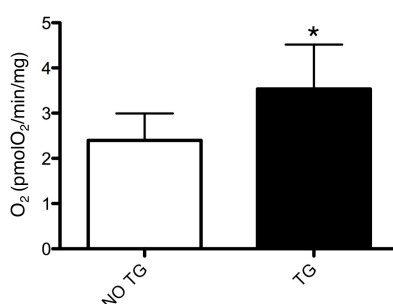


Figura 36. Consumo de oxígeno en fibras cardíacas. Se aislaron y permeabilizaron fibras cardíacas de ratón NO TG y TG. Los resultados se grafican como medias \pm SD. * $p < 0,01$. $n=3$ por triplicado.

1.9. Determinación de la actividad enzimática de Citocromo c Oxidasa

Para evaluar si la expresión aumentada de las subunidades de la citocromo c oxidasa revelada por el análisis proteómico, se veía reflejada en la actividad de la enzima, se realizaron determinaciones de la actividad enzimática específica de dicha enzima por espectrofotometría en homogenados de corazón. Para ello se

realizaron experimentos en los que se revelaba la relación entre hCOX-2 y la actividad enzimática del CIV. Se trabajó entonces con los siguientes tres grupos de ratones: NO TG, TG y TG tratados con DFU intraperitoneal a concentración 5 mg/Kg durante tres días (TG + DFU) y una dosis de refuerzo 40 minutos antes de ser sacrificados. Debido a que el DFU se disuelve en DMSO, los grupos TG y NO TG recibieron la misma concentración de DMSO, por la misma vía, que el grupo tratado con DFU, de 0,5 %.

Se observó que los ratones transgénicos con expresión constitutiva de hCOX-2 en corazón presentan mayor actividad enzimática del CIV (Figura 37). Este efecto es específico, ya que los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática del CIV de la cadena respiratoria en el grupo de ratones transgénicos tratados con el inhibidor selectivo de COX-2 disminuyen a valores similares a los observados para el grupo control (Figura 37).

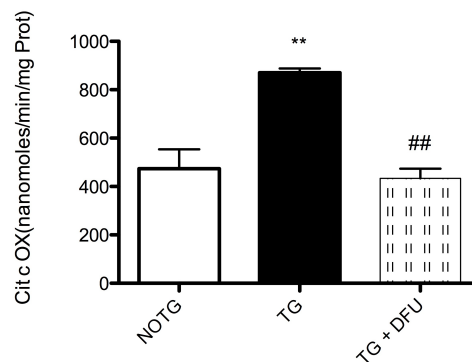


Figura 37. Efecto de la inhibición de COX-2 en la actividad del CIV. Ratones transgénicos (TG) con expresión de hCOX-2 se trataron con DFU y se comparó la actividad enzimática del CIV con respecto a ratones NO TG y TG sin inhibición. Los resultados se grafican como medias \pm SD. $p < 0,05$. ** NO TG vs TG. ## TG vs TG + DFU. $n = 9$ por triplicado.

De cada muestra se guardó una pequeña porción de corazón que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almaceno a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en la determinación de la concentración de PGE_2 . La determinación de la concentración de PGE_2 demostró la correcta funcionalidad de la enzima hCOX-2 y que dicha enzima responde al tratamiento con el inhibidor específico DFU (Figura 38).

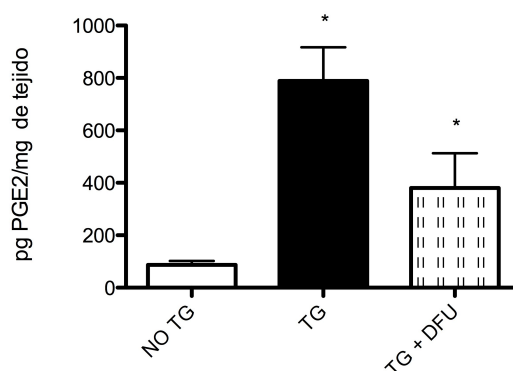


Figura 38. Determinación de PGE_2 en las muestras de corazón de ratones TG, NO TG y TG DFU en los cuales se midió la actividad Citocromo c Oxidasa. El ratio de PGE_2 TG/NO TG = 9. Los resultados se grafican como medias \pm SD.* $p < 0,01$ entre NO TG vs TG y TG vs TG+DFU.

1.10. Relación entre CIV y complejos CII + CIII

Otra medida experimental que nos permitió comparar la actividad del CIV entre los ratones TG con expresión estable de hCOX-2 y los NO TG consistió en medir la absorbancia del citocromo aa3 propio del CIV y referirla a la

absorbancia de los citocromos pertenecientes a los complejos respiratorios CII y CIII.

Para esta determinación, se trabajó con mitocondrias aisladas de ratones NO TG y TG. La elección de la muestra estuvo fundamentada en la necesidad de reducir las absorbancias no deseadas de otros componentes celulares como por ejemplo la hemoglobina.

Los resultados indican que existe una tendencia a un mayor contenido de CIV en el grupo transgénico versus el grupo control reforzando los resultados anteriores de un aumento en la actividad citocromo c oxidasa (Figura 39).

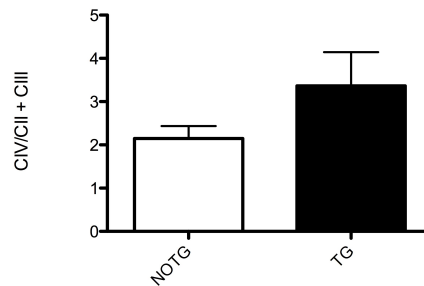


Figura 39. Ratio CIV/ CII + CIII en ratones TG y NO TG. Los resultados se grafican como medias \pm SD. n= 3

1.11. Determinación de los niveles de ATP en el modelo animal

Otro indicador de la función mitocondrial es el nivel intracelular de ATP. En condiciones de normoxia, más del 95 % del ATP en el corazón se produce en la fosforilación oxidativa de la mitocondria, en el Complejo V o ATP Sintasa. El

resto proviene de la glucólisis y mucha menor medida del ciclo de Krebs (Doenst y col. 2013).

Hemos medido el contenido de ATP mediante el uso de un ensayo de bioluminiscencia y hemos elegido la fracción apical de cada corazón para estandarizar la toma de muestra.

Los resultados indican que los ratones TG no solo tienen una expresión constitutiva de hCOX-2 como vimos previamente, sino que además presentan mayor nivel de ATP en el corazón que los NO TG (Figura 40).

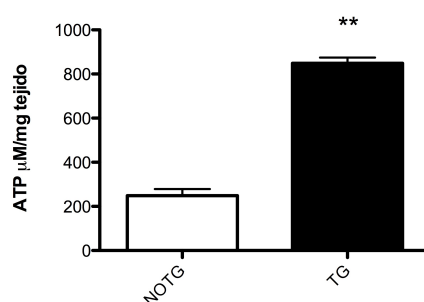


Figura 40. Nivel de ATP. Se midió la concentración de ATP por mg de tejido. La determinación se hizo en pool de homogenados. Los resultados se grafican como medias \pm SD. ** p 0,05. n= 4.

1.12. Tratamiento con Isoproterenol de ratones NO TG y TG con expresión constitutiva de hCOX-2 en corazón

Una vez determinado el efecto de la expresión de hCOX-2 en la cadena respiratoria, quisimos profundizar en el estudio de la actividad del CIV en la fisiopatología cardíaca en un modelo in vivo de daño cardíaco. Para ello se aplicó un tratamiento con isoproterenol (ISO) a dosis diarias subcutáneas de 150 mg/kg

durante 5 días, como se ha descrito en la bibliografía (Hsu y col. 2013). El isoproterenol es una sustancia simpaticomimética que actúa a nivel de los receptores β -adrenérgicos. Sobre arteriolas y músculo liso produce vasodilatación y sobre el corazón tiene un efecto inotrópico-cronotrópico positivo. El isoproterenol es utilizado en investigación para producir lesión en el corazón (Faulx y col. 2005), y aunque la información que aporta no es semejante al método de ligación de arterias coronarias, resulta útil para estudiar el funcionamiento del tejido cardíaco ante una agresión y siendo de menor complejidad en su realización.

Los resultados indican que los ratones con expresión constitutiva de hCOX-2 en corazón tratados con isoproterenol presentaban mayor actividad enzimática específica del CIV que la observada para el grupo NO TG con el mismo tratamiento (Figura 41). El tratamiento con isoproterenol prácticamente no modificó la actividad enzimática encontrada para la enzima citocromo c oxidasa, de este modo la relación entre TG y NO TG se mantuvo invariable (Figura 41). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre NO TG salino y NO TG ISO (Figura 41).

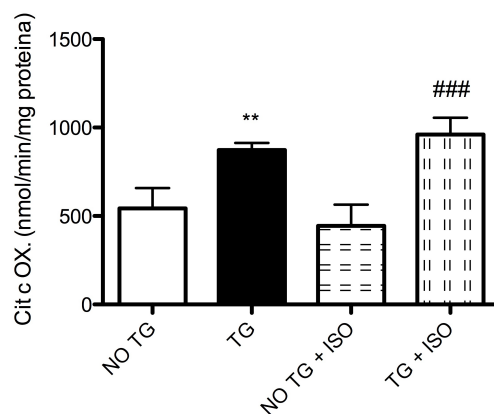


Figura 41. Actividad del CIV en daño cardíaco mediado por Isoproterenol. Determinación de la actividad de la citocromo c oxidasa (CIV) medida por espectrofotometría en homogenados de corazón en animales NO TG y TG con tratamiento de ISO SC 150 mg/Kg durante 5 días. Los resultados se grafican como medias \pm SD. * $p < 0,05$ NO TG vs TG, # $p < 0,01$ NO TG + ISO vs TG + ISO. $n = 5$

Histológicamente, el tratamiento con isoproterenol causó, en ambos grupos de animales, inflamación multifocal e inicio de fibrosis, mostrando los mismos signos de malignidad (Figura 42A-B). El uso de la tinción tricrómica de Masson, una técnica de coloración especial que permite visualizar fibras de colágeno, ratificó lo observado con la tinción de hematoxilina/eosina al no observarse diferencias significativas entre los grupos de animales estudiados (Figura 42C-D)

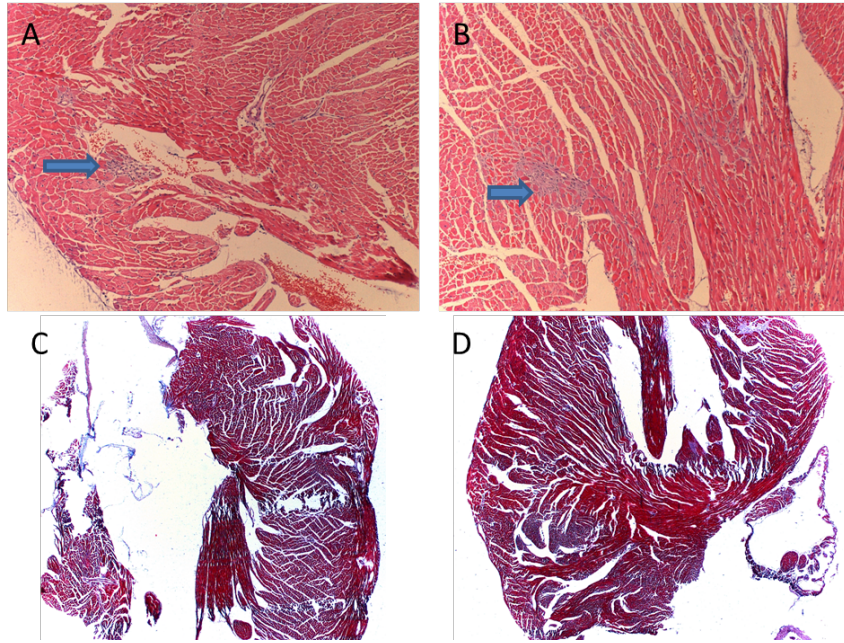


Figura 42: Análisis histológico de ratones tratados con isoproterenol. Animales control (A, C) o transgénicos (B,D) fueron tratados durante 5 días con 150 mg/kg de isoproterenol sacrificando a los animales 48 h después de la última dosis suministrada. Secciones parafinadas de 4 μ m fueron teñidas con hematoxilina/eosina (H&E; A-B) o tinción tricrómica de Masson para analizar lesiones (C-D). Se muestran imágenes representativas de las lesiones fibróticas detectadas (flechas azules). Las imágenes teñidas con H&E fueron tomadas con un objetivo 20X mientras que las correspondientes a la tinción de Masson fueron tomadas con un objetivo 2,5X.

CAPITULO 2. ESTUDIO DEL PAPEL DE COX-2 EN LA MITOCONDRIA EN UNA LINEA DE CELULAS CARDIACAS

2.1. Caracterización de la línea celular H9c2 hCOX-2

Para profundizar nuestro estudio sobre el papel de hCOX-2 en la función cardíaca en el modelo animal, decidimos generar un modelo celular para este estudio, y para ello utilizamos las células H9c2, una línea cardíaca de rata que ha sido utilizada y validada como modelo de cardiomiocitos (Watkins y col. 2011; Zordoky y El-Kadi 2007).

Estas células, H9c2, fueron transfectadas con vector vacío (CAGIP) o con vector conteniendo la secuencia hCOX-2 (CAGIP-hCOX-2), una vez obtenidos los clones resistentes a la selección con puromicina con expresión de hCOX-2 y los clones transfectados con el vector vacío CAGIP (CONTROL) procedimos a caracterizar la línea celular buscando la expresión de hCOX-2 a distintos niveles celulares. Hemos trabajado en todos los experimentos con una población policlonal de células resistentes seleccionadas con puromicina, en ningún caso hemos individualizado clones. En el panel A de la Figura 43 se presenta una foto tomada con microscopía óptica de células H9c2 antes de ser transfectadas. En este nivel de confluencia, algunas células comienzan a adquirir la forma fusiforme que puede llegar a ser muy alargada y común a todas las células de la superficies de cultivo. En la Figura 43B se muestran las bandas de hCOX-2 obtenidas utilizando la técnica de western blot a partir de extractos proteicos

totales. En el panel C se grafican los niveles de PGE₂ obtenidos en sobrenadantes de cultivos de células sin transfectar, en células control (transfectadas con el vector vacío) y en poblaciones policlonales con expresión de hCOX-2.

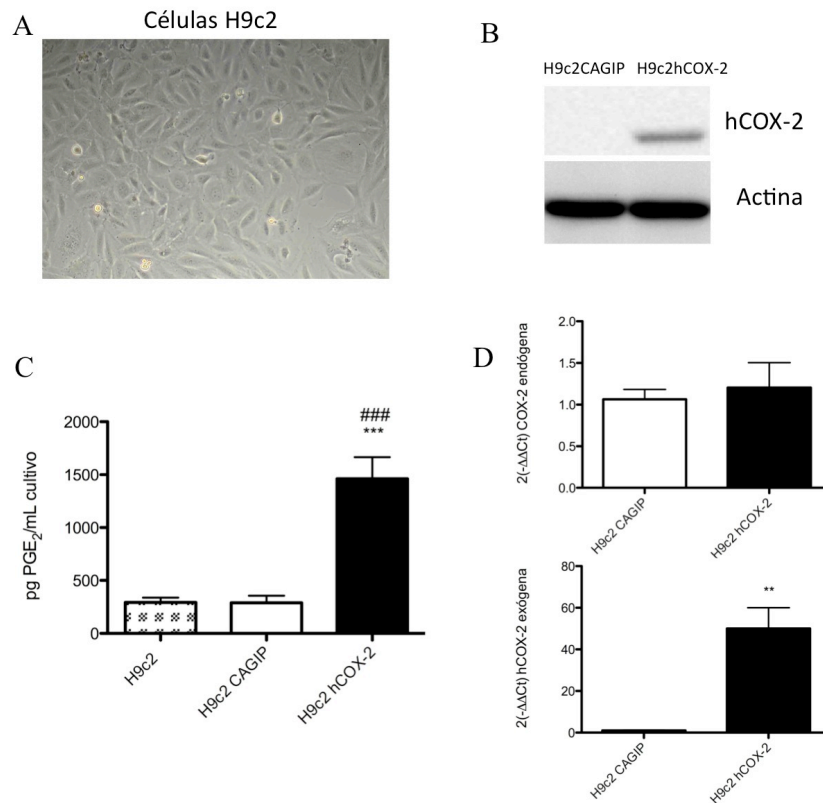


Figura 43. Caracterización de la línea policlonal hCOX-2 obtenida por transfección estable de células H9c2. A. Fotografía a 20X de células H9c2. B Expresión proteica de hCOX-2 en clones estables Control (transfectados con vector vacío CAGIP) y en clones hCOX-2 (CAGIPhCOX-2) en extractos proteicos totales utilizando western blot en gel al 10 % acril/bisacril. El anticuerpo utilizado monoclonal anti hCOX-2 (Stressgen) y como control de carga actina (Sigma Aldrich). C. Nivel de expresión de PGE₂ en cultivo celular. H9c2 CONTROL vs H9c2 hCOX-2 *** p<0,001. H9c2 vs H9c2 hCOX-2 ### p<0,001. D. Expresión de ARNm para la COX-2 endógena y exógena. Los resultados se grafican como medias ± SD. p 0,05. N= 5.

La comparación de la expresión de ARNm de COX-2 endógena y de hCOX-2, en condiciones basales de cultivo, resultó en valores similares de expresión de COX-2 endógena (de rata) en las células control y en aquellas que contenían hCOX-2 (Figura 43D, panel superior). Sin embargo, cuando se midió la expresión de hCOX-2 la diferencia fue alrededor de 50 veces superior en aquellas células que contenían el gen humano (Figura 43D, panel inferior).

2.2. Localización de hCOX-2 en células en condiciones basales

La localización subcelular normal de las ciclooxigenasas es la región perinuclear y el retículo endoplásmico. Nos preguntamos entonces sí tras inducir la expresión de hCOX-2 en nuestro modelo se imitaría la localización de la proteína endógena o sí, al encontrarse en una mayor cantidad, se depositaría en alguna otra región.

Tras la obtención de extracto proteico total, citosólico y enriquecido en mitocondrias de células control y de células transfectadas establemente con hCOX-2 (hCOX-2), se procedió a buscar la localización de hCOX-2 en los diferentes extractos mediante western blot. Como se puede observar en la Figura 44, hCOX-2 esta ausente en todos los extractos obtenidos a partir de las células control (H9c2 CAGIP) quedando demostrado que el anticuerpo utilizado es específico para la especie humana. hCOX-2 ha sido detectada en extracto total y en el extracto enriquecido en mitocondrias pero está ausente en citosol.

Esta localización fue observada también para células hCOX-2 tratadas con DFU.

Aunque esta aparición en mitocondrias podría ser debida a una contaminación con membranas del retículo endoplásmico en la fracción del extracto mitocondrial, se ha descrito la detección de COX-2 en mitocondrias de líneas tumorales mediante el uso de microscopia (Liou y col. 2005).



Figura 44. Localización subcelular de hCOX-2 en extractos celulares de células transfectantes estables con hCOX-2, células con tratamiento de inhibición de hCOX-2 y células control. Se cargaron 20 µg de extracto proteico en cada carril de gel al 8 % acrilamida/bisacrilamida y se detectaron con el anticuerpo anti-hCOX-2 (Cayman). 1- Control extracto total. 2- Control extracto citosólico. 3- extracto mitocondrial. 4- hCOX-2 extracto total. 5- hCOX-2 extracto citosólico. 6- hCOX-2 extracto mitocondrial.

2.3. Medición de la respiración celular

El análisis proteómico de células con expresión de hCOX-2 y las células control resultó en un perfil similar al obtenido en el modelo animal aunque con menor robustez estadística (resultados no mostrados). Con la premisa de que la expresión constitutiva de hCOX-2 tenía como consecuencia una mayor expresión de proteínas mitocondriales, decidimos medir la respiración celular utilizando un electrodo de Clark. Con este fin se hicieron distintos experimentos utilizando DFU, el inhibidor selectivo de COX-2 en células H9c2 hCOX-2, y la adición de PGE₂ exógena a células control (Mayoral y col. 2008). Se trataron las células

H9c2 control con 105 pg/ml de PGE₂ exógena durante 3 días previos al experimento y en paralelo células H9c2 hCOX-2 con DFU a concentración final de 5 μM durante el mismo tiempo.

Se observó que las células que expresaban establemente el enzima hCOX-2 presentaban mayor consumo de oxígeno por unidad de tiempo, lo que se corresponde con un enzima funcional y correlaciona con los altos niveles de PGE₂ encontrados en los sobrenadantes del medio de crecimiento de estas células en los distintos experimentos (Figura 45).

Cuando se midió la respiración celular en presencia del inhibidor DFU se observó una disminución del nivel de consumo de oxígeno en las células transfectadas de forma estable con hCOX-2, alcanzando entonces los niveles observados para las células control. Sin embargo el nivel del consumo de oxígeno no aumentaba en las células control tras la adición de PGE₂ (Figura 45).

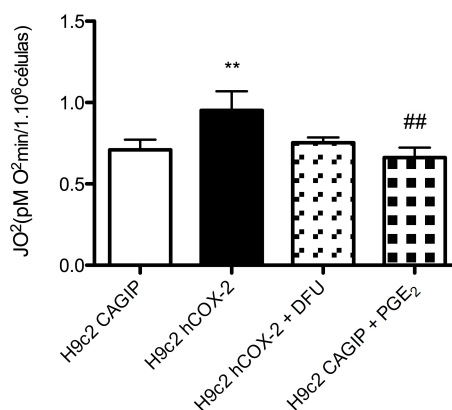


Figura 45. Respiración celular. Efecto de DFU y PGE₂ en la respiración. Los resultados se grafican como medias ± SD. ** ó ## p<0,05. n=9.

2.4. Capacidad de Proliferación en medio aeróbico

Dado el mayor consumo de oxígeno y la localización mitocondrial de hCOX-2, nos preguntamos si la expresión estable de la enzima hCOX-2 confería a las células alguna ventaja o capacidad para desarrollarse en un medio exigente que forzara a la células a utilizar la galactosa como fuente de energía, permitiendo la supervivencia de las células sólo si están son capaces de prescindir de la glucólisis y obtener energía a partir de la fosforilación oxidativa.

En la figura 44 se muestran los resultados obtenidos. No encontramos diferencias en la velocidad de crecimiento para ambas líneas celulares y medios, resultando así que estas células son capaces de vivir y multiplicarse en indistintamente en ambos medios. Pocas líneas celulares presentan esta capacidad de adaptación.

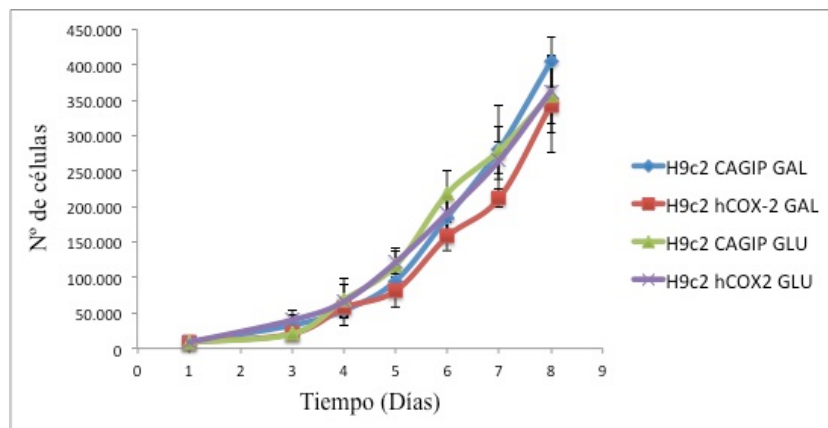


Figura 46. Proliferación celular en medio glucolítico y en medio oxidativo. Se realizó el recuento celular de células control y de células transfectadas estables con hCOX-2 en diferentes medios de crecimiento. n= 3

Rana y col. describieron la capacidad de las células H9c2 de crecer en un medio glucolítico y en un medio oxidativo, con el mismo contenido celular de ATP (Rana y col. 2011),

2.5. Actividad enzimática del complejo IV en extractos celulares

Entre las proteínas con expresión aumentada en las células H9c2 hCOX-2 se identificaron ciertas subunidades del CIV. A raíz de lo cual se decidió analizar entonces, la actividad enzimática específica de este complejo respiratorio por espectrofotometría.

Para determinar la actividad enzimática específica de la citocromo c oxidasa o complejo respiratorio IV (CIV), se obtuvieron extractos proteicos enriquecidos en mitocondrias e incluso mitocondrias aisladas y se empleó el método espectrofotométrico.

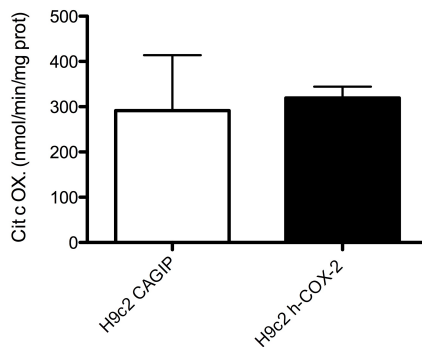


Figura 47. Actividad enzimática del CIV en células de cultivo. Los resultados se grafican como medias \pm SD. n= 4 por triplicado.

Los resultados obtenidos en ambas muestras son coincidentes y revelan que no existen diferencias entre células H9c2 control y células H9c2 hCOX-2 (Figura 47).

2.6. Contenido de citocromo aa3

Para ampliar el estudio de la función mitocondrial en las células H9c2 hCOX-2, se decidió medir el contenido de los grupos hemo aa3 correspondientes a la subunidad II del complejo cuatro (CIV) de la cadena respiratoria. Esta determinación se midió por espectrofotometría en una suspensión celular. La diferente absorbancia a 605 y a 630 nm durante la oxidación y la reducción máxima de este complejo inducida químicamente, se usa para determinar la concentración absoluta del contenido de citocromo c oxidasa (Balaban y col. 1996).

El resultado indica que las células H9c2 que expresan hCOX-2 presentan mayor contenido de citocromo aa3 que aquellas que solo llevaban el vector (Figura 48).

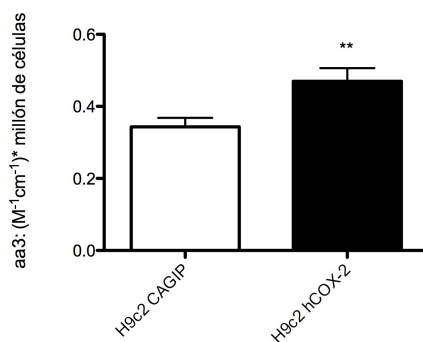


Figura 48. Contenido de aa3 por millón de células en suspensión. Los resultados se grafican como medias \pm SD. N= 3 por triplicado. (** $p < 0,007$).

2.7. Concentración de ATP en el modelo celular

El ATP es el metabolito de transferencia de energía en la célula por excelencia, en condiciones basales es producido mayormente en la mitocondria y es usado a nivel de investigación como parámetro para evaluar la función mitocondrial.

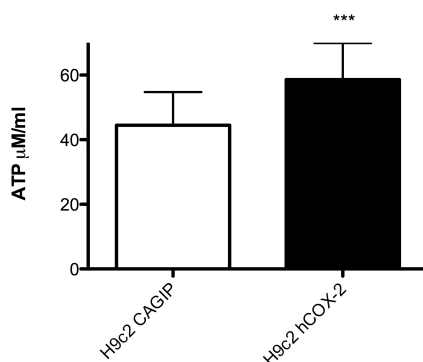


Figura 49. Concentración de ATP en células. Tras obtener el lisado celular, se midió por bioluminiscencia la concentración de ATP de células control y de células hCOX-2. Los resultados se grafican como medias \pm SD. (***) $p < 0,001$. N=15.

La determinación del contenido celular de ATP en las células H9C2, indica que las células que expresan establemente hCOX-2 presentan una mayor concentración de ATP (Figura 49).

2.8. Evaluación de la viabilidad celular en condiciones de Inhibición Metabólica

Nuestro grupo ha describió en 2009 que la expresión constitutiva de hCOX-2, en corazón de los ratones, les confería protección ante una situación de isquemia y reperfusión inducida en un sistema de Langendorff (Inserte y col. 2009). Para estudiar los efectos de la isquemia y reperfusión *in vitro* se utilizan distintos procedimientos. Uno de ellos es tratar las células con una solución de Inhibición Metabólica (IM) que simula una isquemia por la falta de nutrientes y de oxígeno, seguido del reemplazo de esta solución por medio de crecimiento celular que simula la reperfusión y el consecuente aporte de metabolitos (Gottlieb y col. 1996).

Cuando aplicamos este procedimiento a nuestras células y analizamos la viabilidad por el método de MTT, encontramos que las células control y hCOX-2 tienen el mismo porcentaje de viabilidad en condiciones normales de cultivo (Figura 50). Sin embargo existe una diferencia significativa cuando tratamos las células durante 2 hs de inhibición metabólica seguido de 1 hs de reperfusión y para 3 hs de inhibición metabólica seguido de 1 hs de reperfusión (Figura 50).

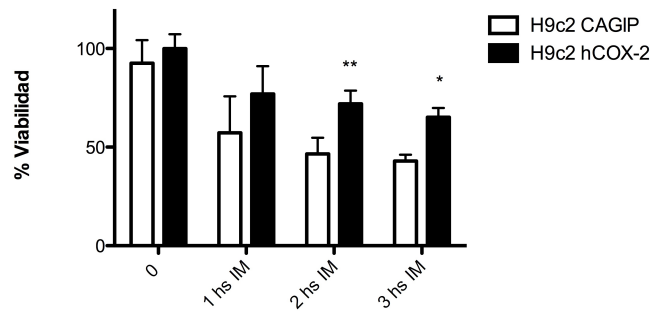


Figura 50. Estudio de la viabilidad celular posterior a inhibición metabólica (IM)-reperusión. Luego de finalizado el tratamiento, se incubaron las células con MTT. Posteriormente se disolvieron los cristales formados y el color obtenido se midió por espectrofotometría (ver Metodología). Los resultados se grafican como medias \pm SD. (CONTROL vs hCOX-2, ** $p < 0,003$ y * $p < 0,006$). $n=5$ por triplicado.

2.8.1 Expresión de ciclooxigenasa-2 durante tratamiento de inhibición metabólica

Estudiamos el comportamiento de la enzima ciclooxigenasa endógena (COX-2) durante el tratamiento de inhibición metabólica por western blot, pero debido a que no encontramos anticuerpos específicos contra la COX-2 de rata (endógena), decidimos trabajar con proteínas de fusión con GFP como herramienta para diferenciar la enzima humana COX-2 exógena de la COX-2 endógena que no tendría GFP. Así las construcciones plasmídicas contenían la secuencia de GFP tanto en el plásmido control (CAGIP-GFP) como en el plásmido codificando la secuencia de hCOX-2 (CAGIP-hCOX-2GFP). Tras obtener transfectantes estables por selección con puromicina, se realizó el tratamiento de inhibición metabólica a distintos tiempos seguido de una hora de

simulación de reperfusión con incubación en medio de crecimiento. Una vez finalizado el tratamiento se obtuvieron los extractos proteicos totales.

Como se puede observar en la Figura 51, la banda correspondiente a la proteína endógena es la banda inferior, mientras que la banda de la proteína de fusión entre hCOX2 y GFP presenta mayor peso molecular y migra menos en el gel. Como control de carga se utilizó actina.

Se puede apreciar que el anticuerpo no reconoce ninguna banda equivalente a hCOX-2-GFP en los extractos provenientes de las células control en los cuales solo se detecta la COX-2 endógena de rata (Figura 51).

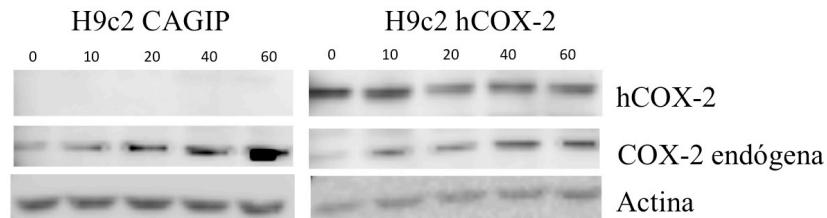


Figura 51. Expresión de COX-2 y hCOX-2 durante tratamiento de IM. Se cargaron 30 μ g de los extractos totales de cada línea y se resolvieron utilizando geles al 10 % acrilamida/bisacrilamida. El anticuerpo primario utilizado fue anti COX-2 Santa cruz ((M19) sc-1747) que reconocía la especie humana y la de rata. 1- Control. 2- Control 10 minutos IM. 3- Control 20 minutos IM. 4- Control 40 minutos IM. 5- Control 60 minutos IM. 6- hCOX₂. 7- hCOX₂ 10 minutos IM. 8- hCOX₂ 20 minutos IM. 9- hCOX₂ 40 minutos IM. 10- hCOX₂ 60 minutos IM

Además se observó un aumento en la expresión de COX-2 endógena durante los distintos tiempos del tratamiento de inhibición metabólica tanto en las células control como en las células que establemente expresan hCOX-2 (Figura 51). Esta respuesta implica que las células perciben el estímulo como una

agresión y desencadenan la expresión de COX-2 como respuesta a él. Sin embargo, la expresión de hCOX-2 en las células establemente transfectadas, se mantiene constante a partir de los 20 minutos de tratamiento.

2.9. Evaluación de la viabilidad celular posterior a tratamiento con CoCl₂

El CoCl₂ es una sal capaz de mimetizar *in vitro* de los mecanismos iniciados en la célula en situaciones de hipoxia o isquemia particularmente el aumento de la expresión del Factor inducible por Hipoxia, HIF-1 α (Jones y Bergeron 2001).

Decidimos estudiar la viabilidad en nuestro modelo celular luego del tratamiento con concentraciones diferentes de CoCl₂ durante 36 horas utilizando para la detección el método del MTT. Trabajamos células H9c2 CAGIP, células H9c2 hCOX-2 y además, con células H9c2 hCOX-2 tratadas con DFU para inhibir hCOX-2 (células H9c2 hCOX-2 + DFU). Las células H9c2 hCOX-2 presentaron mayor viabilidad que las células control y que esta capacidad se pierde con la inhibición mediada por DFU (Figura 52).

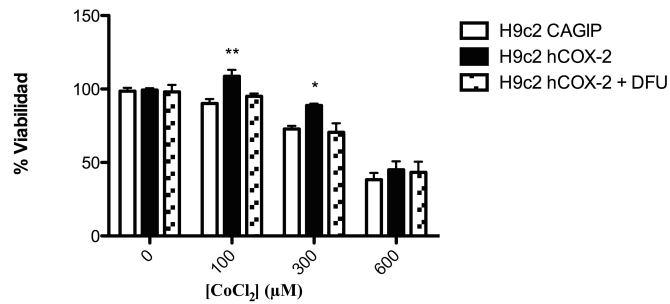


Figura 52. Estudio de la viabilidad celular posterior a tratamiento con CoCl_2 durante 36 hs. Se utilizó el método del MTT siendo proporcional el color desarrollado al número de células vivas. Los resultados se grafican como medias \pm SD. La diferencia es significativa a 100 y 300 μM de CoCl_2 con (** $p < 0,0045$ y * $p < 0,037$). $n=5$ por triplicado.

Para comprobar la efectividad del tratamiento con CoCl_2 y consecuente la respuesta celular con la producción de HIF1- α , se analizó la presencia de HIF mediante inmunodetección en extractos de células hCOX-2 y control. Como se puede apreciar en la Figura 53, las células hCOX-2 presentan una mayor expresión de HIF1- α .

2.10. Panel oxidativo

La mitocondria es el orgánulo principal de producción de especies reactivas del oxígeno debido fundamentalmente al gradiente de protones generados en la membrana mitocondrial interna (Chua y col. 2010). Puesto que las células con expresión estable de hCOX-2 presentaban un mayor consumo de oxígeno que implicaría una mayor actividad mitocondrial, se decidió estudiar si habría consecuencias en el perfil oxidativo de estas células. Para esto se

analizaron por citometría de flujo los siguientes parámetros: potencial de membrana mitocondrial, producción de anión superóxido, producción de óxido nítrico y contenido celular de glutatión.

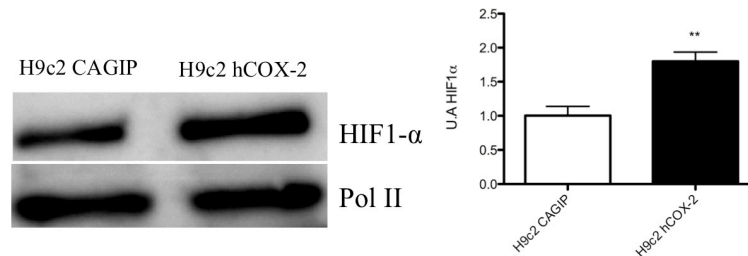


Figura 53. Expresión de HIF1- α . En el panel derecho se muestra la expresión de HIF1- α durante el tratamiento con CoCl₂ (western blot). Se corrieron 50 μ g de extracto nuclear en cada calle de un gel al 6,5 % acrilamida/bisacrilamida. Se utilizaron los anticuerpos anti HIF1- α (Proteintech) y como control de carga anti Pol II (Santa cruz). En el panel izquierdo se grafica el análisis de intensidad de las bandas obtenidas normalizadas vs el control de carga, representadas vs H9c2 CAGIP. Los resultados se grafican como medias \pm SD. ** p 0,05. N= 4.

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial se utilizó como marcador la tetrametilrodamina (TMRM) que tiene alta especificidad de unión a las mitocondrias y se midió la respuesta de las células H9c2CAGIP (Control) con respecto a las células con expresión estable de hCOX-2 (H9c2 hCOX-2) en concentraciones crecientes del desacoplante mitocondrial FCCP. Los resultados indican que, en condiciones basales, el potencial de membrana mitocondrial es similar entre células hCOX-2 y células control (Figura 54). Sin embargo, ante una estimulación creciente con FCCP las células hCOX-2 presentan mayor nivel de

potencial de membrana, lo que en otras palabras, equivale a una mayor integridad mitocondrial (Figura 54).

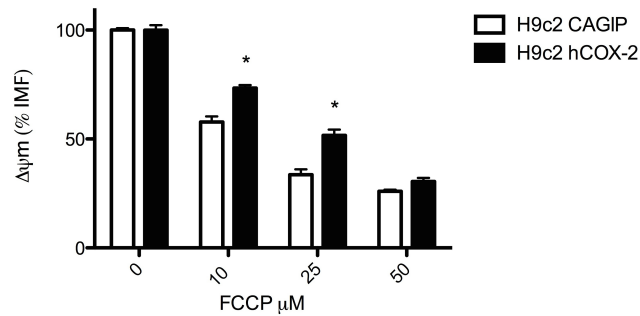


Figura 54. Potencial de membrana mitocondrial. Mediante citometría de flujo se midió el potencial de membrana mitocondrial posterior al tratamiento con concentraciones crecientes de FCCP. Los resultados se grafican como medias \pm SD. * $p < 0,01$. N= 6.

Para evaluar la producción del anión superóxido se utilizó el marcador Mitosox, que es oxidado específicamente por el anión superóxido y emite fluorescencia. Se utilizó plumbagina (PB) a concentraciones crecientes como estímulo por su capacidad de generar anión superóxido. Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 55, donde es posible apreciar que tanto en condiciones basales como de estimulación, la concentración de anión superóxido en las células H9c2 hCOX-2 y en las células control es similar.

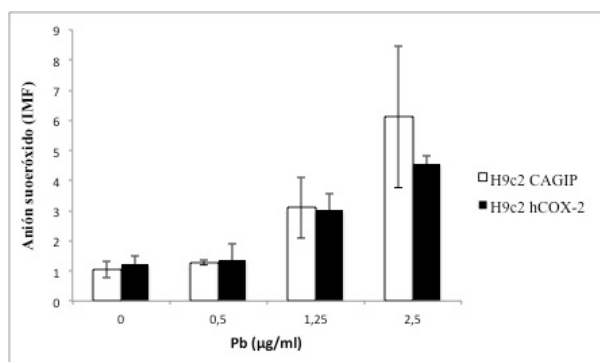


Figura 55. Contenido de anión superóxido en las células hCOX-2. Se midió utilizando citometría de flujo, la producción de anión superóxido tras estimulación con PB. Los resultados se grafican como medias \pm SD.

La producción de óxido nítrico fue determinada tras estimulación con NOR-1 utilizando una concentración final de 250 μ M (Figura 56) para la detección se utilizó el fluorocromo DAF-FM diacetato. En un estado basal sin estimulación, no se apreciaban diferencias entre las células control y las células hCOX-2. Sin embargo, la producción de óxido nítrico tras la estimulación en las células hCOX-2 es menor que en las células control.

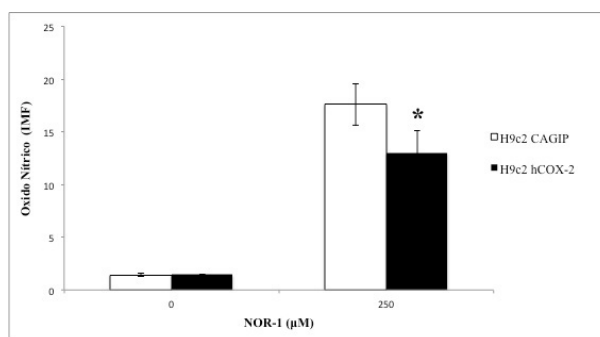


Figura 56. Producción de NO. Se midió en las células control y en las células hCOX-2 la producción de óxido nítrico en condiciones basales y tras estimulación. Los resultados se grafican como medias \pm SD. * $p < 0,03$. $n = 3$.

Un conocido agente antioxidante celular es el glutatión, razón por la que decidimos medir el contenido celular de éste en nuestro sistema utilizando BSO a concentraciones crecientes para evaluar la respuesta celular mediante el fluorocromo monoclorobimano. El análisis de los experimentos muestra que el nivel de glutatión intracelular en las células control y en las células H9C2 hCOX-2 es similar en todas las concentraciones probadas y no se encontraron diferencias en ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 57).

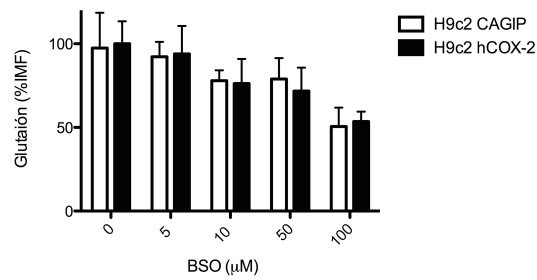


Figura 57. Contenido celular de glutatión. Utilizando citometría de flujo se midió el contenido intracelular de glutatión luego del tratamiento con concentraciones crecientes de BSO. Los resultados se grafican como medias \pm SD. n=9

CAPITULO 3. DESARROLLO ARGUMENTAL

La oclusión coronaria aguda es una destacada causa de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, 3,8 millones de hombres y 3,4 millones de mujeres mueren cada año en el mundo por enfermedad cardíaca. Esta enfermedad está en aumento y se ha convertido en una pandemia que no respeta fronteras.

La muerte del cardiomiocito representa un evento catastrófico debido a que los cardiomiocitos muertos no son reemplazados por la división de los cardiomiocitos supervivientes. Así, preservar la viabilidad del miocardio isquémico ha sido reconocida como la principal diana terapéutica (Yellon y Downey 2003).

El Precondicionamiento isquémico (PCI) permite al miocardio resistir a un episodio de isquemia moderado mediante el entrenamiento adquirido previamente por episodios de isquemia y reperfusión leves. Se han descrito muchos responsables de este proceso, siendo uno de ellos la ciclooxigenasa-2 (Bolli 2000; Guo y col. 1999). En un estudio previo de nuestro laboratorio se encontró que la expresión constitutiva de la ciclooxigenasa-2 humana (hCOX-2) en el corazón de los ratones brindaba a estos animales (TG hCOX-2) una protección similar a la conseguida en animales control (NO TG) mediante el PCI (Inserte y col. 2009).

El estudio proteómico a partir de cardiomiocitos y de mitocondrias cardíacas aisladas de ratones TG hCOX-2, mostró un aumento global de las

subunidades proteicas del complejo IV de la cadena respiratoria. Este aumento tenía un carácter tejido-específico, ya que no fue detectado en un estudio similar realizado en hepatocitos aislados de ratones transgénicos con expresión estable de hCOX-2 en hígado, también generado en nuestro laboratorio y que está actualmente en estudio. Este carácter tejido-específico de la expresión podría explicarse por el diferente perfil funcional de cada tejido, siendo el corazón un músculo con una relativamente baja síntesis proteica pero con un elevado metabolismo aeróbico (Benard y col. 2006; Leary y col. 1998; Leverve y Fontaine 2001).

El aumento de las subunidades del complejo IV fue más obvio cuando se analizó globalmente la cantidad de las diferentes subunidades de dicho complejo respecto a la cantidad de los complejos I, II, III y V de la cadena respiratoria. En este sentido, el uso del anticuerpo Mitoprofile no mostró cambios en estas subunidades. Sin embargo, tampoco observamos diferencias en el complejo IV. Esto podría deberse a que Mitoprofile es una mezcla comercial de anticuerpos frente a subunidades precisas. En el caso del complejo IV, el anticuerpo integrado en esta mezcla comercial reconoce la subunidad I del CIV (Tabla 3. ID: P00397). Como esta subunidad no era la que presentaba los mejores indicadores estadísticos en el análisis proteómico [Fold de 4,55 pero con un número de péptidos contabilizados (Np) igual a 1], decidimos analizar por western blot las subunidades específicas, utilizando como criterio de selección un Fold elevado, Np altos y bajos ratio de falsos positivos de 10%. A pesar de esto no fue posible

validar los datos proteómicos. La justificación para no ver este aumento podría deberse a la diferente sensibilidad de las técnicas empleadas. Así el aumento mostrado en el análisis proteómico deriva del empleo de O16/O18 (ver Metodología) mientras que el resultado obtenido por la técnica de inmunodetección está limitado por la sensibilidad detectada por quimioluminiscencia (Comunicación oral con la Dra. Estefanía Nuñez Sánchez, CNIC, Madrid).

Para profundizar en el estudio de la expresión diferencial de las subunidades del CIV en el corazón de los ratones TG hCOX-2, debíamos analizar la presencia de los supercomplejos mitocondriales. Estos supercomplejos han sido estudiados y debatidos desde hace relativamente poco tiempo (Acin-Perez y col. 2008). Mediante la asociación de los complejos respiratorios en supercomplejos se optimizaría el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, que son las principales funciones mitocondriales y consecuentemente se brindaría un mayor aporte energético al metabolismo celular (Lapunte-Brun y col. 2013). Mediante la utilización de la técnica de electroforesis en condiciones nativas y de un anticuerpo que reconocía la sub II del CIV fue posible apreciar un mayor contenido de dicha subunidad en la muestra TG que no fue posible observar mediante inmunodetección en condiciones desnaturalizantes y que se correspondía con lo informado en el análisis proteómico. Es importante destacar que los supercomplejos en los cuales participaba el CIV presentaban mayor expresión en las muestras TG. Con el estudio de los supercomplejos se favorece

la visualización de todas las subunidades de los complejos que los integran, de este modo existen subunidades que, de no estar ensambladas, son degradadas, haciendo posible su detección sólo cuando se encuentra formando el supercomplejo, que es la forma funcional del complejo (Comunicación personal con el Dr. José Antonio Enríquez, CNIC, Madrid).

Hay que tener en cuenta que en el análisis proteómico, la cuantificación de una proteína viene determinada por la intensidad de la señal espectral de los péptidos obtenidos tras la digestión proteica; y no está claro que todos los péptidos representen la cuantificación de la proteína de la misma manera. Además, la capacidad y la fiabilidad se ven afectadas por distintas variables como la complejidad de la muestra, la fragmentación, la sensibilidad, la velocidad de barrido, etc, que pueden afectar a la capacidad de medición y cuantificación de péptidos, influyendo así en la cuantificación de proteínas (Liu y col. 2014). Por tanto, la precisión de la cuantificación individual de las subunidades del CIV puede no ser extremadamente precisa y por este motivo sólo cuando estudiamos globalmente cambios en todas las proteínas del complejo, ya sea por el método QUIXOT o mediante el análisis de los supercomplejos, somos capaces de intensificar las diferencias en los datos proteómicos.

El aumento en la expresión de proteínas mitocondriales podría deberse a un número mayor de mitocondrias totales. Por lo tanto, una cuestión de gran importancia para nuestro estudio sobre el papel de hCOX-2 en la fisiopatología cardíaca fue estudiar el recuento de dichos orgánulos en nuestro modelo TG

hCOX-2. De la relación entre los resultados obtenidos en las extracciones de mitocondrias aisladas y del peso del tejido del cual provenían resultó que no existían diferencias en la recuperación de las mitocondrias obtenida en los grupos TG hCOX-2, NO TG y TG hCOX-2 con tratamiento de inhibición para COX-2 (TG hCOX-2 + DFU) (Figura 30). Luego se realizó el estudio de la biogénesis mitocondrial en los ratones TG hCOX-2 con respecto a los ratones NO TG por microscopía electrónica (Figura 31). Estos resultados, tampoco indicaban diferencias en la cantidad absoluta de mitocondrias en el modelo de estudio. Finalmente, analizamos la expresión del ADN mitocondrial con respecto al ADN nuclear de estos animales y los resultados coincidieron con los ya obtenidos (resultados del laboratorio no mostrados). La suma de estos estudios ha demostrado que la expresión estable de hCOX-2 en corazón no modifica el número total de mitocondrias.

Una vez descartado un efecto de la hCOX-2 en la biogénesis mitocondrial, el aumento en las proteínas podría ser mediado por una alteración en la regulación de la expresión génica. Se midió entonces por PCR a tiempo real la expresión génica de la sub II y de la sub IV del CIV, que presentaban mayores diferencias de expresión, en muestras NO TG, TG hCOX-2 y TG hCOX-2 + DFU. En ningún caso se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los animales TG y NO TG como tampoco entre los animales NO TG y TG hCOX-2 + DFU. Cuando se determinaron los niveles de PGE₂ no se encontraron diferencias significativas entre el grupo NO TG y el grupo TG

hCOX-2 + DFU, por tanto el tratamiento con DFU había funcionado correctamente. Los niveles encontrados en el grupo TG hCOX-2 eran significativamente diferentes y podían llegar hasta cuadruplicar los obtenidos para NO TG y TG hCOX-2. En este experimento resultó muy alta la variabilidad encontrada tanto en la expresión génica (Figura 34) como en los niveles de PGE₂ encontrados en los diferentes grupos del análisis (Figura 35). Así, nuestro estudio no nos ha permitido descartar la posibilidad de una regulación a nivel transcripcional. Este aumento de expresión de proteínas mitocondriales podría ser mediado por modificaciones post-transcripcionales o podría deberse a una mayor estabilidad de la proteína (Burke y Poyton 1998). Nuestro grupo continua estudiando la regulación que media este efecto.

El análisis del perfil de expresión proteico marcaba un aumento grupal de las proteínas del CIV, lo que nos llevó a estudiar la actividad enzimática de este complejo respiratorio. Mediante la determinación espectrofotométrica de la actividad catalítica del CIV, encontramos que los homogenados cardíacos de muestras TG hCOX-2 presentaban una mayor actividad, que duplicaba el valor determinado para el grupo NO TG. Además, pudimos comprobar que este aumento de la actividad enzimática se reducía si previamente se inhibía la actividad COX-2 mediante el tratamiento de los animales TG hCOX-2 con DFU (Figura 37) cayendo hasta valores similares a los observados para el grupo NO TG. Para contrastar este resultado, decidimos utilizar otra técnica que nos permitió evaluar el contenido del CIV. Con este método, basado en el espectro de

absorción de los grupos prostéticos aa3 del CIV (Horie y Morrison 1963), observamos una tendencia a un mayor contenido de CIV en el grupo TG hCOX-2. Además, en el modelo celular, estos parámetros, indicaban un comportamiento semejante observado en el modelo animal.

Con respecto a la actividad enzimática del CIV, las células H9c2 hCOX-2 mostraron un aumento frente al valor obtenido de las células H9c2 CAGIP que no resultó significativo (Figura 47), sin embargo, la variabilidad dentro del grupo H9c2 CAGIP fue particularmente notoria. Para poner en contexto esta variabilidad debemos tener en cuenta que tanto las células H9c2 sin transfectar como las células H9c2 CAGIP presentaban niveles basales de PGE₂ algo elevados aunque significativamente diferentes e inferiores a las células H9c2 hCOX-2 (Figura 43). Podría ser entonces, que la variabilidad en el grupo control sea debida a esta síntesis aumentada de PGE₂ y una consecuente actividad enzimática de COX-2, que reduciría las diferencias con respecto a las células H9c2 COX-2. Sin embargo, la determinación del contenido del CIV utilizando la capacidad de absorción de los grupos aa3 en el modelo celular nos permitió obtener un respuesta clara. Encontramos que las células H9c2 hCOX-2 presentan un mayor contenido de CIV. Con todo esto, es posible relacionar una expresión estable de hCOX-2 con un aumento de la actividad y del contenido del CIV acorde a lo establecido por los resultados de la proteómica.

El aceptor natural de los electrones transportados por el CIV es el oxígeno. Por lo tanto, medir la respiración celular resulta un parámetro fundamental para el

estudio de la actividad mitocondrial y del CIV. Durante el desarrollo de este trabajo de investigación medimos el consumo de oxígeno en células y en fibras cardíacas con expresión estable de hCOX-2, en éstos encontramos valores significativamente elevados con respecto a las muestras control (NO TG o H9c2 CAGIP). Como resulta evidente, la enzima hCOX-2, expresada por el gen introducido, consume oxígeno para la metabolización del ácido araquidónico y la producción de prostaglandinas. Contar con el modelo celular nos permitió revelar que gran parte del oxígeno consumido en la respiración celular de nuestros modelos de expresión estable o constitutiva de hCOX-2 era mayormente consecuencia de la actividad de ésta enzima. Así, el tratamiento de células H9c2 hCOX-2 con el inhibidor selectivo de COX-2 reduce el consumo de oxígeno casi en un 95 %. Sin embargo, el tratamiento de células H9c2 CAGIP con PGE₂ no aumentaba el consumo de oxígeno.

Por su relevancia en el metabolismo celular, el ATP es uno de los indicadores más importantes de la actividad mitocondrial. Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, la mayor parte del ATP celular es producido por el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial. Este metabolito fue medido tanto en el modelo animal como en el modelo celular y resultó ser más abundante en todas las muestras con expresión estable de hCOX-2. Teniendo en consideración la mayor actividad y contenido del CIV, el consumo aumentado de oxígeno y la mayor producción de ATP podríamos establecer una relación directa entre hCOX-2 y la actividad mitocondrial.

La estimulación continua de los receptores β -adrenérgicos producida por el isoproterenol conduce al desarrollo del estrés oxidativo, la inflamación del miocardio, trombosis, agregación plaquetaria y aumento de los niveles de calcio, que en última instancia causan infarto de miocardio (Garg y Khanna 2014). El modelo se caracteriza por una extraordinaria sencillez técnica, reproducibilidad y aceptablemente baja mortalidad. Mediante este modelo comprobamos que, si bien se mantiene la diferencia en la actividad del complejo IV entre el animal TG y su correspondiente control, no detectamos diferencias significativas en el daño producido. En el modelo del isoproterenol la pérdida de cardiomiocitos por necrosis y su posterior sustitución por colágeno fibrilar contribuyen a la remodelación patológica del miocardio y la naturaleza progresiva de la insuficiencia cardíaca, sin sufrir periodos de isquemia. Sin embargo, en relación con el trabajo previo de nuestro grupo de investigación donde se describió que la expresión constitutiva de hCOX-2 en corazón confería protección ante episodios de isquemia y reperfusión (Inserte y col. 2009), sería posible considerar que una mayor actividad y contenido de CIV tendría mayor relevancia en la reperfusión ya que con la re-oxigenación se restablece el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Dado que en la matriz mitocondrial se han acumulado protones por la inhibición de la cadena de electrones, una vez renovado el suministro de oxígeno, una mayor actividad catalítica del CIV permitiría su rápida reducción a H₂O desfavoreciendo la generación de especies reactivas del oxígeno (Solaini y col. 2010).

El uso de animales en la experimentación científica es un tema de preocupación, especialmente en la regulación de su uso. Existen normativas y reglamentaciones a distintos niveles, pero básicamente todas ellas conducen a mejorar el bienestar animal y a la aplicación de la denominada “Regla de las tres R” que incita a la Reducción del número de animales utilizados para fines científicos, al Reemplazo de su uso por otros modelos y al Refinamiento del uso (Real Decreto RD/2013, BOE nº 34, 8 de febrero de 2013).

Nuestro esfuerzo para contribuir a la aplicación de esta regla fue la creación de un modelo celular policlonal de expresión estable de la isoforma inducible de la ciclooxigenasa, COX-2. Para ello, elegimos la línea celular H9c2 que es una línea celular comercial (ATCC. CRL-1446. H9c2 (2-1)) que deriva de tejido embrionario cardíaco de rata y presenta muchas propiedades de músculo esquelético. Estas células son muy usadas en los estudios *in vitro* de fisiopatología cardíaca (Dongo y col. 2014; Jung y col. 2004; Saeedi y col. 2008; Zhao y col. 2014), aunque su comportamiento representa el comportamiento general de musculo esquelético (Kimes y Brandt 1976).

Tras comprobar que el efecto de la introducción de hCOX-2 en el perfil proteómico de las células H9c2 se correspondía al observado en el modelo animal, una de las primeras pruebas que realizamos fue medir la capacidad de estas células de sobrevivir en un medio nutricionalmente exigente. Mientras en un medio con glucosa la mayoría del ATP deriva de la glucólisis, en un medio sin glucosa y suplementado con galactosa el flujo neto de galactosa a glucosa-1-

fosfato es muy bajo y en consecuencia la mayoría del ATP debe obtenerse de la oxidación mitocondrial de piruvato y glutamina (Reitzer y col. 1979). Así la supervivencia en un medio con galactosa depende del cambio de glucólisis a fosforilación oxidativa. Tras analizar el crecimiento de las células H9c2 hCOX-2 con respecto al crecimiento de las células control o H9c2-CAGIP en medio con glucosa y en medio con galactosa no se encontraron diferencias o ventajas entre ellas. Esto nos reflejaba que la expresión de hCOX-2 no confiere mayor adaptación, en otras palabras, que las células control estaban igual de capacitadas para sobrevivir mediante la fosforilación oxidativa. Posteriormente, se ha descrito que las células H9c2 se adaptan a crecer en medio glucosa y en medio galactosa manteniendo similares niveles de ATP (Rana y col. 2011).

Una importante ventaja de contar con el modelo celular fue la posibilidad de estudiar de manera sencilla marcadores de la función mitocondrial. El aislamiento y separación de los cardiomiocitos contenidos en el corazón resulta una desventaja para el estudio de funciones que dependen de la viabilidad celular como es el caso de la fisiología mitocondrial (Shioya 2007). Entre los marcadores de la función mitocondrial resultaba relevante estudiar los parámetros de estrés oxidativo en nuestro modelo de expresión estable hCOX-2. Así, por la estrecha relación entre los complejos respiratorios y en nuestro caso en particular, por el aumento del contenido del CIV (Barroso y col. 2006), con el potencial de membrana mitocondrial, nos resultó particularmente interesante. Al medirlo en presencia de oxígeno descubrimos que ante una estimulación creciente con

FCCP, un desacoplante mitocondrial e inhibidor de la cadena respiratoria, las células con expresión estable de hCOX-2 presentaban mayor potencial de membrana mitocondrial, lo que representa una menor tendencia a la disipación del mismo y a la apoptosis. Sin embargo, en condiciones basales no fue posible detectar diferencias entre las células hCOX-2 y las células control. Las diferencias encontradas en el potencial de membrana mitocondrial entre las células H9c2 CAGIP y las células H9c2 hCOX-2, junto con la mayor expresión, en estas últimas, del complejo IV, que presenta una capacidad ampliada de catálisis (Das 2013; Gnaiger y col. 1998; Kunz y col. 2000), se ponen en evidencia en condiciones en que la cadena de transporte de electrones debe trabajar a mayor ritmo, como sucede en la reperfusión. La resistencia a perder el potencial de membrana mitocondrial ayudaría a los ratones con expresión estable de hCOX-2 a sobrevivir tras un tratamiento de isquemia y reperfusión (Inserte y col. 2009). Por otro lado, se ha descrito que la ATP sintasa es una enzima reversible que puede sintetizar ATP o hidrolizarlo (Zhai y Sadoshima 2008). En normoxia la enzima sintetiza ATP en un proceso denominado fosforilación oxidativa pero cuando la mitocondria sufre hipoxia, la ATP sintasa puede trabajar en sentido inverso, es decir, hidrolizando el ATP producido en la glucólisis citoplasmática. La energía liberada en ésta hidrólisis es utilizada para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana por el traslocador de nucleótidos de adenina y mantener así el potencial de membrana. Como ya hemos analizado, los modelos hCOX-2 tienen mayor contenido celular de ATP,

pudiendo entonces utilizar por más tiempo el modo reverso de la ATP sintasa para mantener el potencial mitocondrial en valores fisiológicos ante una estimulación con FCCP.

Desde la década de 1950 se sabe que la entrada mitocondrial de calcio puede inducir una pérdida casi completa del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). En la actualidad, el término "transición de permeabilidad" considera un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (IM) y la membrana mitocondrial externa (OM). Hay claras evidencias que atribuyen el aumento en la permeabilidad de la membrana interna a la presencia de un poro de estructura desconocida; mientras que el aumento en la permeabilidad de la membrana externa se debe al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) que parece estar siempre presente (Siemen y Ziemer 2013). Curiosamente, una de las proteínas que presentaron mayor expresión en los animales TG con expresión constitutiva de hCOX-2 en corazón era precisamente VDAC. Utilizando la técnica de western blot encontramos diferencias de expresión para la proteína VDAC en mitocondrias aisladas de ratones TG vs NO TG como se puede observar en la Figura 34C. La función de VDAC es regular el intercambio de aniones y cationes desde el citosol al espacio inter-membrana (Peixoto y col. 2012). A bajos potenciales es permeable tanto para cationes como para aniones, sin embargo, a altos potenciales sólo permanece abierto a cationes (como su nombre *en inglés* lo indica *Voltaje Dependent Anion Complex*, (Das y col. 2012)). En condiciones de glucólisis anaeróbica, el transporte de electrones está

interrumpido, y por tanto, la síntesis mitocondrial de ATP. Además, en el citoplasma las concentraciones de Na^+ , Ca^{2+} y H^+ son elevadas, lo que profundiza la disipación del potencial de membrana mitocondrial que ya está disminuido. Sin embargo, ha sido descrito que el preconditionamiento isquémico (PCI) favorece, durante los períodos cortos de isquemia-reperfusión, la disipación del potencial (Ylitalo y col. 2000). Así, una mayor expresión de VDAC brindaría una ventaja adicional en el transporte de cationes y en la disipación del potencial de membrana mitocondrial antes de la llegada del oxígeno en la perfusión.

Otro parámetro estudiado dentro del panel oxidativo en el modelo celular, fue la producción de óxido nítrico. Los resultados indican que las células hCOX-2 presentaban menores niveles de éste ante una estimulación con un dador de tal especie, aunque en condiciones basales no había diferencias con respecto a las células control (Figura 56). Teniendo en cuenta que la síntesis de cada mol de óxido nítrico requiere dos moles de oxígeno (O_2) (Knowles y Moncada 1994), los menores niveles de óxido nítrico podría atribuirse simplemente a una limitada disponibilidad de oxígeno intracelular debido a la elevada actividad de hCOX-2. Además, se reduciría la producción de peroxinitritos, responsables de la acción perjudicial del óxido nítrico en las células (Robin y col. 2011).

El modelo celular desarrollado, expresando hCOX-2, nos ha ofrecido entre sus ventajas, la posibilidad de prescindir de un operador muy cualificado, necesario para trabajar con los animales, ya que la cirugía de oclusión de la arteria aorta es compleja, de difícil reproducibilidad y compromete mucho la

supervivencia de los animales si no está bien realizada. Sin embargo, nuestro modelo, si bien no da la misma información, favorece el estudio por su fácil y práctica manipulación, y nos permitió simular las condiciones de isquemia-reperusión con mayor precisión y reproducibilidad. Para ello hemos utilizado dos modalidades: la inhibición metabólica y el tratamiento con CoCl_2 .

Durante el tratamiento con la solución de Inhibición Metabólica (IM) y posterior simulación de una reperusión reemplazando la solución por medio de cultivo celular, se obtuvo como resultado una mayor viabilidad después del tratamiento a tiempos largos de inhibición (2 y 3 horas de IM) en las células hCOX-2. Como se ha mencionado previamente, el oxígeno es dañino en ciertas circunstancias como la reperusión posterior a una isquemia (Kones 2011). Por eso, en adición a la mayor actividad y contenido del CIV, y debido a que uno de los sustratos de la enzima hCOX-2 es el oxígeno, cuando se reanuda el suministro de éste tras la reperusión, las células que expresan establemente la enzima cuentan con una segunda vía de consumo, disminuyendo su disponibilidad y favoreciendo a las células H9c2 hCOX-2 con respecto a las células H9c2 CAGIP.

Tras el tratamiento con CoCl_2 encontramos que las células con expresión estable de hCOX-2 presentan una viabilidad significativamente aumentada con respecto a las células control o H9c2 CAGIP. La adaptación de las células a una situación de isquemia mediante la glucólisis, es particularmente efectiva a tiempos cortos, sí la hipoxia es prolongada las células responden a ella mediante la síntesis del Factor Inducible por la Hipoxia (HIF1- α) (Solaini y col. 2010).

Éste es un heterodímero que se une a elementos de respuesta a la hipoxia, activando la transcripción de más de 200 genes que permiten a la célula adaptarse a bajas concentraciones de oxígeno (Solaini y col. 2010). El análisis de la expresión de HIF1- α reveló que las células H9c2 hCOX-2 contienen una mayor cantidad relativa de este factor respecto de las control (Figura 53).

El trabajo en el modelo animal nos ha permitido un estudio global más cercano a la fisiología cardíaca que, complementado con la información obtenida en el modelo celular, nos permitió profundizar en el conocimiento y comprender el papel de la enzima COX-2 en corazón. La reducida muerte de cardiomiocitos con expresión estable de esta proteína podría estar fundamentada en la mayor actividad del complejo CIV, el mayor contenido de ATP y la resistencia intrínseca a la pérdida del potencial de membrana. Cuando el flujo sanguíneo se ve afectado, el metabolismo basal cambia de aeróbico (utilización de OxPhos) a glucolítico. En este contexto, los ratones con hCOX-2 tienen un mayor contenido de ATP que les permite continuar latiendo (lo que implica un elevado consumo) por más tiempo. Además, una mayor expresión de VDAC permitiría, durante la fase de isquemia, el mayor intercambio de cationes que resultaría en una homogeneización de los mismos entre el citosol y el espacio intermembrana mitocondrial para mantener la polaridad de la membrana interna hasta que se reanude el aporte de oxígeno. Además, contarían con un mayor contenido y actividad del CIV, que sumado a la actividad propia de la ciclooxigenasa expresada constitutivamente, les permitiría disminuir los efectos

originados por las especies reactivas del oxígeno y el restablecimiento del potencial de membrana de forma gradual. Asimismo, en el análisis proteómico realizado en estos animales, se encontraron aumentadas las enzimas de la vía glucolítica, que podrían permitir, una mayor síntesis glucolítica de ATP durante la fase isquémica. En suma este trabajo aporta al anterior, realizado en el laboratorio (Inserte y col. 2009), una mejor comprensión sobre los mecanismos afectados por la expresión constitutiva de hCOX-2 en corazón.

Conclusiones

A partir de los resultados de este trabajo de investigación se extraen las siguientes conclusiones:

1. El análisis proteómico a partir de cardiomiocitos aislados de animales control y animales transgénicos que expresan la COX-2 humana específicamente en ese tipo celular, identificaron 22 proteínas con expresión aumentada en el animal transgénico y 6 con expresión disminuida usando una FDRq del 10% y considerando cambios de expresión de al menos el doble en ambas condiciones.
2. Un análisis *in silico* con el software IPA clasificó a las proteínas diferencialmente expresadas en distintas rutas canónicas, siendo las más significativas las vías glicolítica/gluconeogénica, fosforilación oxidativa y disfunción mitocondrial. Una de las más afectadas la vía OXPHOS.
3. Los cardiomiocitos aislados de los animales transgénicos presentan un aumento significativo del conjunto de las proteínas del complejo IV de la cadena respiratoria.
4. El aumento en las proteínas mitocondriales no se debe a un aumento de la biogénesis mitocondrial, ni a diferencias en el tamaño de las mitocondrias ni a diferencias estructurales en las crestas mitocondriales.
5. La actividad enzimática de la citocromo c oxidasa (complejo IV) está aumentada en homogenado de corazón de los animales transgénicos.

6. El estudio de la funcionalidad mitocondrial en el corazón de los animales transgénicos vs los animales control mostró un aumento en el consumo de oxígeno y en los niveles de ATP.
7. La proteína VDAC también fue identificada en el análisis proteómico como una de las proteínas aumentadas en los cardiomiocitos y mitocondrias del animal transgénico. Los resultados fueron validados por Western blot, sin observar modificaciones a nivel de ARNm.
8. Se ha generado una línea celular que expresa la COX-2 humana de manera estable a partir de la línea de cardiomioblastos H9c2 (H9c2 hCOX-2) que presentó un aumento significativo en la síntesis de PGE2.
9. Las células H9c2 hCOX-2 presentan mayor consumo de oxígeno por unidad de tiempo lo que corresponde a una enzima funcional ya que la respiración celular en presencia del inhibidor DFU alcanza los niveles observados para las células control.
10. La línea celular H9c2 hCOX-2 presenta mayor contenido aa3 y una mayor concentración en ATP, mostrando una mayor función mitocondrial. A pesar de ello, la línea celular H9c2 hCOX-2 no muestra ninguna ventaja o capacidad para desarrollarse en medios que obligan a obtener energía a partir de la fosforilación oxidativa.
11. El tratamiento de inhibición metabólica en células H9c2 control en cultivo provoca daño celular y es capaz de aumentar la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 endógena. A pesar de este aumento, la viabilidad celular

disminuye en condiciones de inhibición metabólica. En las células con expresión estable de hCOX-2, también hay aumento de la expresión de COX-2 endógena, aunque presentan una mayor viabilidad ante el mismo tratamiento.

12. La expresión de hCOX-2 en células H9c2 aumenta también la viabilidad celular tras tratamiento con CoCl₂. El tratamiento con CoCl₂ en cultivo celular aumenta los niveles de proteicos de HIF1 α . Las células con expresión de hCOX-2 presentan una mayor respuesta a dicho estímulo.
13. El análisis del panel oxidativo en la línea celular H9c2 hCOX-2 mostró que la sobreexpresión de la COX-2 humana no modificó la producción de anión superóxido ni el contenido celular de glutatión, mostrando una disminución significativa en la producción de óxido nítrico.
14. El nivel de potencial de membrana mitocondrial en células hCOX-2 es mayor que en células control.

Bibliografía

- Abbate A, Limana F, Capogrossi MC, Santini D, Biondi-Zoccai GG, Scarpa S, Germani A, Straino S, Severino A, Vasaturo F, Campioni M, Liuzzo G, Crea F, Vetrovec GW, Biasucci LM, Baldi A (2006) Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces apoptosis in acute myocardial infarction. *Apoptosis* 11(6): 1061-1063
- Abbate A, Morales C, De Falco M, Fedele V, Biondi Zoccai GG, Santini D, Palleiro J, Vasaturo F, Scarpa S, Liuzzo G, Severino A, Baldi F, Crea F, Biasucci LM, Vetrovec GW, Gelpi RJ, Baldi A (2007) Ischemia and apoptosis in an animal model of permanent infarct-related artery occlusion. *Int J Cardiol* 121(1): 109-111
- Abbate A, Santini D, Biondi-Zoccai GG, Scarpa S, Vasaturo F, Liuzzo G, Bussani R, Silvestri F, Baldi F, Crea F, Biasucci LM, Baldi A (2004) Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression at the site of recent myocardial infarction: friend or foe? *Heart* 90(4): 440-443
- Acin-Perez R, Enriquez JA (2014) The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta* 1837(4): 444-450
- Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32(4): 529-539
- Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, Pomerance A, Maclouf J, Creminon C, Yacoub MH, Polak JM (1999) Cyclooxygenase-2 is widely expressed in

- atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3): 646-655
- Balaban RS, Mootha VK, Arai A (1996) Spectroscopic determination of cytochrome c oxidase content in tissues containing myoglobin or hemoglobin. *Anal Biochem* 237(2): 274-278
- Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J, et al. (1994) Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1209(1): 130-139
- Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gavino F, Oehninger S (2006) Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 85(1): 149-154
- Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Delage JP, Casteilla L, Letellier T, Rossignol R (2006) Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(6): C1172-1182
- Bergstroem S, Danielsson H, Klenberg D, Samuelsson B (1964) The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into Prostaglandins. *J Biol Chem* 239: PC4006-4008

- Bergstrom S, Duner H, von EU, Pernow B, Sjovall J (1959) Observations on the effects of infusion of prostaglandin E in man. *Acta Physiol Scand* 45: 145-151
- Bolli R (2000) The late phase of preconditioning. *Circ Res* 87(11): 972-983
- Bolli R (2007) Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(1): H19-27
- Burke PV, Poyton RO (1998) Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 201(Pt 8): 1163-1175
- Camitta MG, Gabel SA, Chulada P, Bradbury JA, Langenbach R, Zeldin DC, Murphy E (2001) Cyclooxygenase-1 and -2 knockout mice demonstrate increased cardiac ischemia/reperfusion injury but are protected by acute preconditioning. *Circulation* 104(20): 2453-2458
- Capra V, Rovati GE, Mangano P, Buccellati C, Murphy RC, Sala A (2014) Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochim Biophys Acta*:
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5): 643-655
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13926-13931

- Chandrasekharan NV, Simmons DL (2004) The cyclooxygenases. *Genome Biol* 5(9): 241
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159
- Chua YL, Dufour E, Dassa EP, Rustin P, Jacobs HT, Taylor CT, Hagen T (2010) Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 285(41): 31277-31284
- Colombini M (1980) Structure and mode of action of a voltage dependent anion-selective channel (VDAC) located in the outer mitochondrial membrane. *Ann N Y Acad Sci* 341: 552-563
- Das KC (2013) Hyperoxia decreases glycolytic capacity, glycolytic reserve and oxidative phosphorylation in MLE-12 cells and inhibits complex I and II function, but not complex IV in isolated mouse lung mitochondria. *PLoS One* 8(9): e73358
- Das S, Steenbergen C, Murphy E (2012) Does the voltage dependent anion channel modulate cardiac ischemia-reperfusion injury? *Biochim Biophys Acta* 1818(6): 1451-1456
- Doenst T, Nguyen TD, Abel ED (2013) Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res* 113(6): 709-724

- Dongo E, Benko Z, Csizmazia A, Marosi G, Grottke A, Jucker M, Schumacher U, Kiss L (2014) H₂S preconditioning of human adipose tissue-derived stem cells increases their efficacy in an in vitro model of cell therapy for simulated ischemia. *Life Sci* 113(1-2): 14-21
- Egan KM, Lawson JA, Fries S, Koller B, Rader DJ, Smyth EM, Fitzgerald GA (2004) COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 306(5703): 1954-1957
- Egan KM, Wang M, Fries S, Lucitt MB, Zukas AM, Pure E, Lawson JA, FitzGerald GA (2005) Cyclooxygenases, thromboxane, and atherosclerosis: plaque destabilization by cyclooxygenase-2 inhibition combined with thromboxane receptor antagonism. *Circulation* 111(3): 334-342
- Faulx MD, Ernsberger P, Vatner D, Hoffman RD, Lewis W, Strachan R, Hoit BD (2005) Strain-dependent beta-adrenergic receptor function influences myocardial responses to isoproterenol stimulation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1): H30-36
- Ferreira SH, Moncada S, Vane JR (1973) Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br J Pharmacol* 49(1): 86-97
- Ferreira SH, Vane JR (1967) Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature* 216(5118): 868-873
- Flower RJ, Vane JR (1974) Inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Biochem Pharmacol* 23(10): 1439-1450

- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294(5548): 1871-1875
- Galati D, Srinivasan S, Raza H, Prabu SK, Hardy M, Chandran K, Lopez M, Kalyanaraman B, Avadhani NG (2009) Role of nuclear-encoded subunit Vb in the assembly and stability of cytochrome c oxidase complex: implications in mitochondrial dysfunction and ROS production. *Biochem J* 420(3): 439-449
- Garg M, Khanna D (2014) Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 8(4): 155-169
- Genova ML, Lenaz G (2014) Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 1837(4): 427-443
- Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R (1998) Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 201(Pt 8): 1129-1139
- Goldblatt MW (1935) Properties of human seminal plasma. *J Physiol* 84(2): 208-218
- Goren N, Cuenca J, Martin-Sanz P, Bosca L (2004) Attenuation of NF-kappaB signalling in rat cardiomyocytes at birth restricts the induction of inflammatory genes. *Cardiovasc Res* 64(2): 289-297
- Gottlieb RA (2011) Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 16(3-4): 233-238

- Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL (1996) Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest* 97(10): 2391-2398
- Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, Han H, Laubach VE, Ping P, Yang Z, Qiu Y, Bolli R (1999) The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11507-11512
- Hamberg M, Samuelsson B (1974) Prostaglandin endoperoxides. VII. Novel transformations of arachidonic acid in guinea pig lung. *Biochem Biophys Res Commun* 61(3): 942-949
- Harding P, LaPointe MC (2011) Prostaglandin E2 increases cardiac fibroblast proliferation and increases cyclin D expression via EP1 receptor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 84(5-6): 147-152
- Harding P, Yang XP, He Q, Lapointe MC (2011) Lack of microsomal prostaglandin E synthase-1 reduces cardiac function following angiotensin II infusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300(3): H1053-1061
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94(6): 2504-2510
- Hatae N, Sugimoto Y, Ichikawa A (2002) Prostaglandin receptors: advances in the study of EP3 receptor signaling. *J Biochem* 131(6): 781-784

- Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K (2001) Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193(2): 255-261
- Horie S, Morrison M (1963) Cytochrome C Oxidase Components.iii. Spectral Properties of Cytochromes a and A3. *J Biol Chem* 238: 2859-2865
- Hsu PL, Su BC, Kuok QY, Mo FE (2013) Extracellular matrix protein CCN1 regulates cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury. *Cardiovasc Res* 98(1): 64-72
- Inserte J, Molla B, Aguilar R, Traves PG, Barba I, Martin-Sanz P, Bosca L, Casado M, Garcia-Dorado D (2009) Constitutive COX-2 activity in cardiomyocytes confers permanent cardioprotection Constitutive COX-2 expression and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 46(2): 160-168
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1993) Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 268(12): 9049-9054
- Jones NM, Bergeron M (2001) Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21(9): 1105-1114

- Jorge I, Navarro P, Martinez-Acedo P, Nunez E, Serrano H, Alfranca A, Redondo JM, Vazquez J (2009) Statistical model to analyze quantitative proteomics data obtained by 18O/16O labeling and linear ion trap mass spectrometry: application to the study of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in endothelial cells. *Mol Cell Proteomics* 8(5): 1130-1149
- Jung YS, Jung YS, Kim MY, Kim E (2004) Identification of caspase-independent PKCepsilon-JNK/p38 MAPK signaling module in response to metabolic inhibition in H9c2 cells. *The Japanese journal of physiology* 54(1): 23-29
- Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268(5212): 866-869
- Kang YJ, Mbonye UR, DeLong CJ, Wada M, Smith WL (2007) Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog Lipid Res* 46(2): 108-125
- Kimes BW, Brandt BL (1976) Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 98(2): 367-381
- Kis B, Snipes JA, Busija DW (2005) Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* 315(1): 1-7
- Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 (Pt 2): 249-258

- Kones R (2011) Oxygen therapy for acute myocardial infarction-then and now. A century of uncertainty. *Am J Med* 124(11): 1000-1005
- Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ (2000) Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275(43): 33744-33749
- Kulmacz RJ, Pendleton RB, Lands WE (1994) Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase. Interpretation of reaction kinetics. *J Biol Chem* 269(8): 5527-5536
- Kunz WS, Kudin A, Vielhaber S, Elger CE, Attardi G, Villani G (2000) Flux control of cytochrome c oxidase in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 275(36): 27741-27745
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384(6610): 644-648
- Kurzrok R, Lieb CC (1930) Biochemical Studies of Human Semen. II. The Action of Semen on the Human Uterus. *Exp Biol Med (Maywood)* 28(3): 268-272
- Lands WE, Sauter J, Stone GW (1978) Oxygen requirement for prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins Med* 1(2): 117-120
- Laneuville O, Breuer DK, Dewitt DL, Hla T, Funk CD, Smith WL (1994) Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1

- and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 271(2): 927-934
- LaPointe MC, Mendez M, Leung A, Tao Z, Yang XP (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function after myocardial infarction in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(4): H1416-1424
- Lapiente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acin-Perez R, Latorre-Pellicer A, Colas C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quiros PM, Calvo E, Rodriguez-Hernandez MA, Navas P, Cruz R, Carracedo A, Lopez-Otin C, Perez-Martos A, Fernandez-Silva P, Fernandez-Vizarra E, Enriquez JA (2013) Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340(6140): 1567-1570
- Lazarus M, Kubata BK, Eguchi N, Fujitani Y, Urade Y, Hayaishi O (2002) Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages. *Arch Biochem Biophys* 397(2): 336-341
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL (2002) Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 62(3): 625-631
- Leary SC, Battersby BJ, Moyes CD (1998) Inter-tissue differences in mitochondrial enzyme activity, RNA and DNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 201 (Pt 24): 3377-3384

- Leverve XM, Fontaine E (2001) Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB Life* 52(3-5): 221-229
- Li Q, Guo Y, Xuan YT, Lowenstein CJ, Stevenson SC, Prabhu SD, Wu WJ, Zhu Y, Bolli R (2003) Gene therapy with inducible nitric oxide synthase protects against myocardial infarction via a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Circ Res* 92(7): 741-748
- Liou JY, Aleksic N, Chen SF, Han TJ, Shyue SK, Wu KK (2005) Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance. *Exp Cell Res* 306(1): 75-84
- Liu K, Zhang J, Fu B, Xie H, Wang Y, Qian X (2014) Evaluation of empirical rule of linearly correlated peptide selection (ERLPS) for proteotypic peptide-based quantitative proteomics. *Proteomics* 14(13-14): 1593-1603
- Lodish H (2005) *Biología celular y molecular*. Médica Panamericana,
- Lodish H (2008) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman,
- Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW (2001) Mitochondrial pathology in cardiac failure. *Cardiovasc Res* 49(1): 17-26
- Mayoral R, Molla B, Flores JM, Bosca L, Casado M, Martin-Sanz P (2008) Constitutive expression of cyclo-oxygenase 2 transgene in hepatocytes protects against liver injury. *Biochem J* 416(3): 337-346
- Mbonye UR, Song I (2009) Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. *BMB Rep* 42(9): 552-560

- Mbonye UR, Wada M, Rieke CJ, Tang HY, Dewitt DL, Smith WL (2006) The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *J Biol Chem* 281(47): 35770-35778
- Mendez M, LaPointe MC (2002) Trophic effects of the cyclooxygenase-2 product prostaglandin E(2) in cardiac myocytes. *Hypertension* 39(2 Pt 2): 382-388
- Monneret G, Gravel S, Diamond M, Rokach J, Powell WS (2001) Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood* 98(6): 1942-1948
- Mosca S (2011) Pre y postcondicionamiento isquémicos: papel del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria. *Rev Fed Arg Cardiol* 40(2):
- Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I (2003) Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* 278(39): 37937-37947
- Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I (2000) Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275(42): 32783-32792

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5): 1124-1136
- Narumiya S, FitzGerald GA (2001) Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 108(1): 25-30
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79(4): 1193-1226
- Nomura T, Lu R, Pucci ML, Schuster VL (2004) The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Mol Pharmacol* 65(4): 973-978
- Peixoto PM, Dejean LM, Kinnally KW (2012) The therapeutic potential of mitochondrial channels in cancer, ischemia-reperfusion injury, and neurodegeneration. *Mitochondrion* 12(1): 14-23
- Piper PJ, Said SI, Vane JR (1970) Effects on smooth muscle preparations of unidentified vasoactive peptides from intestine and lung. *Nature* 225(5238): 1144-1146
- Qian JY, Harding P, Liu Y, Shesely E, Yang XP, LaPointe MC (2008) Reduced cardiac remodeling and function in cardiac-specific EP4 receptor knockout mice with myocardial infarction. *Hypertension* 51(2): 560-566
- Rana P, Nadanaciva S, Will Y (2011) Mitochondrial membrane potential measurement of H9c2 cells grown in high-glucose and galactose-containing

- media does not provide additional predictivity towards mitochondrial assessment. *Toxicol In Vitro* 25(2): 580-587
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254(8): 2669-2676
- Ricciotti E, FitzGerald GA (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5): 986-1000
- Rieke CJ, Mulichak AM, Garavito RM, Smith WL (1999) The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J Biol Chem* 274(24): 17109-17114
- Riendeau D, Percival MD, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans J, Falgoutyret JP, Ford-Hutchinson AW, Gordon R, Greig G, Gresser M, Guay J, Kargman S, Leger S, Mancini JA, O'Neill G, Ouellet M, Rodger IW, Therien M, Wang Z, Webb JK, Wong E, Chan CC, et al. (1997) Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 121(1): 105-117
- Robin E, Derichard A, Vallet B, Hassoun SM, Neviere R (2011) Nitric oxide scavenging modulates mitochondrial dysfunction induced by hypoxia/reoxygenation. *Pharmacol Rep* 63(5): 1189-1194
- Rockwell P, Yuan H, Magnusson R, Figueiredo-Pereira ME (2000) Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates,

- and production of the prostaglandin PGE(2). *Arch Biochem Biophys* 374(2): 325-333
- Saeedi R, Parsons HL, Wambolt RB, Paulson K, Sharma V, Dyck JR, Brownsey RW, Allard MF (2008) Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6): H2497-2506
- Saito T, Rodger IW, Hu F, Robinson R, Huynh T, Giaid A (2004) Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 37(1): 71-77
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410(6827): 471-475
- Samuelsson B (1972) Biosynthesis of prostaglandins. *Fed Proc* 31(5): 1442-1450
- Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* 59(3): 207-224
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9(7): 671-675
- Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P (1999) Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 155(4): 1281-1291

- Schorr K, Zimmermann KC, Tannhauser R (1998) Augmented myocardial ischaemia by nicotine--mechanisms and their possible significance. *Br J Pharmacol* 125(1): 79-86
- Schuster VL (1998) Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60: 221-242
- Schuster VL (2002) Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 633-647
- Shimizu N, Nakamura T (1985) Prostaglandins as hormones. *Dig Dis Sci* 30(11 Suppl): 109S-113S
- Shioya T (2007) A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J Physiol Sci* 57(6): 327-335
- Siemen D, Ziemer M (2013) What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not? *IUBMB Life* 65(3): 255-262
- Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56(3): 387-437
- Sinicropo FA (2006) Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer. *Mol Carcinog* 45(6): 447-454
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271(52): 33157-33160
- Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G (2010) Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7): 1171-1177

- Straino S, Salloum FN, Baldi A, Ockaili RA, Piro M, Das A, Qureshi IZ, Biasucci LM, Capogrossi MC, Biondi-Zoccai GG, Severino A, Mellone P, Crea F, Vetrovec GW, Kukreja RC, Abbate A (2007) Protective effects of parecoxib, a cyclo-oxygenase-2 inhibitor, in postinfarction remodeling in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 50(5): 571-577
- Sugimoto Y, Narumiya S (2007) Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282(16): 11613-11617
- Timmers L, Sluijter JP, Verlaan CW, Steendijk P, Cramer MJ, Emons M, Strijder C, Grundeman PF, Sze SK, Hua L, Piek JJ, Borst C, Pasterkamp G, de Kleijn DP (2007) Cyclooxygenase-2 inhibition increases mortality, enhances left ventricular remodeling, and impairs systolic function after myocardial infarction in the pig. *Circulation* 115(3): 326-332
- Vartak R, Porras CA, Bai Y (2013) Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein & cell* 4(8): 582-590
- von Euler US (1936) On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol* 88(2): 213-234
- Walenga RW, Kester M, Coroneos E, Butcher S, Dwivedi R, Statt C (1996) Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro. *Prostaglandins* 52(5): 341-359

- Wang LH, Hajibeigi A, Xu XM, Loose-Mitchell D, Wu KK (1993) Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 190(2): 406-411
- Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM (2011) The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47(2): 125-131
- Whittaker N, Bunting S, Salmon J, Moncada S, Vane JR, Johnson RA, Morton DR, Kinner JH, Gorman RR, McGuire JC, Sun FF (1976) The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins* 12(6): 915-928
- Xiao CY, Yuhki K, Hara A, Fujino T, Kuriyama S, Yamada T, Takayama K, Takahata O, Karibe H, Taniguchi T, Narumiya S, Ushikubi F (2004) Prostaglandin E2 protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP4. *Circulation* 109(20): 2462-2468
- Xiao G, Chen W, Kulmacz RJ (1998) Comparison of structural stabilities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 273(12): 6801-6811
- Xu XM, Tang JL, Chen X, Wang LH, Wu KK (1997) Involvement of two Sp1 elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J Biol Chem* 272(11): 6943-6950
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11(2): 371-386

- Yellon DM, Downey JM (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 83(4): 1113-1151
- Ylitalo KV, Ala-Rami A, Liimatta EV, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE (2000) Intracellular free calcium and mitochondrial membrane potential in ischemia/reperfusion and preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 32(7): 1223-1238
- Yu Y, Funk CD (2007) A novel genetic model of selective COX-2 inhibition: comparison with COX-2 null mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82(1-4): 77-84
- Yuan C, Rieke CJ, Rimon G, Wingerd BA, Smith WL (2006) Partnering between monomers of cyclooxygenase-2 homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16): 6142-6147
- Yue X, Yang F, Yang Y, Mu Y, Sun W, Li W, Xu D, Wu J, Zhu Y (2011) Induction of cyclooxygenase-2 expression by hepatitis B virus depends on demethylation-associated recruitment of transcription factors to the promoter. *Virol J* 8: 118
- Zhai P, Sadoshima J (2008) Overcoming an energy crisis?: an adaptive role of glycogen synthase kinase-3 inhibition in ischemia/reperfusion. *Circ Res* 103(9): 910-913
- Zhang Y, Shaffer A, Portanova J, Seibert K, Isakson PC (1997) Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3): 1069-1075

Zhao Y, Xu Y, Zhang J, Ji T (2014) Cardioprotective effect of carvedilol: inhibition of apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via the TLR4/NF-kappaB pathway following ischemia/reperfusion injury. *Exp Ther Med* 8(4): 1092-1096

Zordoky BN, El-Kadi AO (2007) H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 56(3): 317-322

