



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SISTEMA HEMOXIGENASA EN UN
MODELO DE HIPOXIA QUÍMICA INDUCIDA POR CoCl_2

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
Q. F. B. JORGE MUÑOZ SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA ELENA CHÁNEZ CÁRDENAS
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MAHARA ANGÉLICA VALVERDE RAMÍREZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO
Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F. Diciembre, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría fue dirigida por la Dra. María Elena Cháñez Cárdenas en el laboratorio de Patología Vascular Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez".

A los miembros del comité tutor por sus comentarios y apoyo para la realización de este trabajo:

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco Facultad de Medicina

Se agradece al posgrado de Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (No. 367833) otorgada durante el desarrollo de este trabajo.

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para la asistencia al congreso *XXVIIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & XIIth International Conference, Vancouver Canadá*, presentando el trabajo titulado "*Cobalt chloride-induced chemical hypoxia provokes changes in subcellular localization of hemeoxygenase isoforms*".

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a sus consejos y palabras de aliento he crecido como persona. A mis padres María Elena y José, por ser los principales en otorgarme un cimiento para la construcción de mi vida profesional. Ellos me han dado las bases de responsabilidad y deseos de superación. Sus virtudes infinitas y grandes corazones han logrado que llegue a mis metas que desde pequeño he deseado. A mis hermanos Edgar, Ricardo y Eduardo por aguantarme, motivarme y quererme tanto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por haberme abierto las puertas de su sueño científico para realizar mi maestría y a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y apoyo para seguir adelante cada día.

A mi tutora de tesis, la Dra. María Elena Chánez Cárdenas por haberme brindado la oportunidad de adquirir las habilidades y conocimiento en el área de investigación a través de su experiencia, motivación y sobre todo su paciencia para guiarme hasta el término de mis estudios con éxito. Gracias por el tiempo que me dedicó en aquellas charlas relacionadas con artículos de investigación que resultaron favorables para mi formación profesional. Al Dr. José Pedraza Chaverri por habernos obsequiado la línea celular. A la Dra. Marisol Orozco Ibarra por el asesoramiento con el cultivo celular. A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda y a la Dra. Soledad Funes por el apoyo y asesoramiento del uso del microscopio confocal de Instituto de Fisiología Celular. A la Dra. Rosa E. Navarro y a su alumna de doctorado Paulette por el obsequio de ciertos reactivos. Al Dr. Miguel Tapia por el asesoramiento de la técnica de inmunofluorescencia y finalmente a los integrantes del comité tutorial, la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez y el Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, quienes que a través de sus consejos en cada uno de los exámenes tutoriales, pude terminar con éxito mi proyecto de maestría.

A mis compañeros y amigos de laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral, quienes me brindaron su apoyo y confianza permitiéndome terminar mi trabajo y sobre todo por la linda amistad que se ha formado dentro del laboratorio: Ana, Ricardo, Carlos, Nara, Iván, Jessica, Tere, Gustavo, Fernando, Daniel, Tania, Claudia, Úrzula y a mi ecuatoriana favorita María José quien llegó en un momento especial en mi vida ayudándome con algunos experimentos de mi proyecto combinado con los momentos agradables que pasamos fuera del laboratorio. Nunca olvidaré aquellas aventuras que vivimos en el laboratorio. Finalmente a Jesús por haber llegado en este punto de mi vida auxiliándome a completar estas páginas de mi tesis.

“El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible”

Ray Bradbury

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I. ABREVIATURAS. | 1 |
| II. RESUMEN. | 3 |
| III. INTRODUCCIÓN. | 5 |
| 1. El sistema hemoxigenasa (HO). | 5 |
| 1.1. El grupo hemo y la reacción de degradación catalizada por el sistema HO. | 6 |
| 1.2. Metabolitos del sistema HO y su función celular. | 6 |
| 1.2.1. Los pigmentos biliares (BV y BR). | 6 |
| 1.2.2. El CO. | 8 |
| 1.2.3. El Fe ²⁺ | 8 |
| 1.3. El sistema HO y su importancia en la señalización celular. | 9 |
| 1.3.1. La hemoxigenasa-1 (HO-1). | 10 |
| 1.3.1.1. Funciones no enzimáticas de la HO-1. | 11 |
| 1.3.1.2. Localización subcelular de la HO-1 y su participación en la señalización celular. | 12 |
| 1.3.2 La hemoxigenasa 2 (HO-2). | 13 |
| 1.3.2.1. Funciones no enzimáticas. La HO-2 como sensor de oxígeno. | 14 |
| 2. La hipoxia. | 16 |
| 2.1 Cambios bioquímicos en la respuesta a la hipoxia. | 18 |
| 2.1.1. Disrupción iónica membranal y el papel del Ca ²⁺ en hipoxia. | 18 |
| 2.1.2 Los factores inducibles por hipoxia. | 19 |
| 2.1.2.1. Regulación de los HIFs. | 20 |
| 2.1.2.2. Expresión génica de los factores HIFs. | 22 |
| 2.1.3. El metabolismo celular en la hipoxia. | 26 |
| 2.1.4. Especies reactivas de oxígeno y muerte celular por hipoxia. | 28 |
| 2.1.4.1. Muerte celular por hipoxia. | 28 |
| 3. Modelos de hipoxia. | 30 |
| 3.1. El Co ²⁺ en la estabilización y acumulación de los factores HIFs. | 31 |
| 3.2. Tipos celulares para el estudio de las respuestas moleculares a hipoxia. | 35 |
| 3.2.1 La respuesta a hipoxia en las células PC12. | 36 |
| IV. JUSTIFICACIÓN. | 38 |
| V. HIPÓTESIS. | 40 |
| VI. OBJETIVOS. | 40 |
| 1. Objetivo general. | 40 |
| 2. Objetivos particulares. | 40 |

| | |
|---|----|
| VII. MATERIAL Y MÉTODOS. | 40 |
| 1. Reactivos | 40 |
| 2. Cultivo celular | 41 |
| 3. Diseño experimental | 41 |
| 4. Extracción de núcleos y citoplasma | 42 |
| 5. Determinación de HIF-1 α nuclear | 42 |
| 6. Ensayo de cuantificación de ERO | 42 |
| 7. Ensayo de reducción de MTT | 43 |
| 8. Ensayo de viabilidad celular por SubG0 | 43 |
| 9. Niveles de ARNm de la HO-1 y la HO-2 por RT-PCR en tiempo real | 44 |
| 9.1. Aislamiento de ARN total | 44 |
| 9.2. Síntesis de ADNc | 44 |
| 9.3. Análisis de cuantificación de ARNm por PCR en tiempo real | 44 |
| 10. Extracción de mitocondrias | 45 |
| 11. Niveles de proteína por <i>Western blot</i> y ELISA | 45 |
| 12. Localización celular de la HO-1 y la HO-2 por inmunofluorescencia | 46 |
| VIII. RESULTADOS. | 48 |
| 1. Niveles proteicos y funcionalidad de HIF-1 y producción de ERO inducidas por CoCl ₂ | 48 |
| 2. Efecto del CoCl ₂ en la capacidad reductora, viabilidad celular y morfología celular | 49 |
| 3. Respuesta de la HO-1 a nivel de ARNm en un modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl ₂ en células PC12 | 51 |
| 4. Niveles proteicos de la HO-1 y su presencia en las fracciones nucleares y mitocondriales como respuesta al modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl ₂ en células PC12 | 51 |
| 5. Respuesta de la HO-2 a nivel de ARNm en un modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl ₂ en células PC12 | 57 |
| 6. Niveles proteicos de la HO-2 y su presencia en las fracciones nucleares y mitocondriales como respuesta al modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl ₂ en células PC12 | 57 |
| IX. DISCUSIÓN. | 63 |
| 1. HO-1 | 64 |
| 2. HO-2 | 66 |
| X. CONCLUSIONES. | 69 |
| XI. PERSPECTIVAS. | 69 |
| XII. REFERENCIAS. | 71 |

I. ABREVIATURAS

| Abreviaturas | Definición |
|-------------------------------|--|
| 2-OG | 2-oxoglutarato |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario. |
| Akt | Proteína cinasa B |
| AMPc | Adenosina monofosfato cíclico |
| AP-1/2 | Proteína activadora-1/2 |
| ARE | Elementos de respuesta antioxidante |
| Bach-1 | <i>BTB And CNC homology 1</i> |
| BK _{Ca} | Canales iónicos de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺ |
| BR | Bilirrubina |
| BV | Biliverdina |
| BVR | Biliverdina reductasa |
| C-terminal | Carboxilo terminal |
| CaMKII | Calmodulina cinasa dependiente de Ca ²⁺ -II |
| CO | Monóxido de carbono |
| COX | Citocromo oxidasa |
| CK-2 | Caseína cinasa-2 |
| CREB | Proteína de union a elementos de respuesta a AMPc |
| DMOG | Dimetiloxalilglicina |
| DFO | Deferoxamina |
| GC | Guanilato ciclasa |
| ERN | Especies reactivas de nitrógeno |
| ERK 1/2 | Proteína cinasa regulada por señales extracelulares-1/2 |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno |
| FIH | Factor inhibidor de HIF |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HAF | Factor activado por hipoxia |
| HIF | Factor inducible por hipoxia |
| HO | Sistema hemoxigenasa |
| HO-1 | Hemoxigenasa-1 |
| HO-2 | Hemoxigenasa-2 |
| HRE | Elementos de respuesta a hipoxia |
| HRM | Motivos de respuesta a hemo |

| | |
|-------------------|---|
| IgG-HRP | Inmunoglobulina G conjugada con peroxidasa de rábano |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| N-terminal | Amino terminal |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido reducido |
| NAD ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido |
| NADP ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| Nfκ-B | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activada |
| Nrf2 | Factor nuclear eritroide 2-relacionado al factor 2 |
| MAPK | Proteínas cinasas activadas por mitógenos |
| ODDD | Dominio de degradación dependiente de oxígeno. |
| p38 | Proteína cinasa p38 activada por mitógenos |
| PDH | Complejo piruvato deshidrogenasa |
| PDK1 | Piruvato deshidrogenasa cinasa-1 |
| PHDs | Protil-4-hidroxilasas |
| PI3K | Fosfoinositol 3 cinasa |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PKC | Proteína cinasa C |
| pVHL | Proteína von Hippel-Lindau |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa. |
| UTR | Regiones no traducidas |

II. RESUMEN.

El sistema hemoxigenasa (HO) está formado por enzimas óxido-reductasas ancladas a la membrana del retículo endoplásmico denominadas como hemoxigenasa-1 (HO-1) y hemoxigenasa-2 (HO-2), encargadas de regular los niveles de grupo hemo libre en la célula. Ambas isoenzimas transforman el grupo hemo a biliverdina (BV), monóxido de carbono (CO) y Fe^{2+} . Son consideradas como enzimas citoprotectoras contra diferentes eventos que generan estrés celular a través de la regulación del grupo hemo y a la producción de metabolitos como la BV y el CO que actúan como antioxidantes, anti-inflamatorios y anti-apoptóticos. La HO-1 es la isoenzima inducible regulada por varios factores de transcripción y se incrementa de forma considerable ante diversos mecanismos de daño celular. La HO-2, por otro lado, ha sido considerada históricamente como una isoenzima constitutiva. Desempeña un papel importante en diversos tejidos por tener niveles de expresión basales más altos a diferencia de la HO-1, por lo que se convierte en una de las fuentes primarias de defensa contra las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

Diversos trabajos han demostrado que ambas proteínas presentan respuestas tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* de hipoxia. Se ha observado que la HO-1 puede inducirse, desregularse o no sufrir cambios en diversos modelos de estrés hipóxico, sugiriendo que su papel ante este evento no es generalizado, a pesar que es un gen regulado por el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1). Recientemente se ha observado su localización en diferentes compartimentos celulares como el núcleo, la mitocondria y las caveolas como respuesta a eventos de estrés celular y en cáncer. Con respecto a la HO-2, ésta ha presentado respuestas diferenciales a nivel de transcrito y proteína en condiciones que involucran alteraciones de concentración de O_2 . Hasta el momento no existen suficientes estudios que ayuden a explicar el comportamiento de la HO-1 y la HO-2 ante un estrés hipóxico, por lo que existen muchas interrogantes sobre la respuesta de ambas isoformas en condiciones de hipoxia o en ambientes que mimeticen la hipoxia a través de la estabilización del factor HIF-1.

En este trabajo se evaluó la respuesta del sistema HO a nivel de transcrito a través del ensayo PCR (por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*) en tiempo real, proteína y distribución celular por *Western blot*, ELISA (por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) e inmunofluorescencia bajo condiciones de

hipoxia inducida químicamente por (Cloruro de cobalto) CoCl_2 en células PC12 (células derivadas del feocromocitoma de rata), las cuales son consideradas como modelo idóneo para el estudio de fenómenos de hipoxia, debido a que reproducen el comportamiento de las células del cuerpo carotídeo consideradas como las principales células que detectan los niveles de oxígeno fisiológicamente.

Las células se incubaron con 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 durante 24 y 48 h, debido a que bajo estas condiciones se observó la acumulación y funcionalidad del factor HIF-1 determinado por ELISA, estableciendo a las células en un ambiente que mimetiza a la hipoxia. Los niveles de ARNm de la HO-1 aumentaron significativamente con 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 a 24 y 48 h y a nivel de proteína provocó un aumento y translocación al núcleo y mitocondria como respuesta a ambas concentraciones de CoCl_2 y en ambos tiempos. La HO-2 no presentó cambios en los niveles de ARNm por acción del CoCl_2 , pero los niveles de proteína en citoplasma disminuyeron con 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 durante 24 y 48 h. La HO-2 se detectó en el núcleo en condiciones fisiológicas y los niveles proteicos disminuyeron por efecto del CoCl_2 con 1.0 mM de CoCl_2 a 24 h y en ambas concentraciones de CoCl_2 a 48 h. Se detectó también en las mitocondrias de manera fisiológica y se observó un aumento proteico con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl_2 a las 48 h de incubación.

Con base en estos resultados se concluye que las hemoxigenasas 1 y 2 presentan comportamientos particulares y diferentes a nivel de ARNm y proteína bajo una hipoxia inducida químicamente por CoCl_2 en células PC12, sugiriendo que ambas isoenzimas pueden ejecutar funciones distintas tanto dependientes e independientes a su actividad enzimática en diversos compartimentos celulares como en citoplasma, núcleo y mitocondria. También se concluye que la HO-2 no es estrictamente constitutiva, y que la localización de ambas isoenzimas no reside principalmente en el retículo endoplásmico, sino que pueden ser localizadas en núcleo y mitocondria y que podrían ejecutar funciones importantes para la supervivencia de las células PC12 ante un estrés hipóxico.

III. INTRODUCCIÓN.

1. El sistema hemoxigenasa (HO).

El sistema HO (EC 1.14.99.3) está formado por enzimas óxido-reductasas ancladas a la membrana del retículo endoplásmico orientadas hacia la cara citoplásmica encargadas de regular los niveles del grupo hemo libre en la célula (Maines, 1997; Ryter & Tyrrell, 2000; Gottlieb, 2012). La actividad enzimática que lleva a cabo el sistema HO se realiza a partir de la dimerización y función coordinada con el citocromo P450 NADPH reductasa, convirtiendo el grupo hemo a biliverdina (BV), monóxido de carbono (CO) y liberando Fe^{2+} (Figura 1) (Mancuso & Barone, 2009). Los integrantes del sistema HO provienen de genes independientes denominados como *hmx1* y *hmx2*, que a nivel de proteína son conocidos como hemoxigenasa-1 (HO-1) y hemoxigenasa-2 (HO-2). Aunque se describió una tercera isoenzima denominada hemoxigenasa-3 (HO-3), estudios posteriores mostraron que se trata de un pseudogen derivado de la HO-2, ya que no se ha detectado que codifique para una proteína distinta (Hayashi et al., 2004).

Actualmente, las enzimas que forman el sistema HO se consideran enzimas antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-apoptóticas por la reducción de los niveles de grupo hemo (molécula pro-oxidante) y la actividad biológica que tienen los metabolitos producidos durante la catálisis.

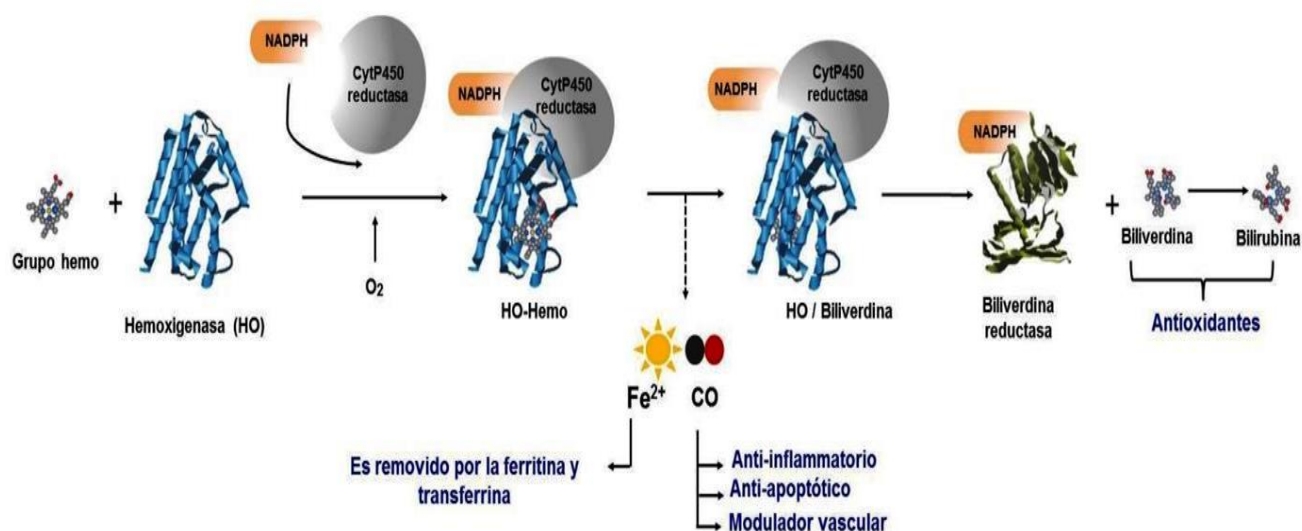


Figura 1. Representación de la actividad enzimática del sistema HO. Los metabolitos producidos durante la reacción catalítica poseen actividad biológica. La biliverdina y la bilirubina son potentes antioxidantes, el CO actúa como un modulador vascular, anti-inflamatorio y anti-apoptótico, el Fe^{2+} libre es removido por la acción de la transferrina y la ferritina evitando la formación del radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton.

1.1. El grupo hemo y la reacción de degradación catalizada por el sistema HO.

El grupo hemo es un grupo prostético importante para la actividad de varias enzimas óxido-reductasas como la catalasa, la óxido nítrico sintasa (NOS), la citocromo oxidasa (COX), la NADPH oxidasa y algunos citocromos P450 y para proteínas transportadoras de oxígeno (O₂) como la hemoglobina y la mioglobina (Kumar & Bandyopadhyay, 2005). Sin embargo, cuando estas hemoproteínas liberan el grupo hemo por estrés celular, éste comienza a causar daño tisular y celular, debido a que su extremo hidrofóbico se intercala en la membrana plasmática y de organelos celulares aumentando la susceptibilidad de sufrir daño membranar. Una vez que el hemo está en la membrana celular, Las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas por fuentes como la mitocondria y la NADPH oxidasa, rompen el anillo tetrapirrólico del hemo liberando Fe²⁺. Éste amplifica la producción de ERO en el interior de la célula a partir de la reacción de Fenton, desencadenando procesos de daño celular como la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas (Belcher et al., 2010). Los mecanismos tóxicos desencadenados por el grupo hemo son neutralizados por el sistema HO.

La reacción enzimática del sistema HO inicia con la formación del complejo HO-Fe³⁺ hemo, la donación de dos electrones proveniente de la NADPH mediada por la citocromo P450 NADPH reductasa y la unión de una molécula de O₂, produciendo un intermediario denominado como hidroperóxido (Fe³⁺-OOH). Este intermediario, ataca al carbono meso α de la porfirina formando α -meso Fe³⁺-hidroxihemo. Esta especie, es convertida a Fe²⁺-verdohemo por la reacción de una molécula de O₂ y la adición de un electrón, produciendo también una descarboxilación en forma de CO del carbono α . La siguiente reacción es la formación del complejo Fe³⁺-biliverdina IXa por medio de la reacción con una molécula de O₂ y tres electrones. Finalmente, la adición de un electrón a este complejo permite la liberación del Fe²⁺ y la formación de la BV. Posteriormente la BV es convertida a bilirrubina (BR) a través de la Biliverdina reductasa (BVR), la cual requiere de 2 electrones (Figura 2) (Kikuchi et al., 2005).

1.2. Metabolitos del sistema HO y su función celular.

1.2.1. Los pigmentos biliares (BV y BR).

La BV y la BR son pigmentos biliares con alto poder reductor y que funcionan como potentes antioxidantes (Vitek & Schwertner, 2007). Ambas moléculas

pueden prevenir la lipoperoxidación más eficientemente que la vitamina E (Wu et al., 1994) e incluso son capaces de suprimir la producción de las ERO y de nitrógeno (ERN) desencadenada por los leucocitos (Jansen & Daiber, 2012). También se ha demostrado que la BV es tres veces más potente en inhibir la nitración de las tirosinas de varias proteínas inducidas por el peroxinitrito (Jansen et al., 2010). Estudios *in vitro* utilizando un cultivo neuronal de rata demostraron que una concentración de 10 nM de BR protege a las células contra concentraciones de 10,000 veces más altas de H₂O₂, sugiriendo que la BR no puede estar actuando como un antioxidante con una estequiometría (1:1) contra el H₂O₂. El potente efecto antioxidante de los pigmentos biliares se ha explicado por un mecanismo denominado como reciclaje entre la BR y BV, el cual consiste en la oxidación de la BR por las ERO formando de nuevo la BV y ésta es convertida a BR por la BVR (Sedlak & Snyder, 2004). Ambas moléculas actúan como anti-inflamatorios, ya que son capaces de inhibir citocinas pro-inflamatorias y aumentar los niveles de citocinas anti-inflamatorias a través de la modulación del factor de transcripción NFκ-B y el incremento de la actividad de Akt. (Haga et al., 1996). También se ha demostrado que la BV juega un papel muy importante en la regulación de la vía de señalización MAPKs y de la PKCδ controlando la activación génica inducida por mitógenos y estímulos de estrés (Lerner-Marmarosh et al., 2005).

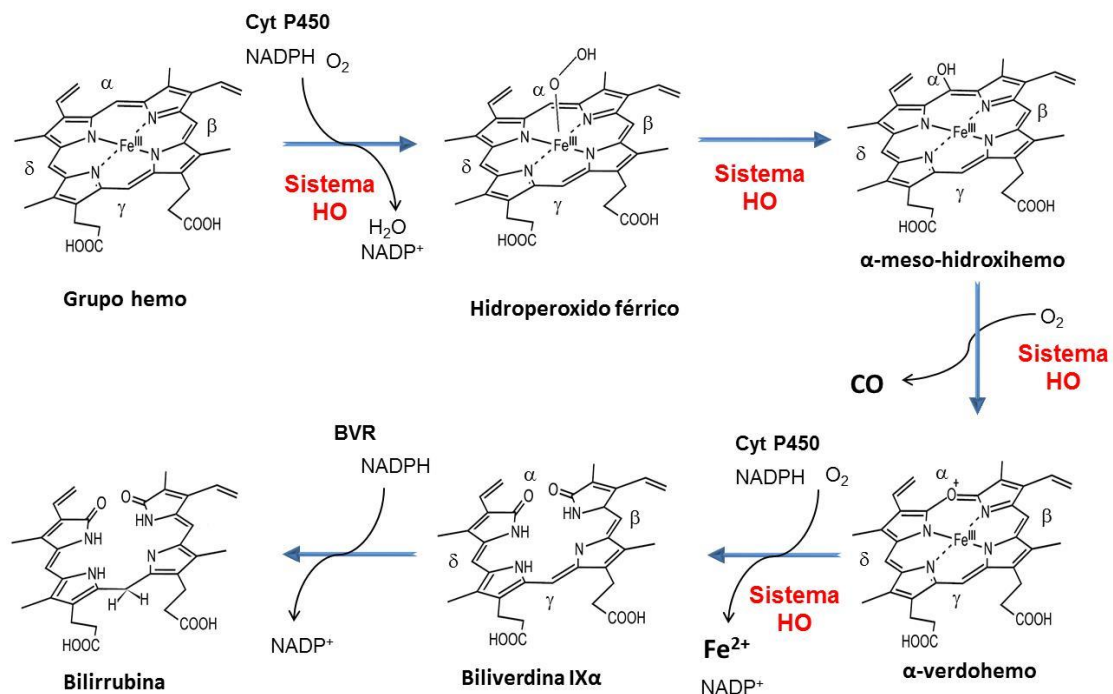


Figura 2. Mecanismo de degradación del grupo hemo. La conversión del grupo hemo a biliverdina IXα es catalizada por el sistema HO y la biotransformación de la biliverdina IXα a bilirrubina es catalizada por la Biliverdina reductasa. α, β, γ y δ representan las posiciones de los carbonos del grupo hemo. Modificado de Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2014.

1.2.2. El CO.

Aunque el CO ha sido considerado como un gas tóxico debido a la interrupción del transporte de O₂ de la hemoglobina, en la actualidad se ha demostrado que posee un papel importante en la regulación de varios procesos fisiológicos. Distintos estudios han revelado que el CO interviene en varios procesos de señalización intracelular, culminando efectos como: 1) modulador vascular (vasodilatador); 2) anti-inflamatorio; 3) anti-proliferativo y 4) anti-apoptótico. El CO modula la actividad de varias enzimas como la citocromo P450, la COX, la NADPH oxidasa, la NOS y la guanilato ciclasa (GC) a través de su interacción directa con estas proteínas. En el caso de la GC, el CO incrementa la producción de GMPc permitiendo la vasodilatación, la regulación en la neurotransmisión, la inhibición de la agregación de plaquetas y efectos anti-proliferativos en el músculo liso. El CO inhibe la actividad de la NADPH oxidasa reduciendo la producción de ERO y la actividad de la NOS disminuyendo la producción del óxido nítrico (NO) y del peroxinitrito. Con respecto a los mecanismos anti-inflamatorios, se ha observado que el CO inhibe la vía de señalización MAPK-p38, que es responsable de la regulación de citocinas pro- y anti-inflamatorias (Otterbein et al., 2000). Por otro lado, el CO tiene efectos importantes en la mitocondria, promoviendo la biogénesis mitocondrial y regulando las concentraciones de Ca²⁺ mitocondrial. Estos efectos tienen influencia en la modulación de la muerte celular apoptótica (Dennerly, 2014).

1.2.3. El Fe²⁺.

El hierro es un elemento esencial para numerosas proteínas celulares, ya que cumple funciones biológicas importantes como el transporte de O₂, la transferencia de electrones de enzimas óxido-reductasas, el metabolismo celular durante la neurotransmisión y la síntesis de ADN. Sin embargo, la concentración alta de Fe²⁺ libre provoca efectos tóxicos, ya que es responsable de producir ERO como el radical hidroxilo por medio de las reacciones Haber-Weiss y Fenton. La liberación del Fe²⁺ por acción del sistema HO es controlado por medio de la inducción de la ferritina, una proteína "atrapadora de Fe²⁺" suprimiendo los efectos tóxicos de éste (Schipper, 2004). Actualmente se ha observado en estudios con sulfato de hierro en un modelo *in vitro*, que el Fe²⁺ incrementa la viabilidad celular ante un daño inducido por el NO. Dentro de estos estudios, se ha observado la formación endógena de complejos de sulfuro-Fe²⁺, los cuales tienen la capacidad de atrapar el NO

formando complejos DNIC (*dinitrosyl iron-sulfur complex*). Estos complejos son capaces de inhibir la actividad de las caspasas. De esta manera el hierro tiene mecanismos de protección ante los efectos tóxicos del NO (Kim et al., 2000).

Por lo tanto, la reacción enzimática del sistema HO es importante para la señalización celular y los mecanismos de citoprotección a través de sus metabolitos. Sin embargo, muchos tejidos y células contienen bajos niveles del grupo hemo, indicando posibles funciones no enzimáticas del sistema HO.

1.3. El sistema HO y su importancia en la señalización celular.

La HO-1 y la HO-2 son proteínas homólogas, con una identidad del 45% y un plegamiento proteico muy similar. La alineación de la secuencia primaria de ambas proteínas muestra dos regiones diferentes: La primera se localiza en el residuo 127 y la otra en la región carboxilo terminal (C-terminal) entre los residuos 240 y 295 de la HO-2 (Figura 3). Varios trabajos han demostrado que las diferencias en el dominio C-terminal de ambas isoenzimas juegan un papel importante para la función particular de cada proteína (ver apartado funciones no enzimáticas de la HO-1 y la HO-2 como sensor de O₂). Un segmento de 24 residuos se ha conservado en ambas proteínas. En la HO-1, este segmento corresponde a los residuos 126-149 y para la HO-2 corresponde a los residuos 145-168 en humano. Este fragmento conforma el sitio catalítico (Rotenberg & Maines, 1991) y comprende una sustitución conservativa de leucina en la HO-1 por una metionina de la HO-2. En la secuencia de los 24 residuos se ha conservado la histidina 132 para la HO-1 y 151 en la HO-2, que son residuos importantes para facilitar la reacción catalítica (McCoubrey & Maines, 1993). Por otro lado los residuos de histidina 25 para la HO-1 y la histidina 45 para la HO-2 son esenciales para la estabilización del hierro en el grupo hemo y llevar a cabo la reacción catalítica (Wilks et al., 1996) (Figura 3). A pesar de que la HO-1 y HO-2 catalizan la misma reacción, tienen propiedades bioquímicas, distribución tisular y regulación génica diferentes.

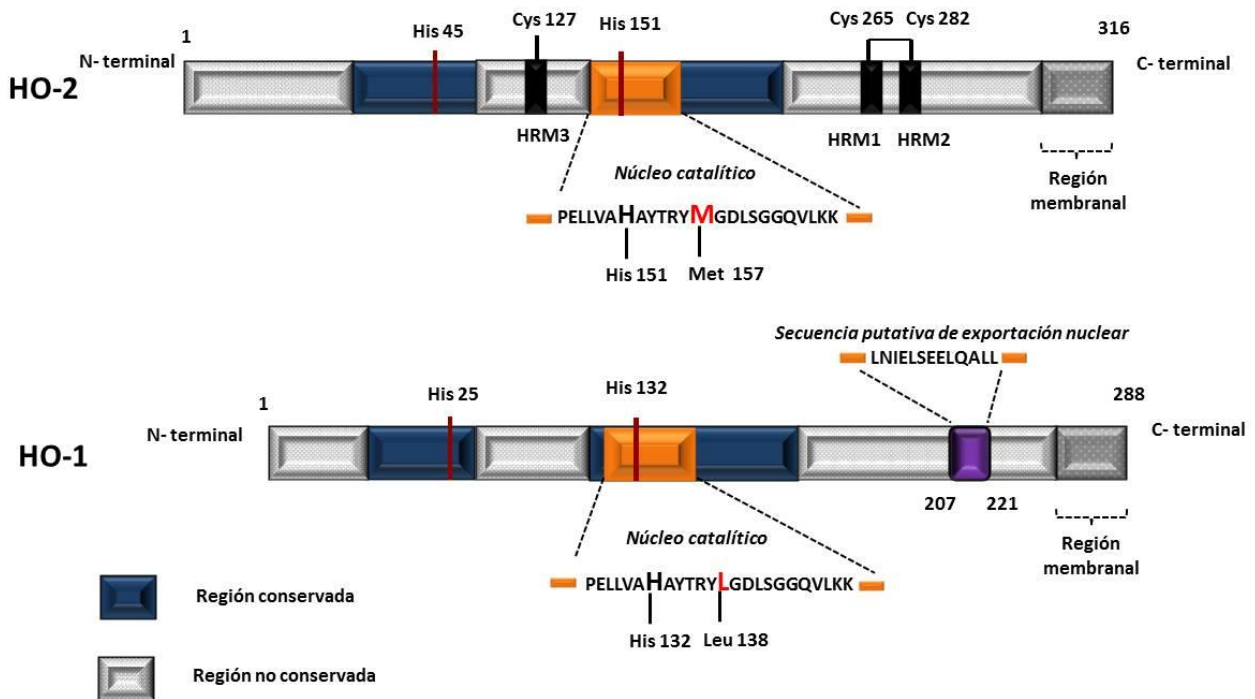


Figura 3. Comparación estructural de las proteínas HO-1 y HO-2 a nivel de proteína. El área azul representa las regiones conservadas (identidad del 45 % y una similitud del 76%). La HO-2 posee 3 HRMs (del inglés *Heme Response Motifs*), las histidinas 25 y 132 para la HO-1 y las histidinas 45 y 151 para la HO-2, son esenciales para la reacción catalítica. La HO-1 posee una secuencia putativa de exportación nuclear (LNIELSEELQALL) en el C-terminal (Modificado de Muñoz-Sánchez & Chánez Cárdenas, 2014).

1.3.1. La hemoxigenasa-1 (HO-1).

La HO-1 fue la primera isoenzima descrita. Se caracterizó en el proceso de degradación de los eritrocitos ya que tiene una importante función de eliminación de los efectos tóxicos del grupo hemo en el bazo (Maines, 2000). La HO-1 es el resultado de un sólo transcrito (1.8 kb) compuesto de 5 exones y 4 intrones. A nivel de proteína pesa 32 kDa y se ha clasificado como parte de una familia de proteínas de choque térmico denominada Hsp32. Es la isoforma inducible y actualmente se ha considerado como el gen que más se induce por efecto de diversos estímulos, debido a que es regulada por diversas moléculas de señalización y factores de transcripción como proteínas cinasas MAPKs (JNK, p38, ERK1/2), PKC, PKA, PI3K/Akt, Nrf2, HIF-1, NFκ-B, AP-1, AP-2 y CREB, entre otros (Immenschuh & Ramadori, 2000; Alam & Cook, 2007). La regulación de la HO-1 por estos factores se debe a la presencia de múltiples elementos reguladores en su promotor como son los elementos de respuesta antioxidante (ARE, de *Antioxidant Response Elements*), los elementos de respuesta a cAMP (CRE de *cAMP Response Elements*) y

los elementos de respuesta a hipoxia (HRE de *Hipoxia Response Elements*), que incrementan de manera considerable los niveles de la HO-1 en estímulos como la isquemia, la hiperoxia, las endotoxinas bacterianas, el H₂O₂, el β-amiloide, el ácido kaínico, la dopamina, las prostaglandinas, las radiaciones ionizantes, las citocinas inflamatorias y los metales pesados, entre otros (Dennerly, 2000; Schipper, 2000). Otros factores de transcripción que intervienen en la regulación de la HO-1 son Bach-1 y Jun D, que juegan un papel importante como represores transcripcionales (Shan et al., 2006). En humanos, la HO-1 presenta un polimorfismo satélite en su promotor que regula la respuesta transcripcional ante diferentes estímulos. Se ha observado que los individuos con un menor número de repeticiones (GT)_n presentan una mayor expresión de HO-1 que los individuos con un mayor número de repeticiones (GT)_n. Existen estudios que indican que los individuos con un menor número de repeticiones y mayor expresión de HO-1 presentan menor susceptibilidad a presentar patologías, principalmente cardiovasculares y renales por el papel protector que juega la HO-1 (Exner et al., 2004).

Con respecto a su distribución tisular, se ha visto que esta isoenzima se expresa en bajos niveles en condiciones fisiológicas, excepto en bazo e hígado. También se ha encontrado la presencia de la HO-1 en ciertas zonas del cerebro como el cerebelo, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo y la corteza cerebral en condiciones fisiológicas (Bergeron et al., 1998). Sus niveles de expresión aumentan considerablemente como respuesta a la supervivencia y protección celular en una variedad de condiciones patológicas como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, pancreatitis aguda, insuficiencia renal aguda, enfermedad de Alzheimer, asma, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, enfermedad gastrointestinal, daño pulmonar inducido por hipoxia, hipertensión, daño hipóxico-isquémico, nefritis, trasplante de órganos, daño de la médula espinal, entre otros (Wagener et al., 2003).

1.3.1.1. Funciones no enzimáticas de la HO-1.

El papel de la HO-1 como enzima antioxidante y citoprotectora se debe a su capacidad de ser inducida por diversos estímulos de daño y a los metabolitos producidos durante la degradación del grupo hemo. Sin embargo, existen trabajos que han observado que la HO-1 enzimáticamente inactiva es capaz de seguir protegiendo contra un daño oxidativo. La sobreexpresión de esta mutante sin

actividad incrementa los niveles de la catalasa y del glutatión confiriendo efectos antioxidantes (Hori et al., 2002) y previniendo la toxicidad inducida por H₂O₂ pero no ante la toxicidad inducida por el grupo hemo (Lin et al., 2008). Las funciones protectoras no enzimáticas de esta isoenzima no se han podido describir con mayor detalle. Sin embargo, recientemente se han estudiado funciones novedosas como la capacidad de translocación de la HO-1 hacia diversos compartimentos celulares como el núcleo, la mitocondria y las caveolas como respuesta a diferentes estímulos de estrés celular y en cáncer.

1.3.1.2. Localización subcelular de la HO-1 y su participación en la señalización celular.

En condiciones de hipoxia e hiperoxia, la HO-1 puede migrar al núcleo alterando la actividad de varios factores de transcripción como Nrf2 y Ap-1 (Biswas, et al., 2014; Dennery, 2014; Lin et al., 2007) y regular su propia expresión. Dado que la HO-1 es una enzima anclada en la membrana del retículo endoplásmico, se ha caracterizado que esta migración se debe a un corte proteolítico que sufre en el extremo C-terminal exponiendo una secuencia putativa comprendida entre los aminoácidos 207-221 de la HO-1 de humano (LNIELSEELQALL). Esta secuencia tiene un 90% de identidad con la secuencia motivo de exportación nuclear (LX₁₋₃LX₂₋₃LXL) encontrada en la proteína Rev del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (Dennery, 2014), sugiriendo que es responsable de señalar su migración al núcleo como respuesta a la hipoxia e hiperoxia (Figura 3) (Biswas, et al., 2014; Linnenbaum et al., 2012). El fragmento proteico de la HO-1 nuclear corresponde a los primeros 237 aminoácidos con un peso molecular de 28 kDa el cual no contiene el extremo C-terminal. La HO-1 puede interactuar con distintas proteínas nucleares como la ribonucleoproteína nuclear heterogénea (HnRNPK) (un modulador de la transcripción y traducción), proteínas de reparación de DNA (PARP), factores de transcripción como STAT3, Nrf2, entre otras (Dennery, 2014; Biswas, et al., 2014). La presencia de la HO-1 en el núcleo por estrés celular como la hipoxia, ha sido caracterizada como moduladora en la actividad transcripcional de varios factores como NFκ-B, AP-1 y 2, Brn-3 y CBF (*core binding factor*) aunque no se conoce si existe interacción física entre esta isoenzima y estos factores de transcripción (Lin et al., 2007). Por lo tanto, el papel fisiológico de la HO-1 nuclear en un estrés oxidante, podría modular y potenciar la transcripción de proteínas antioxidantes y promover funciones de reparación al DNA.

Existen reportes sobre la migración a la mitocondria de la HO-1 bajo cualquier tipo de estrés celular, aparentemente para modular la muerte celular mediada por la mitocondria, dado que su actividad enzimática se incrementa en este organelo. Sin embargo, el mecanismo de acción de la HO-1 mitocondrial metabólicamente activa no ha sido elucidado ni tampoco se ha sugerido cómo es translocado a este organelo (Dennery, 2014). Finalmente se ha demostrado la presencia de la HO-1 en las fracciones ricas de caveolas en células mesenquimales retadas con varios estímulos e incluso se ha demostrado su interacción con la caveolina-1 y caveolina-2 alterando la cinética de la reacción del sistema HO (Taira et al., 2011; Jung et al., 2003).

1.3.2 La hemoxigenasa 2 (HO-2).

La HO-2 ha sido considerada históricamente como la isoforma constitutiva. En la última década pocos grupos se han dedicado a describir las características bioquímicas y el papel que desempeña en procesos fisiológicos y patofisiológicos. Varios autores han catalogado el gen de la HO-2 como un gen muy complejo, ya que se han identificado 5 transcritos diferentes en mamíferos, en un rango de 1.3 a 2.4 Kb (1.3, 1.7, 1.9, 2.1, 2.4 Kb). Estos transcritos comparten un número de 5 exones y 4 intrones. El número y tamaño de los transcritos se debe a la edición alternativa que sufre en la región 5' no traducida (UTR) cercana al exón 1 y en dos señales de poliadenilación que están separadas por 560 nucleótidos. Actualmente no se sabe cómo durante el procesamiento se selecciona la señal de poliadenilación en este transcrito. A pesar de los diferentes ARNm, todos codifican una sola proteína. Por otro lado, se ha visto que la cadena negativa del intrón 1 de la HO-2, contiene una secuencia de 1046 nucleótidos con un 87% de identidad a un ADNc que corresponde a la proteína HMG17 (*High Mobility Group Protein 17*), una proteína no histónica que se localiza en el núcleo y está implicada en la regulación de la estructura de la cromatina y la activación transcripcional de genes. Se ha demostrado que entre las dos señales de poli-adenilación, se forman estructuras secundarias (*stem/loops*) que proporcionan sitios de unión a proteínas que controlan la estabilidad del ARNm y el control de la traducción (McCoubrey et al., 1995; revisado en Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2014).

La expresión de la HO-2 se ha detectado predominantemente en cerebro, testículos, endotelio, hígado y la porción distal de la nefrona. Se ha observado que responde a hipoxia e isquemia, sugiriendo que esta isoenzima es capaz de responder

a cambios en el estado de óxido-reducción celular. En condiciones de hipoxia se ha visto que la relación de los transcritos 1.3/1.9 Kb son alterados, siendo el transcrito más pequeño el que se traduce con mayor eficiencia (Sun et al., 1990). A través de este comportamiento se ha sugerido que su regulación principal depende del control de los niveles de los ARNm, dado que el único elemento de respuesta transcripcional descrito hasta el momento, es un sitio de unión a glucocorticoides (GRE de *Glucocorticoid Response Element*) (Raju et al., 1997). La HO-2 sufre una modificación post-traducciona mediante la fosforilación de la serina 79 por la caseína cinasa 2 (CK2). El proceso de fosforilación resulta de la activación y señalización de Ca²⁺/calmodulina y la PKC (Boehning et al, 2003; revisado en Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2014).

1.3.2.1. Funciones no enzimáticas. La HO-2 como sensor de oxígeno.

La HO-2 posee dos motivos reguladores del grupo hemo denominados como HRM (*Heme Response Motifs*) (Figura 3). A la fecha, se han identificado ocho proteínas que contienen estos HRM y son clasificadas como proteínas reguladoras de O₂ y grupo hemo. Las proteínas son: aminolevulinato sintasa 1 y 2, Bach-1, la proteína cinasa eIF2, Hap1, IRP2, IR, Per2 y finalmente la HO-2 (Ragsdale & Yi, 2011).

El motivo HRM está formado por un núcleo dipeptídico conservado de cisteína-prolina flanqueado por un aminoácido básico en el amino terminal (N-terminal) y un aminoácido hidrofóbico en el C-terminal. Son considerados como sitios de unión al grupo hemo responsables de regular la actividad y función de las proteínas relacionadas con los procesos de respiración y daño oxidativo, en la coordinación de la síntesis de proteínas y en el control de la disponibilidad del grupo hemo (Hon et al., 2000; Lee et al., 2003). Los sitios HRM de la HO-2 están localizados en los residuos de Cys²⁶⁵ y Cys²⁸². Los primeros estudios acerca de los HRM de la HO-2 sugerían que esta enzima además de degradar al grupo hemo, podría mantenerlo "secuestrado" a través de los HRM. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que no es un sitio de unión al grupo hemo *per se* sino que su función está más ligada a detectar las concentraciones de O₂. La función de estos motivos es regular de manera indirecta la afinidad de la HO-2 por el grupo hemo a través de los cambios de óxido-reducción que sufren los residuos de cisteína de ambos HRMs, formando las formas reversibles tiol-disulfuro. En otras palabras, funcionan como

interruptores para cambiar la afinidad por su sustrato dependiendo del estado redox en el que se encuentre (Yi & Ragsdale, 2007). Se ha reportado que el valor de **Kd** para el complejo HO-2-hemo cuando las cisteínas de los HRM1 y 2 están en un estado reducido (ditiol) es de 350 nM, mientras que el valor de **Kd** cambia a 33 nM cuando los HRMs están en su forma oxidada (disulfuro). El cambio al estado oxidado de los HRMs aumenta la afinidad de la HO-2 por el grupo hemo (Figura 3) (Yi et al., 2009).

A partir de la descripción de los HRMs de la HO-2 se ha relacionado el papel de la HO-2 en la regulación de los canales iónicos de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (BK_{Ca}). Estos tienen una gran importancia en las células tipo I del cuerpo carotídeo como canales iónicos que funcionan en la respuesta a los cambios de O₂. El cuerpo carotídeo es un órgano secretor ubicado a nivel de la bifurcación de la arteria carótida común y actúa como quimiorreceptor de la sangre. Es responsable de la detección de O₂ y la respuesta hipóxica fisiológica (Cui et al., 2009). Durante la hipoxia, los canales BK_{Ca} de las células del cuerpo carotídeo se encuentran bloqueados, permitiendo la despolarización membranal y el incremento de Ca²⁺ intracelular. La modulación de la actividad de los canales BK_{Ca} está dada a través de los estados de óxido-reducción por medio de la formación tiol/disulfuro en los dominios de unión a hemo (HBD) de estos canales. Adicionalmente, la actividad de los BK_{Ca} también está regulada por el grupo hemo y los niveles de CO. Por lo tanto, la HO-2 es responsable de la actividad de los canales, ya que ésta es la principal responsable de la regulación de los niveles del grupo hemo y la producción de CO en estas células. Bajo condiciones normales de O₂, los dominios HRM de la HO-2 y HBD de los canales BK_{Ca} están en un estado oxidado, donde la afinidad de la HO-2 por el grupo hemo es alta y la afinidad del hemo por los canales BK_{Ca} es baja. A través de estos cambios de afinidades de ambas moléculas por el grupo hemo se regula la apertura de los BK_{Ca} por la disociación del grupo hemo o por acción del CO generado a través de la catálisis de la HO-2, ya que el CO actúa como un modulador positivo en la actividad de estos canales. En condiciones de hipoxia, los bajos niveles de O₂ permiten que los HRMs de la HO-2 pierdan su afinidad por el sustrato ocasionando que el hemo se una a los HBD bloqueando la actividad de los canales BK_{Ca}. Por otro lado, la baja producción de CO en hipoxia potencia el cierre de los canales BK_{Ca}. A partir de este vínculo entre la HO-2 y los canales BK_{Ca} se ha considerado que esta isoforma funciona como un sensor de O₂ (figura 4) (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas 2014; Cui et al., 2009; Yi & Ragsdale, 2007).

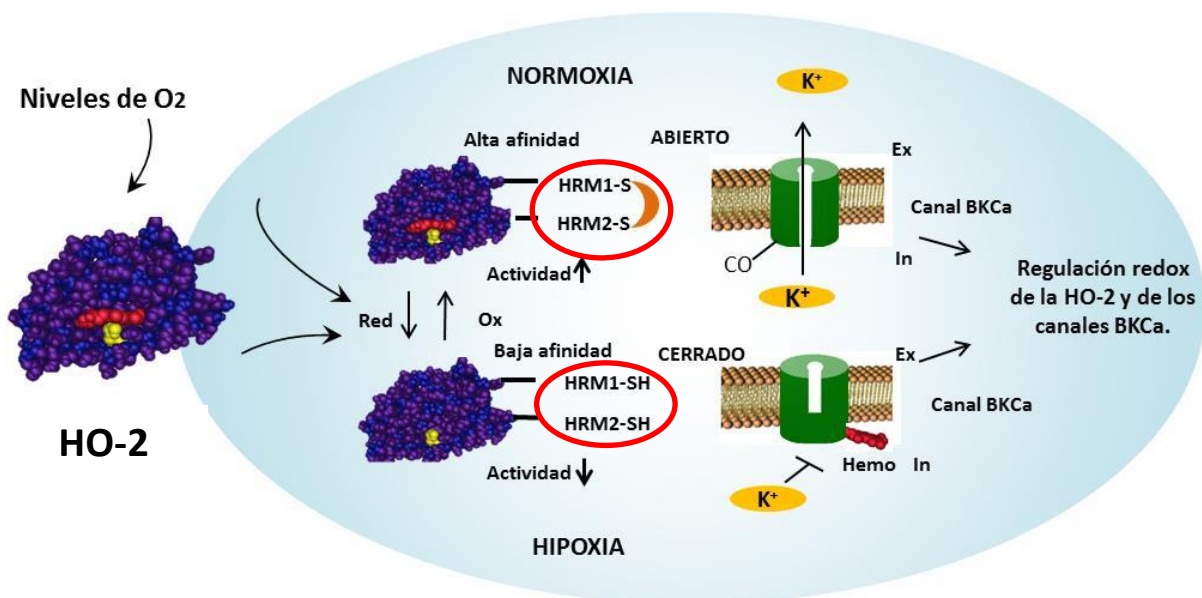


Figura 4. Modelo de regulación por óxido-reducción de la HO-2 y la actividad de los canales BK_{Ca}. En condiciones normales de O_2 , la actividad de la HO-2 permite la apertura de los canales BK_{Ca} a través de la disponibilidad del grupo hemo y la producción de CO, mientras que en condiciones de hipoxia, la afinidad de la HO-2 por el grupo hemo disminuye, permitiendo el cierre de los canales BK_{Ca} HRM (Motivos de respuesta a hemo) (Modificado de Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas 2014).

2. La hipoxia.

El O_2 es una molécula esencial para las funciones metabólicas de los organismos aerobios. Su función principal es ser el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, permitiendo el flujo continuo del metabolismo oxidativo y la generación de energía celular en forma de ATP (adenina trifosfato), una molécula importante utilizada en reacciones catabólicas y anabólicas para el mantenimiento de la viabilidad celular. Bajo condiciones normales de O_2 (normoxia) las células conservan de manera continua una proporción de ATP/ADP para seguir manteniendo su sobrevivencia. La dependencia de las células a la proporción constante de ATP/ADP está directamente relacionada a la dependencia del O_2 . Por lo tanto, la reducción del suministro normal de O_2 tiene consecuencias en la viabilidad celular (Lopez-Barneo et al., 2001; Hardie, 2003). La hipoxia se define entonces como la disminución del aporte de O_2 a las células, limitando la producción de energía a niveles por debajo de los requerimientos celulares.

La hipoxia es una condición celular que puede presentarse en procesos patofisiológicos como la aterosclerosis, la diabetes, las enfermedades isquémicas de distintos órganos, el cáncer y en general las patologías angiogénicas; pero también

se presenta en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario (Brahimi-Horn & Pouyssegu, 2007; Brahimi-Horn et al., 2007; Sluimer et al., 2008; Li et al., 2006). Dependiendo de la duración de la hipoxia, ésta se clasifica en aguda, intermedia y crónica. En los vertebrados, los distintos órganos están sometidos a diferentes ambientes hipóxicos, debido a que el suministro de O₂ no es igual para todos (Tabla 1). La hipoxia se clasifica en varias categorías en función de las concentraciones de O₂ establecidas en normoxia (21% de O₂) como hipoxia moderada, intermedia, fisiológica y anoxia (Tabla 2) (Koh & Powis, 2012; Carreau et al., 2011).

Tabla 1. Concentraciones de O₂ fisiológico en distintos tejidos humanos.

| Órgano | pO₂ (mmg) | % O₂ |
|-------------------|-----------------------------|------------------------|
| Tráquea | 150 | 19.7 |
| Alveolos | 110 | 14.5 |
| Sangre arterial | 100 | 13.2 |
| Cerebro | 35 | 4.4 |
| Tejido intestinal | 58 | 7.6 |
| Hígado | 41 | 5.4 |
| Riñón | 72 | 9.5 |
| Músculo | 29 | 3.8 |
| Médula ósea | 49 | 6.4 |

Tabla 2. Términos que describen las bajas concentraciones de O₂.

| Condición | pO₂ (mmHg) | %O₂ |
|---------------------|------------------------------|-----------------------|
| Normoxia (ambiente) | 159 | 21% |
| Hipoxia fisiológica | 15-68 | 2-9% |
| Hipoxia intermedia | 8-38 | 1-5% |
| Hipoxia | < 8 | < 1% |
| Anoxia | < 0.08 | <0.1% |

La capacidad de detectar las concentraciones de O₂ fue originalmente atribuida sólo a células quimiorreceptoras especializadas, tales como las del cuerpo carotídeo y células del neuroepitelio que regulan las tasas cardiovasculares y respiratorias respectivamente. Actualmente se sabe que todas las células nucleadas en el ser humano detectan el O₂ y responden al estrés hipóxico.

2.1 Cambios bioquímicos en la respuesta a la hipoxia.

Las respuestas celulares de adaptación a los cambios agudos de la concentración de O_2 (duración de segundos a unos pocos minutos) ocurren principalmente como resultado de alteraciones de estados de fosforilación y óxido-reducción de proteínas existentes, mientras que en los cambios crónicos en la concentración de O_2 (de minutos a horas) las respuestas adaptativas se basan principalmente en alteraciones de la expresión génica (Koh & Powis, 2012).

2.1.1. Disrupción iónica membranal y el papel del Ca^{2+} en hipoxia.

La pérdida de la homeostasis iónica se debe en parte a los canales de K^+ sensibles a O_2 y a la disminución de la producción de ATP. En condiciones de normoxia, se ha estimado que el 60% de la producción de ATP es utilizado por las bombas de Na^+/K^+ y Ca^{2+}/H^+ ATPasas (Erecinska & Silver, 2001). Durante la hipoxia, la disminución de los niveles de ATP potencia el eflujo de K^+ y el influjo de Ca^{2+} y Na^{2+} de manera no controlada. El bloqueo de la actividad de los canales de K^+ provoca la despolarización membranal y activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje causando un incremento de Ca^{2+} intracelular. Lo anterior ocasiona distintos efectos celulares como: 1) cambios en el metabolismo mitocondrial; 2) activación de lipasas y proteasas induciendo daño membranal; 3) activación de endonucleasas y 4) generación de ERO (Bickler & Donohoe, 2002; Seta et al., 2004). La conexión entre la respuesta a hipoxia aguda (procesos de despolarización membranal) y la respuesta a hipoxia crónica (cambios en la expresión génica) está en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Bajo condiciones de hipoxia crónica, los cambios de la expresión génica son regulados principalmente por los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs, del inglés *Hypoxia Inducible Factors*). Aunque intervienen también otros factores como CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc), c-fos y jun B (factor de transcripción AP-1), ATF-2 (factor de transcripción activador-2), entre otros (Spicer & Millhorn, 2003; Choi et al., 2009). La proteína clave que vincula la hipoxia aguda y crónica es la calmodulina cinasa dependiente de Ca^{2+} -II (CaMKII). El incremento de Ca^{2+} intracelular permite su unión a la proteína calmodulina activando a la CaMKII que a su vez fosforila al co-activador p300 induciendo la actividad transcripcional de HIF (Semenza et al., 2006).

2.1.2 Los factores inducibles por hipoxia.

Mientras que la disrupción iónica es una respuesta aguda en un evento de hipoxia, la respuesta a hipoxia crónica involucra cambios en la expresión génica (Semenza, 1999). El mecanismo esencial en este último proceso es la estabilización de los HIFs. Los HIFs son factores de transcripción considerados como los principales reguladores de la respuesta hipóxica crónica (Bracken et al., 2003). Son heterodímeros compuestos por una subunidad alfa [HIF-1 α , HIF-2 α (también conocido como EPAS1, HOP2 o HLF), y HIF-3 α] y una subunidad beta (HIF-1 β) conocida también como ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), los cuales forman los complejos transcripcionales HIF-1, HIF-2 y HIF-3 respectivamente. La subunidad HIF-1 α es una isoforma que se expresa de manera ubicua, mientras que la HIF-2 α solamente se expresa en tejidos específicos como las células endoteliales, el cerebro, el hígado, el páncreas, el riñón, el corazón, los pulmones y en el intestino delgado (Semenza, 2001; Bracken et al., 2003; Fedele et al., 2002; Piret et al., 2002). Ambas isoformas son las más estudiadas actualmente. HIF-1 α y HIF-2 α tienen un 48% de identidad en la secuencia de aminoácidos y un plegamiento proteico muy similar. Sin embargo, tienen funciones no redundantes debido a mecanismos de regulación diferencial induciendo genes no superponibles (Dengler et al., 2014). Las subunidades α y β poseen en el extremo N-terminal, un dominio bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*) y un dominio PAS (*Period clock-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Single minded*). El dominio bHLH regula la dimerización y la unión al ADN y el dominio PAS participa en la selección del gen blanco (Figura 5). Debido a que la expresión del HIF-1 β es constitutiva, la actividad del complejo HIF es regulada exclusivamente por la expresión de las subunidades α (Fedele et al., 2002; Dengler et al., 2014).

En muchas líneas celulares HIF-1 α responde a periodos de hipoxia cortos (2-24 h) y concentraciones de O₂ \leq 1%, mientras que HIF-2 α es activado bajo condiciones de hipoxia fisiológica o intermedia (<5% O₂) y se mantiene activa incluso después de 48 a 72 h (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Koh & Powis, 2012). En ciertas condiciones de estrés hipóxico, HIF-1 dirige una respuesta inicial a hipoxia, mientras que durante la hipoxia crónica, HIF-2 es el principal modulador. **Este "switch" de los HIFs resulta de un acoplamiento divergente entre HIF-1 y HIF-2 con funciones complementarias durante la respuesta a hipoxia en tejidos bajo condiciones fisiológicas y patofisiológicas (Koh et al., 2011).**

HIF-3 α es la isoforma menos estudiada pero se ha reportado que también tiene una gran similitud a HIF-1 α y a HIF-2 α en los dominios bHLH y PAS. Sin embargo, carece del dominio de transactivación C-terminal (TAD-C). HIF-3 α sufre edición alternativa. El producto más estudiado de este proceso pertenece a la proteína con dominio inhibidor de PAS, una proteína truncada que actúa como modulador negativo de HIF-1 α (Dengler et al., 2014).

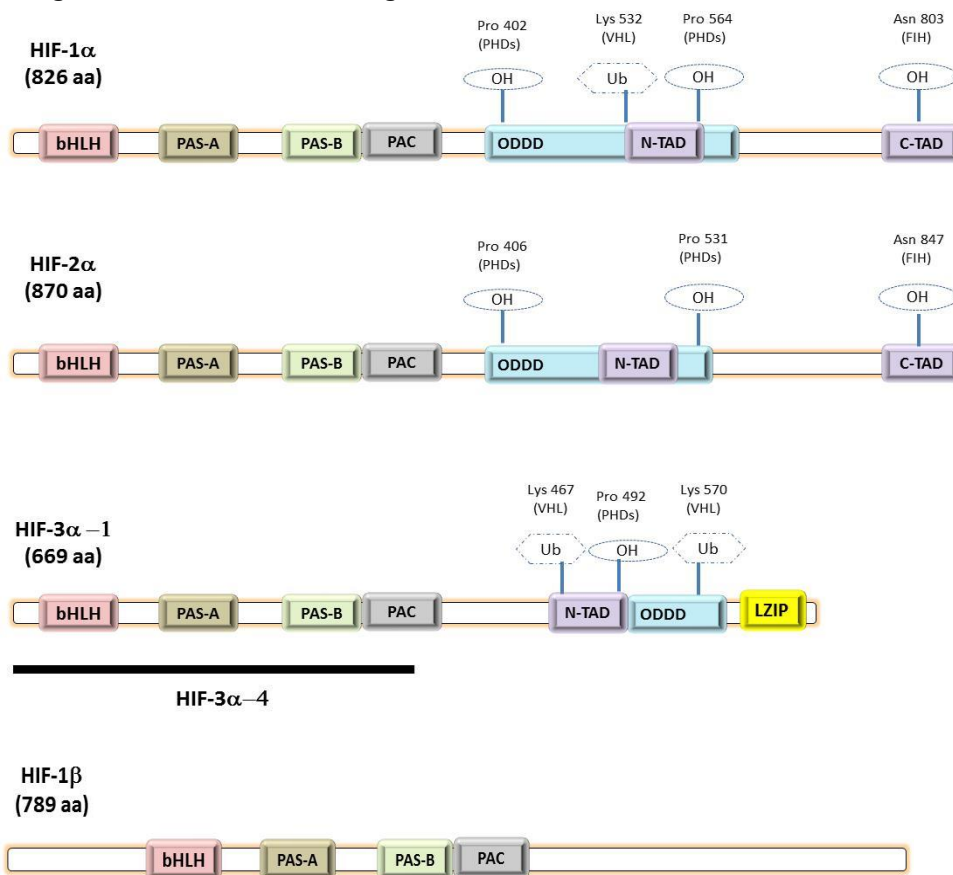


Figura 5. Representación estructural de los HIFs. Cada una de las subunidades de los HIFs están integradas por varios dominios conservados como el bHLH (dominio de unión a ADN); PER-ARNT-SIM (PAS-A y PAS-B), PAC (PAS-associated C-terminal domain) para la dimerización, el ODDD (dominio de degradación dependiente de O₂) y los dominios N-TAD y C-TAD para la actividad transcripcional. Existen numerosas isoformas de HIF-3 α con dominios de transactivación tipo *leucine zipper* (LZIP) mientras que otras como HIF-3 α -4 conocida como IPAS (*Inhibitory PAS domain protein*) no poseen este dominio y actúan como moduladores negativos para HIF-1 α .

2.1.2.1. Regulación de los HIFs.

En condiciones de normoxia, HIF-1/2 α son hidroxilados por las prolin-4-hidroxilasas (PHDs) en dos residuos conservados de prolina (P402/P564 y P405/P531 de ambas isoformas, respectivamente), localizados dentro del dominio de degradación dependiente de O₂ denominado ODDD (*Oxygen-Dependent Degradation Domain*) (Figura 5). La reacción de hidroxilación por las PHDs requiere de O₂, 2-oxoglutarato, ascorbato y el ión Fe²⁺ como cofactor. La hidroxilación de

HIF-1/2 α facilita el reconocimiento de la proteína VHL (*Von-Hippel Lindau*) al dominio ODDD. VHL funciona como un módulo que reconoce a las subunidades HIF-1/2 α hidroxiladas para reclutar el complejo E3 ubiquitina ligasa compuesto por la elongina C, elongina B, cullina-2, y ring-box-1, para dirigir la poliubiquitinación y la degradación por el proteosoma 26S de ambas subunidades (Dengler et al., 2014; Koh, 2008). Por otro lado, las subunidades α 1/2 poseen otro punto de regulación muy importante a nivel de la actividad transcripcional. Éste es regulado por FIH (Factor inhibidor de HIF-1), el cual hidroxila a las asparaginas 803 y 851 de HIF-1 α y HIF-2 α respectivamente ubicadas en el dominio de transactivación (TAD, del inglés *Transactivation Domain*) interrumpiendo, su interacción con los co-activadores transcripcionales p300/CBP (proteína de unión a CREB) y disminuyendo la eficiencia de la transcripción.

El mecanismo de regulación de los HIFs por las PHDs en normoxia se ha considerado como el mecanismo canónico de regulación basado en el bloqueo de la actividad de las PHDs por la disminución de O₂. Sin embargo no se ha podido aclarar específicamente cómo ocurre este evento, ya que varios estudios han demostrado que las concentraciones de O₂ que se encuentran en el citosol, en los capilares y en las arteriolas (~12.5- 50 μ M) **son menores a los valores de las constantes de afinidad (*Km*) por el O₂ de las PHDs (90 μ M) y del FIH (230 μ M)** (Ward, 2008). Esto supondría que las enzimas se mantendrían inactivas aún en normoxia aumentando la estabilidad del HIF-1/2 α , lo cual no ocurre fisiológicamente (Pouyssegur et al., 2006; Fedele et al., 2002). Una explicación alternativa es que la disminución de la concentración de O₂ promueve un aumento en la generación de ERO en la mitocondria producidos por el complejo III de la cadena respiratoria (Bell et al., 2010). Aunque no es muy claro cómo se generan las ERO en hipoxia y existe una controversia al respecto (Guzy & Schumacker, 2006), las ERO serían las responsables de oxidar el Fe²⁺ a Fe³⁺ limitando la actividad de las PHDs. Esta propuesta se ha comprobado experimentalmente en diversos tipos de células (células de hepatoma, vasculares de músculo liso, cardíacas, epitelio gástrico, epiteliales de túbulo renal y macrófagos), al no encontrarse HIF-1 α /2 α estables y activos cuando las células son sometidas a hipoxia y tratadas al mismo tiempo con antioxidantes (Pouyssegur & Mechta-Grigoriou, 2006; Lee et al., 2007).

Cualquiera que sea el mecanismo de inhibición de la actividad de las PHDs en la hipoxia, la reducción de esta actividad provoca que la unión de HIF-1/2 α con la

VHL disminuya suprimiendo la maquinaria de degradación de ambas isoformas. De esta manera el HIF-1 α y el HIF-2 α se acumulan, se translocan al núcleo, donde se dimerizan con la subunidad HIF-1 β para unirse a las secuencias consenso 5'-RCGTG-3' (R= A o G) del ADN denominadas como HRE ubicadas en el promotor de los genes blanco de estos factores (Mole et al., 2009; Schödel et al., 2011). También la inhibición del FIH en condiciones de hipoxia, ocasiona la disminución de la hidroxilación de las asparaginas de las subunidades α permitiendo que el complejo p300/CBP se una a los factores HIF-1/2 para iniciar la actividad transcripcional (Figura 6) (Dengler et al., 2014). Aunque la degradación dependiente de O₂ de las isoformas HIF-1/2 α es la vía canónica de estabilización de los factores HIF-1/2, existen otras vías alternas de regulación de los HIFs resumidas en la Figura 7 (Koh et al., 2008).

2.1.2.2. Expresión génica de los factores HIFs.

Ambas isoformas de la subunidad α de HIF (HIF-1 α y HIF-2 α) reconocen las secuencias HRE. Sin embargo, se sabe que la inducción de genes por cada uno de los factores es independiente y específica. Se ha propuesto que el tiempo de exposición, la abundancia de cada una de las isoformas, mecanismos de regulación a nivel traduccional y/o la modulación de co-activadores, son los responsables de que actúen independientemente (Hoh et al., 2012). La estabilidad de ambas isoformas de la subunidad α puede estar influenciada por el tipo celular, la severidad y duración del estímulo, la presencia de pVHL e incluso las condiciones del medio.

La regulación temporal de HIF-1 α /2 α se debe principalmente a las PHDs debido a que las acciones de estas enzimas sobre las diferentes isoformas α generalmente no son equivalentes. La PHD2 tiene más influencia sobre HIF-1 α y la PHD3 sobre HIF-2 α . Por otro lado, HIF-2 α también es hidroxilado con menor eficiencia que HIF-1 α por las PHDs y FIH-1, aumentando la estabilización y activación de HIF-2 α a concentraciones de O₂ más altas (Appelhoff et al., 2004; Koivunen et al., 2004). Se ha visto también que la estabilización del ARNm de la subunidad 1 α es inhibida después de una hipoxia crónica (Uchida et al., 2004). La traducción de HIF-2 α está modulada por el metabolismo de hierro debido a la **presencia de elementos de respuesta al hierro (IRE) en la región 5' UTR de su transcrito** y su traducción es inhibida cuando el hierro es depletado, suprimiendo los procesos de eritropoyesis (Sánchez et al., 2007). Con respecto a la regulación por

co-activadores, se ha visto que HIF-2 interactúa de manera específica con la proteína co-activadora Ets-1 (*Erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*) (Hu et al., 2007).

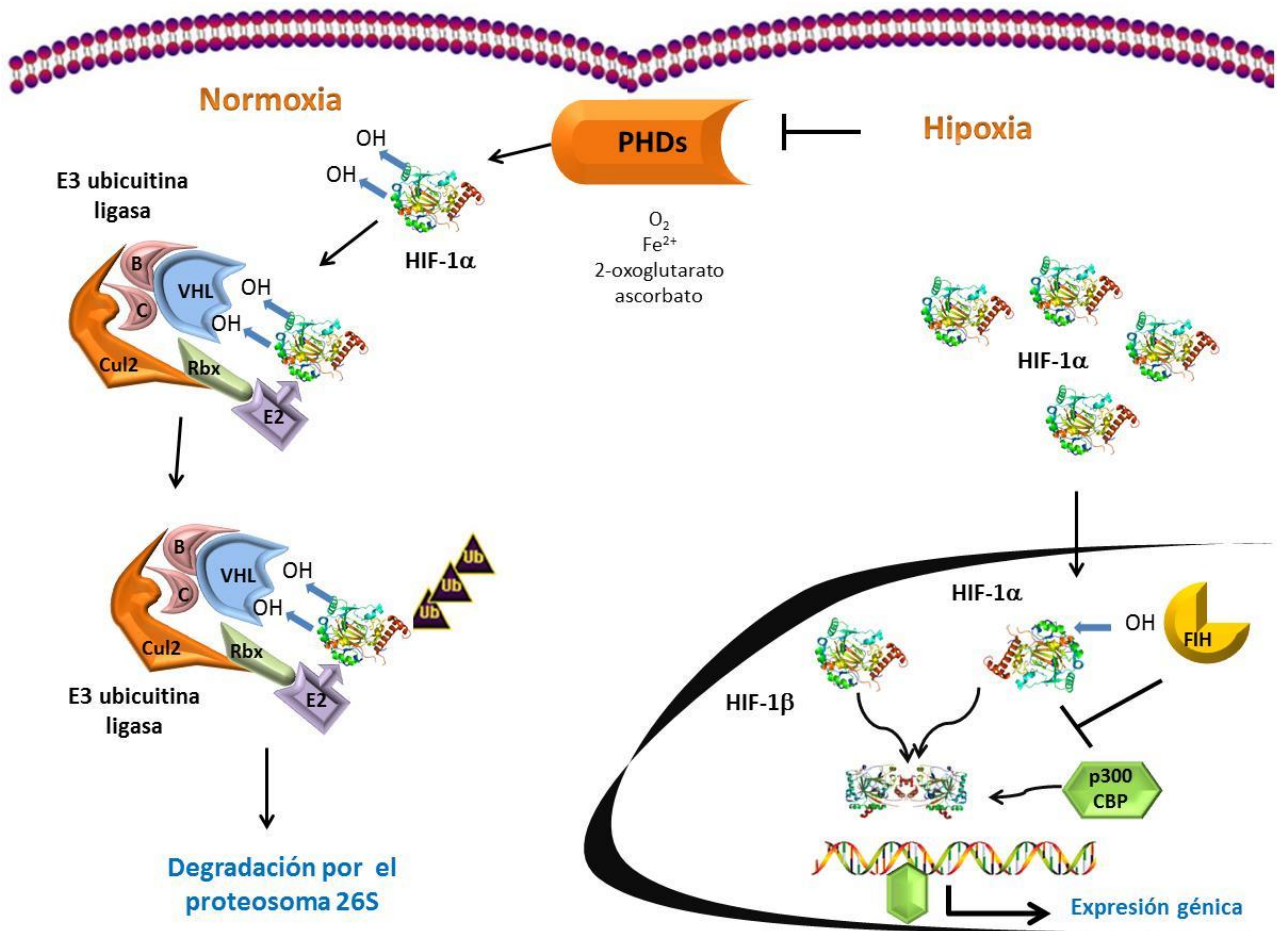


Figura 6. Efecto de la hipoxia sobre la estabilización de HIF-1 α . En condiciones de normoxia, las PHDs y el FIH hidroxilan en los residuos de prolina 402 y 564 y en la asparagina 803 respectivamente en HIF-1 α promoviendo la unión con el complejo VHL-E3 ubiquitina ligasa marcándola para su degradación a través del proteosoma 26S. La unión de los co-activadores p300/CBP se previene por la hidroxilación de la asparagina. En condiciones de hipoxia, las PHDs y el FIH son inactivos provocando la acumulación de la subunidad α del HIF y su translocación. HIF-1 α se dimeriza con HIF-1 β uniéndose a los HRE en el promotor de los genes blanco de este factor.

Existen otros mecanismos de regulación del "switch" de los factores HIF-1/2 como la regulación por las desacetilasas de histonas (SIRT1), las cuales desacetilan de manera específica a HIF-2 α incrementando su actividad transcripcional; y la regulación por la proteína HAF (*Hypoxia-activated Factor*), la cual se une de manera selectiva a HIF-1 α dirigiéndola a una degradación proteosomal independiente de O_2 , mientras que su interacción con HIF-2 α aumenta su estabilidad y actividad transcripcional. La expresión de HAF disminuye durante una hipoxia aguda, mientras que en hipoxia prolongada incrementa sus niveles proteicos. Este mecanismo explica

parcialmente el papel de HIF-1 en la respuesta de hipoxia aguda y el de HIF-2 en una hipoxia prolongada (Koh et al., 2008).

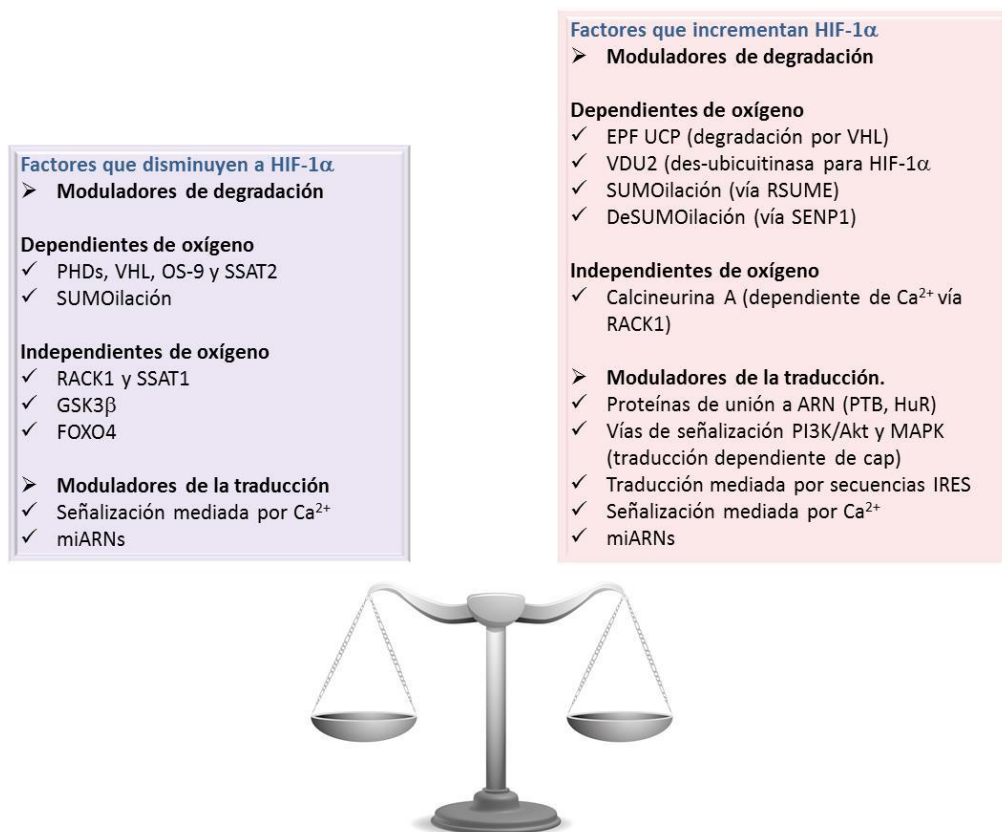


Figura 7. Los niveles de HIF-1α son determinados por el balance entre los mecanismos de degradación y síntesis. Esquema que muestra las contribuciones de los moduladores de degradación y traducción en la determinación de los niveles totales de HIF-1α.

La presencia de HIF-1/2 y su unión a las secuencias HRE en un evento de hipoxia no necesariamente corresponde a un aumento en la actividad transcripcional, sugiriendo que existen mecanismos finos de transactivación de los factores que dictan el inicio de la transcripción de los genes regulados por estos factores. En la Tabla 3, se muestran los genes representativos específicos regulados por HIF-1 y HIF-2 (Keith et al., 2012).

Tabla 3. Genes regulados por los factores HIF-1 y HIF-2.

| Gen | Función | HIF-1 | HIF-2 |
|--------------|------------------------------|-------|-------|
| GLUT1 | Transportador de glucosa | + | + |
| ADRP | Metabolismo lipídico | + | + |
| CAXII | Mantenimiento del pH | + | + |
| CA-IX | Homeostasis del pH | + | - |
| FILAG | Estructura del citoesqueleto | + | + |

| | | | |
|-------------------------------|--|---|---|
| IL-6 | Inmunocitocina | + | + |
| ADM1 | Angiogénesis | + | + |
| VEGF | Angiogénesis | + | + |
| BNIP3 | Apoptosis, autofagia | + | - |
| BNIP3L | Apoptosis, autofagia | + | - |
| NIX | Apoptosis | + | - |
| HK1 | Glucólisis | + | - |
| HK2 | Glucólisis | + | - |
| PFK | Glucólisis | + | - |
| GADPH | Glucólisis | + | - |
| ALDA | Glucólisis | + | - |
| PGK1 | Glucólisis | + | - |
| LDHA | Glucólisis | + | - |
| PGK | Glucólisis | + | - |
| PDK1 | Glucólisis | + | - |
| INOS | Producción de ON | + | - |
| NADPH oxidasa-2 | Enzima prooxidante | + | - |
| HO-1 | Enzima antioxidante que degrada el grupo hemo | + | - |
| TF | Enzima moduladora de hierro | + | - |
| Ceruloplasmina | Regulación del metabolismo de hierro | + | . |
| SOD | Enzima antioxidante | - | + |
| ARG | Inhibidor de la producción ON | - | + |
| EPO | Eritropoyesis | - | + |
| OCT3/4 | Mantenimiento de la totipotencialidad de las células madre | - | + |
| TGFα | Factor de crecimiento | - | + |
| CCND1 | Progresión del ciclo celular | - | + |
| DLL4 | Señalización de NOTCH | - | + |
| ANG2 | Remodelación de los vasos sanguíneos | - | + |
| MMP | Metaloproteinasa | - | + |

El símbolo + significa que promueve la transcripción del gen, y el símbolo – significa que no promueve la transcripción del gen.

La habilidad de HIF-1 y HIF-2 para activar genes blanco depende del contexto celular y de los moduladores proteicos que contribuyen a la estabilidad y actividad de cada uno de los factores para montar una respuesta a hipoxia. Las respuestas génicas reguladas por los HIFs son opuestas en términos del metabolismo y el estado de óxido-reducción de las células. De acuerdo a los genes de la Tabla 3 y a varios estudios, se ha demostrado que HIF-1 regula la mayoría de las enzimas glucolíticas, ayudando a las células a modificar su metabolismo en condiciones de

hipoxia. También regula enzimas pro-oxidantes y relacionadas al metabolismo del hierro como la NADPH oxidasa-2 (Nox2), la iNOS (Óxido nítrico sintasa inducible) y la HO-1. El HIF-2 por su parte, no interviene prácticamente en la regulación del metabolismo glucolítico, pero está relacionado con la respuesta antioxidante a través de la inducción de la SOD (superóxido dismutasa) y ARG (*Abelson-related gene*) así como al proceso de eritropoyesis (Keith et al., 2012; Warnecke et al., 2004; Fujiwara et al., 2007).

Debido a la falta del dominio de transactivación C-terminal, no existen reportes de genes regulados por HIF-3 (Figura 5). La principal función que se ha reportado para HIF-3 es modular de manera negativa al complejo transcripcional de HIF-1 (Dengler et al., 2014).

2.1.3. El metabolismo celular en la hipoxia.

En condiciones de normoxia, el piruvato formado en la glucólisis es transportado a la mitocondria y convertido a acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) para dirigirse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CATC) formar moléculas de NADH y FADH y finalmente producir ATP a través de la cadena respiratoria (Wu et al., 2010). Cuando existe un estrés hipóxico (segundos a minutos) las células no alteran el flujo de acetil-CoA hacia el CATC. Sin embargo, en condiciones de hipoxia prolongada (horas) la activación de HIF-1 disminuye el flujo del CATC (Kim et al., 2006; Mason et al., 2007; Papandreou et al., 2006). La conversión del piruvato a acetil-CoA es disminuida por la sobrerregulación de la lactato deshidrogenasa (LDHA) y la piruvato deshidrogenasa cinasa-1 (PDK1), los cuales son genes regulados por HIF-1. PDK1 fosforila a la subunidad E1 del complejo PDH bloqueando su actividad y previniendo que el piruvato se dirija al CATC disminuyendo el metabolismo oxidativo debido a la falta de O₂. La LDHA entra en acción convirtiendo el piruvato a lactato, generando NADH como ruta alternativa para mantener las proporciones de NADH/NAD⁺, el flujo glucolítico y la formación de ATP a partir de la fosforilación a nivel de sustrato, eventos importantes para la sobrevivencia celular (Wheaton & Chandel 2011).

HIF-1 también es importante para señalar la disminución de la actividad de la cadena respiratoria en hipoxia a través de dos mecanismos: 1) por la inducción de la iNOS y la sobreproducción de óxido nítrico (NO), el cual es un inhibidor de la

citocromo oxidasa (COX) (Cleeter et al., 1994); 2) por la sobrerregulación de las proteasas LON (Proteasas dependientes de ATP mitocondrial), las cuales degradan las subunidades 1-4 de la COX; y 3) a través de la inducción de un microARN denominado miR-210, el cual silencia la expresión de la subunidad 10 de la COX, la subunidad D de la succinato deshidrogenasa y las proteínas ISCU1/2 (*Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins*) esenciales para el funcionamiento del complejo I (Chan et al., 2009; Puissegur et al., 2010).

La disminución del metabolismo oxidativo provoca baja producción de ATP alterando principalmente la actividad de las bombas Na^+/K^+ ATPasas afectando la homeostasis iónica membranal y desencadenando toda la respuesta mediada por el Ca^{2+} (ver apartado Disrupción iónica membranal y el papel del Ca^{2+} en hipoxia). Otro papel muy importante que ejerce el ATP además de la regulación iónica, es el mantenimiento de la traducción de los ARNm (Arsham et al., 2003). La hipoxia inhibe la traducción global a través de la modulación de la actividad de mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin complex*) y de la cinasa pancreática eIF2 α (PERK). El control de la traducción por mTORC1 es a través de la fosforilación de la proteína S6K1 (p70 ribosomal S6 kinase) y la 4E-BP1 (proteína de unión al factor eIF4-1), proteínas importantes para la traducción dependiente de cap de los ARNm (Liu & Simon, 2004). A pesar de que existe una reducción global de la síntesis de proteínas, las células responden a la hipoxia de manera precisa y específica traduciendo genes importantes en el momento del estímulo hipóxico. Este proceso involucra un mecanismo denominado traducción proteica independiente de cap o mediada por las secuencias IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). Este mecanismo consiste en la presencia de una secuencia nucleotídica que se encuentra en el **extremo 5'UTR de ciertos genes, el cual provoca** la formación de una estructura secundaria específica que es reconocida por factores de inicio de la traducción como el eIF2, eIF3 y de ribonucleoproteínas nucleares denominados como ITAFs (*IRES transacting factors*). La hiperfosforilación de eIF2 α ocasiona que solamente se traduzcan aquellos genes que tengan estas secuencias IRES, que de forma general serán aquellos genes importantes para responder a las condiciones de hipoxia. Entre los genes que contienen las secuencias IRES se encuentran aquellos relacionados a factores de crecimiento (FGF2, PDGF, VEGF, IGF-II); genes relacionados a vías de señalización (CaMKII, proteína cinasa p58) genes relacionados al transporte y receptores (CAT-1, TrkB, GluR2), genes que codifican factores de traducción (eIF4GI-II), genes relacionados a la muerte celular apoptótica (Apaf-1, Bcl-2, Bcl-

xL) y genes que codifican factores de transcripción (HIF-1 α , c-jun, OCT4B, NF-kB, p53), entre otros (Young et al., 2008; Komar & Hatzoglou, 2011; Hellen et al., 2011).

2.1.4. Especies reactivas de oxígeno y muerte celular por hipoxia.

En condiciones de normoxia, las EROs pueden ser generadas en múltiples sitios y organelos celulares, sin embargo la principal fuente de producción de EROs es a través de la cadena transportadora de electrones (Fruehauf et al., 2000). Se ha estimado que el 2% del flujo electrónico por la cadena respiratoria produce EROs en condiciones de normoxia. Las EROs se han catalogado como moléculas esenciales que participan en las vías de señalización celular actuando como segundos mensajeros (Hensley et al., 2000; Sauer et al., 2001). Actualmente no se ha podido entender por completo la formación de las EROs en condiciones de hipoxia, ya que se han encontrado resultados controversiales que demuestran aumento o disminución de estas especies en condiciones de hipoxia en diferentes células y tejidos (Gilany & Vafakha, 2010; Chandel & Budinder, 2007; Fandrey & Genius, 2000). Sin embargo, se ha aceptado que en hipoxia crónica existe una sobreproducción de EROs derivadas de la mitocondria y del sistema NADPH oxidasa, las cuales tienen un papel muy importante en la regulación y estabilización de los factores HIFs (Gilany & Vafakha, 2010; Sudarshan et al., 2009). Se ha observado que la activación de HIF-1 directamente correlaciona con los cambios en la concentración de las EROs, debido posiblemente a la inactivación de las PHDs permitiendo la acumulación de los HIFs (Taylor, 2008; Cash et al., 2007).

2.1.4.1. Muerte celular por hipoxia.

La adaptación celular a hipoxia permite tanto la proliferación como la supervivencia celular. Cuando los mecanismos adaptativos y protectores desencadenados por los complejos transcripcionales HIFs no son suficientes, la hipoxia conduce a la muerte celular (Gilany & Vafakhah, 2010). La muerte celular requiere de combinaciones de eventos y factores, como el incremento de Ca²⁺, la generación de EROs, cambios en la energía celular, acidosis, etc. (Zauner et al., 2002; Webster et al., 1999). Existen diferentes formas de muerte celular en hipoxia como la necrosis, la apoptosis y la autofagia. La necrosis se define como una forma "pasiva" de muerte celular ya que ocurre en ausencia de ATP. La causa de esta

muerte es la disrupción de los gradientes iónicos de las membranas celulares asociados con la disminución de ATP. La apoptosis es una forma de muerte celular activa o dependiente de ATP, la cual desencadena una activación secuencial de un programa genético. La autofagia ha sido clasificada como una forma alternativa de la muerte celular programada genéticamente pero considerada como no-apoptótica (Edinger & Thompson, 2004; Greijer & van der, 2004; Banasiak et al., 2000; McClintock et al., 2002). El tipo de muerte celular depende de la intensidad del estímulo, es decir, a las condiciones de hipoxia a las que son sometidas las células, así como al tiempo de exposición al estímulo (hipoxia aguda o crónica) (Gilany & Vafakha, 2010). HIF-1 puede controlar genes tanto anti-apoptóticos como pro-apoptóticos (Tabla 4), y la inducción de estos genes depende de la intensidad del estímulo del estrés hipóxico (Sendoel & Hengartner, 2014).

Tabla 4. Genes pro y anti-apoptóticos regulados por los HIFs.

| Familia de genes apoptóticos |
|-------------------------------------|
| Genes Pro-apoptóticos |
| BNIP3 |
| Noxa |
| Nix |
| PUMA |
| Genes Anti-apotóticos |
| Bcl-2 |
| Bcl-xL |
| Bax |
| Mcl-1 |

En condiciones de hipoxia crónica, HIF-1 induce apoptosis a través de la inducción de genes pro-apoptóticos como BNIP3, Nix y Noxa. Estas proteínas actúan sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial facilitando la liberación de EROs y componentes del apoptosoma para iniciar la activación de la apoptosis intrínseca. Sin embargo, se conoce también que BNIP3 y Nix, intervienen en procesos de autofagia, la cual puede ser un mecanismo de supervivencia celular a través de la degradación de proteínas mal plegadas u oxidadas y de proteasas que estén ocasionando daño celular. También inhibe la producción de EROs producidas por las mitocondrias a través de la degradación de este organelo, prolongando la tolerancia a la hipoxia. Por otro lado la inducción de los genes anti-apoptóticos por

HIF-1 muestra funciones protectoras ante la muerte celular (Edinger & Thompson 2004; Greijer & van der, 2004; Banasiak et al., 2000; McClintock et al., 2002).

El papel del HIF-2 en la muerte celular es menos conocido, pero se sabe que tiene funciones principalmente anti-apoptóticas debido a que HIF-2 regula de manera negativa a BNIP3 y potencia la expresión del gen antiapoptótico Bcl-xL. La variante alternativa de HIF-3 (IPAS) ha sido implicada en la actividad proapoptótica debido a que es capaz de interactuar con la proteína Bcl-xL, un gen anti-apoptótico, causando la desestabilización de la membrana mitocondrial y desencadenando la vía intrínseca de la apoptosis (Sendoel & Hengartner, 2014).

Además de la muerte celular regulada por los factores HIFs, participan otros factores que modulan la muerte celular apoptótica como el factor p53 (el supresor central tumoral y regulador maestro del ciclo celular y de la apoptosis) (Graeber et al., 1994; Sendoel & Hengartner, 2014).

3. Modelos de hipoxia.

El conocimiento de la respuesta molecular a hipoxia en los distintos procesos fisiológicos y patológicos que involucran cambios en la concentración de O₂ es importante para conocer los mecanismos desencadenados en este evento con la posibilidad de intervenir con una solución terapéutica. Por esta razón se han desarrollado varios modelos para el estudio de las respuestas moleculares a hipoxia. Todos los modelos se basan en la estabilización de las subunidades α de los factores HIF y se pueden clasificar de la siguiente manera:

- 1) **Modelos de hipoxia por reducción de O₂.** Se basan en someter tejidos, células o animales en ambientes con una concentración < 21% de O₂.
- 2) **Modelos de hipoxia inducida químicamente.** Se basan en el uso de agentes químicos que inducen la estabilización de la subunidad HIF-1 α . Entre estos agentes químicos se encuentran:
 - Análogos del 2-oxoglutarato como: dimetiloxaloriglicina (DMOG), L-mimosina, etil 3,4 dihidroxibenzoato, S956711 (Mole et al., 2003; Zhang et al., 2011).

- Quelantes de hierro: deferoxamina (DFO), 8-hidroxiquinolina, M30, HLA-20, VK28 (Zhang et al., 2011).
- Metales de transición como: Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , V^{5+} (Kaczmarek et al., 2009).
- Desacoplantes de la cadena transportadora de electrones como: 2,4 dinitrofenol, dinitrocresol, pentaclorofenol, (m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona (Harvery et al., 2004).

El DMOG, la DFO y el Co^{2+} se han considerado los mejores agentes mimetizadores de hipoxia basados en la estabilización de la subunidad HIF-1 α . La estabilización y acumulación de HIF-1 α se debe a que todos estos agentes químicos bloquean la actividad de las PHDs, interrumpiendo la hidroxilación de la subunidad α del HIF-1 e inhibiendo la degradación proteosomal 26S dependiente del complejo pVHL-E3 ubiquitina ligasa. También tienen efectos inhibidores sobre FIH, aumentando la actividad transcripcional de los factores HIFs (Zhang et al., 2011).

Los mecanismos de inhibición de las PHDs por estos mimetizadores de hipoxia son distintos. El DMOG es un inhibidor competitivo para las tres isoformas de las PHDs y del FIH. Actualmente no se ha descrito a detalle la manera en que el DMOG inhibe la actividad de estas enzimas. Se ha propuesto que al ser un análogo del 2-OG (co-sustrato de las PHDs), se sitúa en el sitio catalítico sustituyendo al 2-OG y bloquea la actividad de hidroxilación. La DFO es un quelante de Fe^{2+} , cofactor indispensable para la actividad de las PHDs. La falta de la disponibilidad de Fe^{2+} ocasiona que la actividad de las PHDs y FIH se inhiba provocando la acumulación y el aumento de la actividad de HIF-1 (Hewitson & Schofield, 2004; Hewitson et al., 2004; Zhang et al., 2011).

Dado que el Co^{2+} ha sido utilizado con mayor frecuencia como mimetizador de hipoxia, los mecanismos de inducción de estos factores por este metal de transición han sido descritos con mayor detalle.

3.1. El Co^{2+} en la estabilización y acumulación de los factores HIFs.

A diferencia del DMOG y de la DFO, el Co^{2+} ha tenido mayor efecto en la intensidad y acumulación sostenida de HIF-1 α y HIF-2 α (Borcar et al., 2013). Por esta razón este metal de transición ha sido muy utilizado en los estudios de la respuesta génica desencadenados por los factores HIF-1 y HIF-2 simulando la

respuesta transcripcional que se desata en la hipoxia. Se han propuesto distintos mecanismos por los cuales el Co^{2+} estabiliza y acumula los niveles proteicos de las subunidades 1/2 alfa de los factores HIFs.

- 1) **Inhibición por reemplazamiento del Fe^{2+} en el sitio catalítico:** Este mecanismo ha sido el más aceptado basado en la sustitución del Fe^{2+} por el Co^{2+} en el sitio catalítico. Esta sustitución provoca que la reacción de hidroxilación de la PHDs y el FIH se inhiba, debido a que el Co^{2+} no tiene la capacidad de sufrir reacciones de óxido-reducción como el Fe^{2+} . Sin embargo Kaczmarek et al, (2009) han discutido a partir de sus resultados usando un análisis computacional, que este reemplazo es imposible en términos termodinámicos (Hirsilä et al., 2005; Kaczmarek et al., 2009).
- 2) **Oxidación del ascorbato por el Co^{2+} .** El ascorbato o ácido ascórbico (vitamina C) es esencial para que las PHDs y el FIH puedan llevar a cabo las reacciones de hidroxilación a través del mantenimiento de hierro activo, es decir en su forma reducida (Fe^{2+}). Se ha comprobado que el Co^{2+} ocasiona la oxidación directa del ascorbato produciendo dos metabolitos oxidados denominados como ácido monodeshidroascórbico y ácido deshidroascórbico. La forma oxidada del ascorbato provoca que sea incapaz de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} localizado en el sitio catalítico de las PHDs y del FIH. Por otro lado, también se ha comprobado que el Co^{2+} es capaz de producir ERO, las cuales también podrían oxidar al ascorbato (Qiao et al., 2009). Por otro lado, se ha demostrado que el Co^{2+} inhibe la captación celular del ascorbato, sugiriendo que este ión metálico bloquea los transportadores de ascorbato e inhibe sus concentraciones intracelulares (Salnikow et al., 2004).
- 3) **Unión directa del Co^{2+} en el dominio ODDD de HIF-1/2 α .** Se ha comprobado a través de un análisis de espectrometría de masas que a altas concentraciones de CoCl_2 , el ión Co^{2+} se une al dominio ODDD de las subunidades 1/2 alfa del factor HIF impidiendo que la proteína VHL pueda interactuar incluso cuando están hidroxiladas ambas subunidades, inhibiendo sus poliubiquitinaciones y degradaciones vía proteosoma 26S (Yuan et al., 2003).

- 4) **Regulación de la traducción de los transcritos de las subunidades HIF-1 α y HIF-2 α por el Co²⁺ a través de la regulación de vías de señalización.** La acumulación proteica principalmente de HIF-1 α por el Co²⁺ es debida en parte, al aumento de la traducción de los ARNm, principalmente regulada por la producción de EROs y la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, una vía importante para la regulación de la traducción de los transcritos (Chachami et al., 2004).
- 5) **Aumento de la inducción transcripcional del gen HIF-1 α por el Co²⁺.** Se ha descrito que la regulación de los niveles proteicos de la subunidad HIF-1 α es debida principalmente a la inhibición proteolítica modulada por el complejo pVHL-E3 ubiquitina ligasa. Sin embargo poco se conoce acerca de la regulación transcripcional del gen de esta subunidad. Existen trabajos controversiales acerca de la inducción de los transcritos de HIF-1 α por el Co²⁺, ya que se ha reportado que el Co²⁺ no induce los niveles de ARNm de esta subunidad, pero existen otros que han demostrado el incremento de los transcritos de este gen inducido por el Co²⁺. Estas respuestas diferenciales pueden deberse a los distintos tipos de células (Pagé et al., 2002).

Dado que el modelo de hipoxia química inducido por el Co²⁺ se basa en la acumulación de HIF-1 y HIF-2 simulando la respuesta a hipoxia regulada por estos factores, existen diferencias entre este modelo y el de hipoxia por reducción de O₂. En la Tabla 5 se resumen algunas de las respuestas reproducibles así como las que son diferentes entre ambos modelos a partir de observaciones experimentales.

Tabla 5. Diferencias y similitudes en las respuestas moleculares generadas por la hipoxia por reducción de O₂ y por el Co²⁺ en el metabolismo celular, regulación transcripcional y vías de señalización celular.

| Función celular | Hipoxia por reducción de O₂ | Agente mimetizador de hipoxia inducido por Co²⁺ | Referencias |
|-----------------------------------|--|--|----------------------|
| Metabolismo celular | Estimula la actividad de la LDH en células VSMC | Estimula la actividad de la LDH en células VSMC | Marti et al., 1994 |
| | Induce la expresión y actividad de varios genes glucolíticos como la ALDA, PKM y la PGK en células Hep3B y Hela. | Induce la expresión y actividad de varios genes glucolíticos como la ALDA, PKM y la PGK en células Hep3B y Hela. | Semenza et al., 1994 |
| | Aumenta los niveles de fosforilación de la PHD en células HepG2. | Disminuye los niveles de fosforilación de la PHD en células HepG2. | Borcar et al., 2013 |
| | No tiene efecto en los niveles de los ARNm de la PDK-2 en células HepG2. | Disminuye los transcritos de la PDK-2 en células HepG2. | Borcar et al., 2013 |
| Regulación transcripcional | Induce la actividad promotora de los genes SOD y PGK | Induce la actividad promotora de la PGK pero no de SOD | Befani et al., 2013 |
| | Induce la expresión del gen de la ferritina H a través de los HRE en células K562 | Induce la expresión de la ferritina H a través de ARE regulado por Nrf2 en células K562 | Huang et al., 2014 |

| | | | |
|-----------------------------|---|--|---|
| | Induce la expresión de VEGF en Hep3B | Induce la expresión de VEGF en Hep3B | Lendhal et al., 2009 |
| | Disminuye la expresión de EC-SOD en tejido pulmonar de ratas. | Disminuye la expresión de EC-SOD en células COS-7 y pericitos | Adachi et al., 2011, Hartney et al., 2011, |
| | Aumenta la expresión de la EPO en riñón de rata. | Aumenta la expresión de la EPO en riñón de rata. | Bunn et al., 1998 |
| | Aumenta la expresión del gen TH en células del cuerpo carotideo y en PC12 | Aumenta la expresión del gen TH en células del cuerpo carotideo y en PC12 | Kato et al., 2010; Spicer et al., 2003; |
| | Aumenta la actividad promotora del gen Et-1 a través de los elementos HRE en células HMEC-1 | Aumenta la actividad promotora del gen Et-1 a través de los elementos HRE en células HMEC-1 | Minchenko & Caro, 2000. |
| | Incremento en la expresión de la EPO dependiente de HIF-2 en células Huh7 y HepG2 | No induce la expresión de la EPO a pesar de que estabiliza a HIF-2 en las células Huh7 y HepG2. | Befani et al., 2013 |
| | Disminuye la interacción de las IRP con los IRE del gen de la ferritina H incrementando la traducción del gen en células K562 | Aumenta la interacción de las IRP con los IRE del gen de la ferritina H disminuyendo la traducción del gen en células K562 | Huang et al., 2014 |
| | Disminuye los niveles de miR-124 en células del túbulo proximal renal y HPASMC. | Aumenta los niveles de miR-124 en células hMCS promoviendo la diferenciación neuronal. | Adachi et al., 2011, Hartney et al., 2011, |
| Vías de señalización | La estabilización de HIF-1 α es dependiente de la presencia de EROs | La estabilización de HIF-1 α es dependiente de las EROs | Triantafyllou et al., 2006 |
| | Activa las vías de señalización de PI3K/Akt/mTOR y de las MAPKs en células PC12 y Células madre embrionarias de ratón. | Activa las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y de p38MAPKs en células PC12. | Lee et al., 2008; Spicer & Millhorn 2003; Kitagishi et al., 2012. |
| | La estabilización de HIF-1 α es independiente de las vías de señalización PI3K y ERK1/2 en células HeLa | La estabilización de HIF-1 α es dependiente de las vías de señalización PI3K y ERK1/2 en células HeLa. | Triantafyllou et al., 2006 |
| | No afecta la proliferación de las células HeLa. | Inhibe la proliferación de las células HeLa de una manera dependiente de hierro. | Triantafyllou et al., 2006 |

Abreviaturas: PHD (Prolilhidroxilasas); HepG2 (Línea celular derivada del carcinoma hepatocelular de hígado de humano); PDK-2 (Piruvato Deshidrogenasa Cinasa-2); LDH (Lactato Deshidrogenasa); VSMC (Células Vasculares del Músculo Liso); ALDA (Aldehído Deshidrogenasa); PKM (Piruvato Cinasa); PGK (Fosfoglicerato Cinasa); Hep3B (Línea celular derivada del carcinoma hepatocelular de hígado de humano); HeLa (Línea celular deriva del adenocarcinoma cervicouterino humano); EPO; (Eritropoyetina); Huh (Línea celular derivada del carcinoma hepatocelular de hígado de humano); HRE (Elementos de Respuesta a Hipoxia); IRP (Proteína Reguladora de Hierro); IRE (Elementos Reguladores de Hierro); ARE (Elementos de Respuesta Antioxidante) VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular); EC-SOD (Superóxido Dismutasa Extracelular); TH (Tirosina Hidroxilasa); Et-1 (Endotelina-1), COS-7 (Línea celular transformante SV40 de riñón de *Cercopithecus aethiops*); K562 (Línea celular derivada de la leucemia mielógena crónica humano); PI3K (Fosfoinositol 3 fosfato Cinasa); Akt (Proteína Cinasa B); mTOR (Serina-treonina cinasa sensible a rapamicina); ERK (Proteína cinasa regulada por señalizaciones extracelulares); MAPK (Proteína Cinasa Activada por Mitógenos)

Actualmente contamos con información acerca de la activación del transcriptoma que se induce en condiciones de hipoxia y cuáles de estos genes son regulados por los factores HIFs. Sin embargo, poco se conoce si el Co^{2+} como agente mimetizador de hipoxia puede activar la mayor parte del transcriptoma regulado por los factores HIFs. Como se muestra en la Tabla 5, existen ciertas diferencias en ambos modelos en cuanto a la regulación de algunos genes. El trabajo de Lendahl et

al. 2009 ha mostrado el número de genes alterados en hipoxia de 2 y 24 h y por el Co^{2+} a 2 y 24h en células Hep3B a través de un análisis de inmunoprecipitación de cromatina seguido de ensayos de microarreglos. Estos autores pudieron observar que muchos genes se sobrelapan en ambos modelos, pero existen otros cuya regulación es distinta (Lendahl et al., 2009). Además también reportan que existen genes que son regulados únicamente por Co^{2+} pero no en hipoxia. Estos datos ayudan a comprender qué límites puede tener la hipoxia química con respecto a la hipoxia por reducción de O_2 y qué respuestas génicas pueden ser compartidas para continuar con los estudios de las modulaciones génicas provocadas por la hipoxia. Por otro lado es importante comprender y diferenciar el metabolismo celular y las vías de señalización para poder explicar ciertos fenómenos novedosos encontrados en ambos modelos (Borcar et al., 2013).

3.2. Tipos celulares para el estudio de las respuestas moleculares a hipoxia.

A lo largo del tiempo se ha ampliado el conocimiento para entender cómo las células monitorean y responden a los cambios en la concentración de O_2 . Algunos tipos celulares son capaces de detectar estos cambios y adaptarse a estas condiciones deficientes de O_2 a través de la modulación de la actividad de varias cinasas y de los patrones de transcripción y traducción génica. Sin embargo, existen pocos tipos celulares que han desarrollado la capacidad de responder a las alteraciones de O_2 para aumentar el suministro de éste a los tejidos y órganos hipóxicos. Las células renales sensibles a O_2 , liberan eritropoyetina durante episodios de hipoxia con la finalidad de estimular la producción de eritrocitos. Las células vasculares del músculo liso derivadas del pulmón desvían el flujo sanguíneo durante la hipoxia para optimizar la carga de O_2 a los glóbulos rojos. Las células tipo I del cuerpo carotídeo son responsables de detectar la deficiencia de O_2 arterial para señalar la activación de la respuesta ventilatoria hacia el sistema nervioso central y aumentar las concentraciones de O_2 sanguíneo (Spicer & Millhorn, 2003).

La habilidad de detectar los cambios en las concentraciones de O_2 es generalmente una propiedad de las células neuroendócrinas del cuerpo carotídeo, ya que éstas han desarrollado sistemas moleculares específicos para responder a las condiciones de reducción de esta molécula y por otro lado son capaces de tener una gran tolerancia a la hipoxia (Brundin, 1966; Hervonen & Korkala, 1972). La médula adrenal y otros paraganglios extra adrenales, los cuales son tejidos asociados al

sistema nervioso simpático, se han descrito como sensibles a los cambios en los niveles de O₂. Estos estudios se han realizado tanto en rata, ratón y líneas celulares del feocromocitoma (Conforti & Millhorn, 1997; Evinger et al., 2002; Zhu et al., 1996). La desventaja de utilizar cultivos primarios derivados de la médula adrenal o de los paraganglios extra adrenales para los estudios de la respuesta a hipoxia ha sido principalmente la dificultad de crecer a las células de manera abundante para mantener un cultivo celular. La solución a este problema, ha sido el uso de líneas celulares clonales que responden a la hipoxia de forma similar a las de la médula adrenal y a las del cuerpo carotídeo. La línea celular del feocromocitoma de rata (PC12) ha sido utilizada como un excelente modelo *in vitro* para las respuestas por hipoxia.

En condiciones de hipoxia, las células del cuerpo carotídeo inhiben la actividad de los canales de K⁺, induciendo la despolarización membranal y la entrada de Ca²⁺ (López-Barneo, 1996). La hipoxia provoca la inducción génica y actividad de la TH (Tirosina hidroxilasa), la cual es la enzima limitante de la síntesis de dopamina, liberando su secreción (Shaw et al., 1989). Las células PC12 tienen la capacidad de reproducir estas respuestas (Czyzyk-Krzeska et al., 1994; Zhu et al., 1997). También son capaces de tolerar episodios de hipoxia prolongada, haciéndolas un modelo para los estudios celulares y moleculares de las respuestas a hipoxia (revisado en Spicer & Millhorn, 2003).

3.2.1 La respuesta a hipoxia en las células PC12.

A través de estudios electrofisiológicos se han identificado canales de K⁺ sensibles a O₂ en las células PC12 denominados como Kv1.2. Los canales Kv1.2 son importantes para detectar las concentraciones de O₂ y desencadenar toda la respuesta a hipoxia. La expresión de los Kv1.2 en células no excitables como los oocitos de *Xenopus*, provoca que estas células respondan a los cambios de O₂, indicando la importancia de estos canales en la respuesta aguda a la hipoxia (Zhu et al., 1996).

Las distintas respuestas moleculares que se han descrito en las células PC12 en condiciones de hipoxia involucran varios eventos como: 1) la inactivación de los canales Kv1.2; 2) la despolarización y el aumento de las concentraciones de Ca²⁺ intracelulares; 3) la activación de la cinasa CaMKII (la cual modifica la transcripción de genes para la adaptación a la hipoxia); 4) la activación de la cinasa Pyk2 conocida también como RAFTK (que actúa como un modulador negativo de los canales K1.2);

5) la activación de la vía de señalización PI3K/Akt; 6) la activación de las cinasas ERK1/2; 7) la activación de p38 α y p38 γ entre otros. La activación de estas vías de señalización de las células PC12 en hipoxia sugiere que éstas tienen una gran capacidad de tolerar condiciones de baja concentración de O₂.

Entre los factores transcripcionales que se ha reportado que son activados en las células PC12 en condiciones de hipoxia se encuentran los factores HIF-1, HIF-2, el factor CREB y c-fos y junB. Con respecto a los factores HIF-1/2, se ha visto que se inducen ambos factores tanto por reducción de O₂ como por Co²⁺ y quelantes de hierro. Los niveles de fosforilación del factor CREB aumentan en la hipoxia, indicando un incremento de la actividad transcripcional. La actividad de CREB es importante para la regulación génica de la TH, debido a que además de tener los HRE, contiene secuencias CRE. Por otro lado, la función de CREB se ha caracterizado como protectora ante la hipoxia al regular genes anti-apoptóticos como la proteína Bcl-2. Los aumentos en la fosforilación de CREB no se deben a las cinasas PKA, PKC, CaMKII, ERK1/2, MAPKAP, RSK-2 y p38SAPK que normalmente fosforilan a esta proteína y no se tiene claro aún cómo es que se lleva a cabo la fosforilación de CREB en estas células sometidas a hipoxia. El factor AP-1 conformado por la heterodimerización de c-fos y junB se ha considerado como el factor que responde a etapas tempranas e inmediatas en hipoxia. Cada uno de los transcritos de las subunidades de AP-1 aumenta de manera rápida y dependiente de Ca²⁺ y de CaMKII. Los promotores de los genes de c-fos y JunB contienen elementos CRE, indicando el requerimiento del factor CREB. También es importante la actividad de las cinasas ERK1/2 para la actividad transcripcional de c-fos. La expresión génica de la TH también requiere de la actividad de AP-1 debido a que contiene elementos reguladores para este factor. Con estos datos, se puede concluir que los factores HIFs, CREB y AP-1 juegan un papel importante para la regulación génica inducida por hipoxia en las células PC12. Entre los genes inducidos por hipoxia en células PC12 se encuentran junB, c-fos, TH, VEGF, hexocinasa II, EPO, PGK, PK, enolasa, BNIP3, Receptor de Adenosina A2 entre otros (revisado en Spicer & Millhorn, 2003).

A partir de la comprensión de las respuestas desencadenadas en las células PC12 por hipoxia se podría lograr un mejor diagnóstico y tratamiento de las enfermedades isquémicas y de aquellas que involucran a la hipoxia en su patología.

IV. JUSTIFICACIÓN.

Este proyecto de investigación plantea el estudio y caracterización de la respuesta del sistema HO ante las condiciones hipóxicas utilizando la línea celular PC12 (células derivadas del feocromocitoma de rata) considerada como una línea celular idónea para estudiar fenómenos de disminución de la concentración de O_2 , ya que reproduce el comportamiento de las células del cuerpo carotídeo consideradas como las principales células que detectan los niveles de O_2 fisiológicamente. La caracterización del sistema HO en modelos que involucran hipoxia es importante para contribuir al conocimiento del comportamiento de enzimas protectoras en procesos hipóxicos. Este proyecto incluye la descripción del sistema a nivel de transcrito, cambios en los niveles proteicos y localización intracelular de cada una de las isoformas.

A pesar de todas las evidencias que indican la importancia del sistema HO y su papel protector en condiciones de hipoxia, la caracterización de la respuesta y regulación del sistema HO ante la hipoxia no ha sido descrita totalmente. Por ello, contribuir con el estudio de la caracterización de la respuesta de cada componente del sistema HO a la hipoxia podría tener implicaciones importantes en la generación de conocimiento sobre blancos terapéuticos de eventos como la hipoxia, la isquemia de órganos, el cáncer y, en general, en patologías que involucran la disminución de O_2 .

Existen varios modelos para reproducir las condiciones hipóxicas regulada por HIF-1 de forma independiente de O_2 . El conocimiento de la respuesta molecular regulada por HIF-1 es importante para comprender los distintos procesos fisiológicos y patológicos que involucran la participación de este factor transcripcional. El modelo de hipoxia por disminución de O_2 reproduce la respuesta clásica de estabilización de HIF-1 α por ausencia de O_2 . Sin embargo, existen modelos de hipoxia inducida químicamente que simulan un efecto hipóxico al interrumpir la hidroxilación de las prolinas de HIF-1 α , como es el caso del $CoCl_2$, el cual inhibe la actividad de las PHDs a través del reemplazamiento del Fe^{2+} del sitio activo por el ión Co^{2+} . Esto permite que la subunidad HIF-1 α no se degrade, se transloque al núcleo y se forme el complejo **heterodimérico con la subunidad β . Una vez formado el complejo transcripcional HIF-1**, éste se une a los motivos HRE de los promotores de genes de respuesta a hipoxia, montando así una respuesta transcripcional idéntica a la generada por la ausencia de O_2 . Hacer estudios que utilicen modelos de hipoxia independientes de O_2 nos permitirá

conocer si sólo la estabilización del factor HIF-1 α participa en la regulación transcripcional de estas isoformas.

Hasta el momento no existen suficientes estudios que ayuden a explicar el comportamiento de la HO-1 y la HO-2 ante un estímulo hipóxico, por lo que existen muchas interrogantes sobre la respuesta y el papel que juegan ambas isoformas en el modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl₂.

V. HIPÓTESIS.

El sistema HO responde a los cambios en la concentración de O₂, por lo que la generación de una hipoxia inducida químicamente por CoCl₂ en células PC12 podría provocar cambios diferenciales en los niveles de transcrito, de proteína y localización intracelular de las isoformas HO-1 y HO-2.

VI. OBJETIVOS.

1. Objetivo general.

Evaluar la respuesta del sistema HO en un evento de hipoxia a través de un modelo de hipoxia química inducida por CoCl₂ en células PC12.

2. Objetivos particulares.

En células PC12 bajo condiciones de hipoxia inducida químicamente por CoCl₂ determinar si se dan cambios en:

- 1) Los niveles de ARNm de HO-1 y de HO-2.
- 2) Los niveles de proteína de HO-1 y de HO-2.
- 3) La translocación mitocondrial y/o nuclear de la HO-1 y la HO-2.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Reactivos.

La línea celular PC12 fue obsequiada por el Dr. José Pedraza Chaverri de la Facultad de química, UNAM. Esta línea celular se adquirió en la ATCC (*American Type Culture Collection*). El medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), el suero fetal bovino (SFB), el suero de caballo (SC), la TrypTM EL express se obtuvieron de Gibco (USA). El CoCl₂ (cloruro de cobalto), la **acrilamida**, la **Bis N, N'**-metilénbisacrilamida, el SDS (dodecil sulfato de sodio), el PSA (Persulfato de amonio), el TEMED (Tetrametiletiléndiamina), se obtuvieron de *Bio-Rad* (USA). El yoduro de propidio (IP), el anticuerpo primario α -tubulina, el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio), el isopropanol, el cloroformo, el *tween*, el tritón X-100, el **2',7'**-diclorofluoresceína (DCF), el **2',7'**-diclorofluoresceína diacetato

(DCFDA), el mowiol se obtuvieron de Sigma (USA). El *TriPure* se obtuvo de Roche (Alemania). La transcriptasa reversa, los hexámeros azarosos, los desoxinucleótidos trifosfatados se obtuvieron de Promega (USA). La sonda TaqMan Rn 00561387 (HO-1), la sonda 18S, la *Master Mix Taqman*, la *Master Mix Sybergreen* y el *MitoTracker* rojo se obtuvieron de *Applied Biosystems* (USA). El kit NE-PER, el Kit *Mitochondria Isolation for Cultured Cells*, se obtuvieron de *Thermoscientific* (USA). El kit de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para HIF-1 α se obtuvo de *Cayman Chemical* (USA). El kit de ELISA para la HO-1 se obtuvo de *Enzo life Sciences* (USA). El kit de ELISA para la HO-2 se obtuvo de *Cusabio* (China). Los anticuerpos secundarios IgG *rabbit-HRP*, IgG *mouse-HRP* se obtuvieron de *Jackosn Laboratory* (USA). El anticuerpo anti-HO-1 se obtuvo de *Enzo life Sciences* (USA). Los anticuerpos anti-lam B2, anti-HO-2 y el *IgG-mouse-Alexa* 488 se obtuvieron de *abcam* (USA). El anticuerpo *IgG-rabbit-Alexa* 488 se obtuvo de *ThermoFisher scientific* (USA).

Todos los demás reactivos que se utilizaron fueron grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales conocidas.

2. Cultivo celular.

La línea celular PC12 se cultivó en medio DMEM suplementado con 7.5% de SFB y 7.5% de SC para su crecimiento. En los ensayos de hipoxia inducida químicamente por CoCl₂, se utilizó medio DMEM suplementado con 0.75% de SFB y 0.75% de SC (medio de experimentos). Las células fueron incubadas con las siguientes condiciones: 37°C, 5% de CO₂, 21% de O₂ y 95% de humedad.

3. Diseño experimental.

Se preparó una solución concentrada de CoCl₂ 10 mM en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4 y se esterilizó por filtración. Salvo que se indique lo contrario en cuanto a concentraciones y tiempos de incubación, los grupos experimentales fueron:

- 1) Células control (medio de experimentos)
- 2) Células incubadas con 0.5 mM de CoCl₂
- 3) Células incubadas con 1.0 mM de CoCl₂

En cada una de las condiciones, las células se incubaron a 24 y 48 h a 37°C, 5% de CO₂, 21% de O₂ y 95% de humedad en la incubadora INCO 108 (*memmert Experts in Thermostatics*). El volumen de CoCl₂ necesario para preparar cada una de las condiciones experimentales fue menor al 10% del volumen total del medio de experimento.

4. Extracción de núcleos y citoplasma.

En cada condición experimental se sembraron 3x10⁶ de células en frascos de cultivo de 25 cm². Al término del tiempo de incubación las células se recuperaron y resuspendieron en un tubo *eppendorf* de 2 mL y a partir del paquete celular se obtuvieron las fracciones nucleares y citoplásmicas utilizando el *Kit NE-PER*. Los extractos obtenidos con este kit tienen menos de 10% de contaminación entre las fracciones nucleares y citoplasmáticas, que es una pureza suficiente los experimentos que implican los extractos nucleares.

5. Determinación de HIF-1 α nuclear.

La determinación de los niveles proteicos de HIF-1 se realizó por ELISA utilizando un *kit (HIF-1 α transcription factor assay kit)*. Este ensayo permitió cuantificar los niveles proteicos y funcionalidad de HIF-1 α en la fracción nuclear, debido a que este kit detectó únicamente la cantidad de HIF-1 α que es capaz de reconocer las secuencias HRE.

6. Ensayo de cuantificación de ERO.

Se utilizó DCFDA como sonda para detectar la producción intracelular de ERO. En cada condición se sembraron 1 millón de células y se incubaron durante 0.5, 1, 4, 24 y 48 h. Se retiró el medio de experimentos y se adicionó DCFDA a una concentración final de 10 μ M en medio DMEM sin suero en cada una de las condiciones. Las muestras se incubaron 30 min a 37°C en la oscuridad. Se retiró el DCFDA y las células se suspendieron en un amortiguador de lisis (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, Tritón X-100 1% v/v) y se sonicaron por 15 s. Las muestras se centrifugaron a 12,000 x g 20 min a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de excitación 488 y una longitud de onda de emisión de 515 nm. Al mismo tiempo se realizó la curva de calibración utilizando DCF en un rango de concentración de 0-1 μ M.

Se cuantificó la proteína de los sobrenadantes por el método de Lowry. Los valores se expresaron como $\mu\text{moles DCF}/\mu\text{g}$ proteína.

7. Ensayo de reducción de MTT.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Las células se sembraron a una densidad de 30,000 células por pozo en una placa de 96 pozos. Se agregó medio de experimentos (para muestras control) y medio de experimentos con concentraciones crecientes de CoCl_2 (0.1-1.0 mM) y se incubaron durante 24 y 48 h a 37°C . Al término del periodo de incubación se adicionó MTT disuelto en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4 a una concentración final de 0.45 mg/mL en cada uno de los pozos y se incubó durante 1.5 h. Se adicionaron 150 μL de medio disolvente de MTT (HCl 4 mM, Nonidet P-40 al 0.1% en isopropanol) y se agitó durante 15 min en condiciones de oscuridad. Las lecturas de densidad óptica se realizaron a 590 y 690 nm de longitud de onda en un lector de placas (*Synergy, Biotek*). Esta última fue la longitud de referencia para restar el fondo, por lo tanto los valores de densidad óptica se expresaron mediante las diferencias de 590-690 nm ($\Delta\text{D.O.}$).

El cálculo del porcentaje de reducción de MTT se realizó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción de MTT} = \frac{\Delta\text{DO muestra}}{\Delta\text{DO promedio del control}} \times 100$$

8. Ensayo de viabilidad celular por SubG0.

A través del análisis del contenido de DNA marcado con IP y acoplado por citometría de flujo, se determinó el pico SubG0 el cual representa restos celulares, células en estados tardíos de apoptosis y células necróticas, obteniendo el porcentaje de células muertas. Se sembraron 1×10^6 células por grupo experimental. Las células se despegaron con tripsina y se suspendieron con PBS hasta obtener la mínima agregación celular. Se fijaron con etanol 70% en hielo por 2 h. Las muestras se centrifugaron a $300 \times g$ por 5 min y el etanol se decantó. Posteriormente se resuspendieron con PBS durante 30 s y se centrifugaron a $300 \times g$ por 5 min. Las células se resuspendieron con 1 mL de IP (Tritón X-100 0.1% (v/v), $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ de IP

en PBS) y se incubaron a 37°C por 10 min. Las muestras se transfirieron a un citómetro de flujo utilizando una longitud máxima de excitación de 536 nm y una longitud de emisión de 617 nm.

9. Niveles de ARNm de la HO-1 y la HO-2 por RT-PCR en tiempo real.

9.1. Aislamiento de ARN total.

En cada condición experimental se sembraron 3×10^6 de células. Para el aislamiento de ARN total se utilizó 1 mL de TriPure® para cada muestra. Se adicionó cloroformo (200 μ L). Las muestras se agitaron vigorosamente en un vórtex y se centrifugaron a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. De las tres fases formadas, se recuperó la fase acuosa (superior) donde se encuentra el ARN. Se procedió a la precipitación del ARN colocando 0.5 mL de isopropanol frío, se agitaron las muestras vigorosamente en un vórtex y se centrifugaron a 12,000 x g por 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 0.5 mL de etanol 75%. Se agitó en vortex y se centrifugó a 7,500 x g por 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el paquete blanco durante 5 min a temperatura ambiente. El paquete blanco fue resuspendido en agua libre de nucleasas. El ARN se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm.

9.2. Síntesis de ADNc.

Se utilizaron 5 μ g de ARN total para sintetizar el ADNc, usando hexámeros azarosos (50 ng) y desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs, 500 μ M) con la transcriptasa reversa (200 U) en un termociclador (*GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems*) a 37°C durante 1 h. El ADNc se utilizó para amplificar el gen de la HO-1 utilizando la sonda *Taqman* Rn00561387. Para la amplificación de la HO-2, se utilizó *Sybergreen* usando los siguientes oligonucleótidos: **Forward 5' ACAACTCAGCAACAATGTCTTC AG 3', Reverse 5' GGTCTGCCATTTTGGTATGGTT 3'** (Muñoz, 2013); y el gen ARN ribosomal 18S como gen constitutivo.

9.3. Análisis de cuantificación de ARNm por PCR en tiempo real.

El ensayo de PCR en tiempo real es utilizado para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta o relativa el producto de la amplificación del ADNc. Se realizó la validación del método de PCR en tiempo real por el método comparativo Δ Ct

para cada gen para las sondas blanco (HO-1 y HO-2) y el gen endógeno. Las condiciones para la HO-1 fueron: Sonda TaqMan 1.125 μL , *Master Mix Taqman* 1X y diferentes diluciones de ADNc (1, 1:10, 1:1000, 1:10000) en un volumen de reacción de 25 μL , con las condiciones de temperatura de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min y 45 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. Para la HO-2 fueron: oligonucleótidos 2 ng/ μL , *Master Mix Sybergreen* 1X y diferentes diluciones de ADNc (1, 1:10, 1:50, 1:500, 1:1,000, 1:10,000) en un volumen de reacción de 25 μL , con las condiciones de temperatura de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, y 45 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min en un termociclador (*7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems*).

Posteriormente se llevó a cabo el análisis de cuantificación de ARNm de la HO-1 y la HO-2, utilizando las mismas condiciones de la validación del método. La dilución de ADNc que se utilizó fue de 1:10. Se utilizó una n=4 y todas las muestras evaluadas se hicieron por triplicado.

10. Extracción de mitocondrias.

En cada condición se sembraron 20×10^6 células en frascos de cultivo de 75 cm^2 . Las células se recuperaron y se suspendieron en un tubo *eppendorf* de 2 mL y a partir del pellet celular se obtuvieron las fracciones mitocondriales utilizando el *Kit Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells*. El kit separa la fracción mitocondrial con un alto porcentaje de pureza.

11. Niveles de proteína por Western blot y ELISA.

El *Western Blot* es una técnica analítica utilizada para detectar y cuantificar de manera relativa una proteína de un extracto crudo separada por electroforesis mediante el uso de anticuerpos. El ensayo de ELISA, es una técnica de inmunoensayo en la cual un anticuerpo inmovilizado detecta y cuantifica a una proteína o antígeno mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. Las fracciones nucleares y citoplásmicas se utilizaron para cuantificar los niveles proteicos de la HO-1 y HO-2 normalizando con el gen constitutivo α -tubulina en citoplasma y lámina B2 en núcleo. Se cargaron 50 μg de proteína en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% por el método de Laemmli (acrilamida 30% / N,N metilénbisacrilamida 0.8%, Tris-HCl 1.5 M/SDS 0.4%, pH 8.8, PSA 10% y

TEMED 0.07%). Se realizó la transferencia a una membrana de PVDF a 0.5 mA durante 1.5 h en una cámara de transferencia fría.

Las membranas transferidas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador de TBS-T (Tris-base 100 mM, NaCl 500 mM, *Tween* 0.1% pH 7.5) durante 2 h. La membrana se incubó con el anticuerpo anti HO-1 a una dilución 1:1,000 preparado con el amortiguador TBS-T a 4°C por 24 h. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con el amortiguador TBS-T y posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (IgG-HRP) a una dilución 1:2,500 por 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con el amortiguador TBS-T y se reveló por quimioluminiscencia de alta sensibilidad utilizando placas de ultraradiografía.

Para la α -tubulina se ocuparon las mismas condiciones de incubación, lavado y revelado que para la HO-1, con una dilución 1:10,000 de anticuerpo primario anti α -tubulina y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (IgG-HRP) a una dilución 1:10,000.

Para la HO-2 se ocuparon las mismas condiciones de incubación, lavado y revelado que para la HO-1, con una dilución 1:5,000 de anticuerpo primario anti α -HO-2 y el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (IgG-HRP) a una dilución 1:10,000.

Finalmente, para la lámina B2 se ocuparon las mismas condiciones de incubación, lavado y revelado que para la HO-1, con una dilución 1:3,000 de anticuerpo primario anti α -lámina B2 y el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (IgG-HRP) a una dilución 1:10,000.

A partir de las fracciones nucleares, citoplásmicas y mitocondriales, se cuantificaron los niveles proteicos por ELISA (Kit ELISA HO-1 y kit ELISA HO-2).

12. Localización celular de la HO-1 y la HO-2 por inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia y localización de una determinada proteína o una molécula. Las células se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 100,000 células/cm² y se incubaron en cada condición experimental. Para el marcaje de mitocondrias se ocupó MitoTracker

rojo a una concentración final de 100 nM en medio DMEM. Las células fueron incubadas por 45 min a 37°C. Posteriormente, se fijaron con formaldehído al 0.5% durante 5 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 min y se realizó un lavado con TBS durante 15 min. Las células se bloquearon con SFB al 3% y Tritón X-100 al 0.1%.

Para el marcaje de ambas isoformas se ocupó una dilución de anticuerpo primario de HO-1 de 1:100 y para la HO-2 de 1:100. Se incubaron por 24 h y se realizaron 3 lavados con PBS-Tritón X-100 al 0.1% durante 5 min. Posteriormente las preparaciones se incubaron con Hoechst (1:1,000) y con el anticuerpo secundario *anti-mouse IgG Alexa fluor 488* (verde, para marcar a la HO-1) y *anti-rabbit IgG Alexa fluor 488* (verde, para marcar a la HO-2) a una dilución 1:250. Se incubaron por 2 h, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min y cada una de las preparaciones se montó con *Mowiol*.

Las preparaciones se observaron en un microscopio Olympus IX2 acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) ubicado en la unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM bajo la asesoría del Dr. Miguel Tapia. También las preparaciones fueron observadas en el microscopio confocal FV10i ubicado en la unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM bajo la asesoría de la Dra. Fabiola Jaimes Miranda. Se tomaron fotografías representativas de cada uno de los grupos experimentales para cada isoforma del sistema HO con el microscopio confocal FV10i.

VIII. RESULTADOS.

1. Niveles proteicos y funcionalidad de HIF-1 y producción de ERO inducidas por CoCl₂.

El fundamento de la hipoxia química inducida por CoCl₂ se establece a partir de la estabilización y translocación nuclear del factor HIF-1 α . En la Figura 8 (A) se observa que las células PC12 expuestas a 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl₂ durante 24 h presentan un incremento en la estabilización y capacidad de unión de HIF-1 nuclear a las secuencias HRE unidas al fondo de los pozos de una placa de ELISA (5.7 veces con 0.5 mM y 7.2 veces con 1.0 mM de CoCl₂). A 48 h se observa que con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl₂ el incremento es de 22.4 y 35.3 veces respectivamente. Por lo tanto, a estas condiciones de CoCl₂ se promueve la estabilización y translocación nuclear de HIF-1 mimetizando la respuesta a hipoxia modulada por este factor.

Adicionalmente, se determinó la generación de ERO por efecto del CoCl₂, un evento que se presenta en condiciones hipóxicas. En la Figura 8 (B) se observa que la exposición con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ en células PC12 a diferentes tiempos de incubación, genera ERO a partir de 1 h de incubación. La producción es significativa, presentando un pico máximo con 1.0 mM de CoCl₂ a las 24 h de incubación.

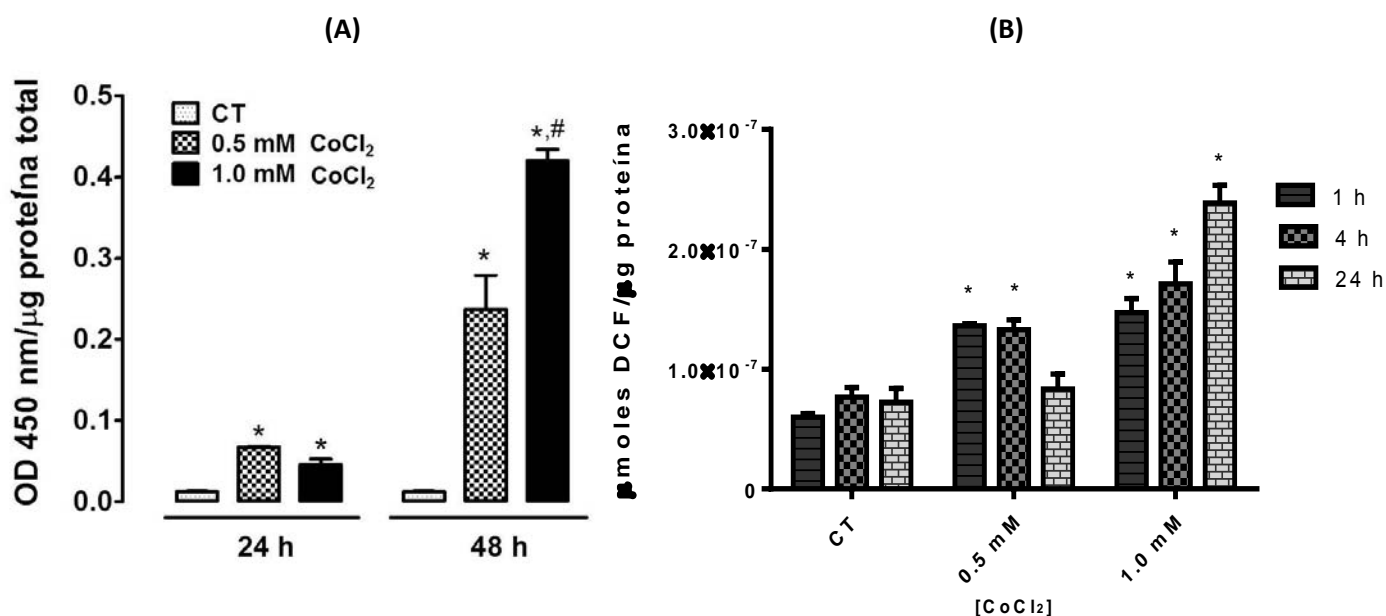


Figura 8. Efecto de la hipoxia inducida químicamente por CoCl₂ sobre los niveles proteicos y funcionalidad de HIF-1 α determinado por ELISA en fracciones nucleares (A) y la generación de ERO (B). Los valores se expresan como la media \pm SEM * p <0.05 y ** p <0.001 vs CT de cada tiempo (n=3); # p <0.001 vs CoCl₂ 0.5 mM al tiempo correspondiente, utilizando la herramienta estadística ANOVA seguido de un análisis Bonferroni. (B) Generación de ERO por CoCl₂ en células PC12 en forma dosis y tiempo dependiente. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=3). * p <0.05 vs Control (CT) de cada tiempo utilizando la herramienta estadística ANOVA seguido de un análisis Dunnet.

2. Efecto del CoCl_2 en la capacidad reductora, viabilidad celular y morfología celular.

Como un primer acercamiento al estado de las células por efecto del CoCl_2 durante 24 y 48 h se realizó un ensayo de reducción de MTT. En la Figura 9 (A) observamos que en las células expuestas a concentraciones crecientes de CoCl_2 (0.1-1.0 mM) durante 24 y 48 h, el porcentaje de reducción de MTT disminuye de forma dependiente del tiempo y de la concentración. A partir de 0.5 mM de CoCl_2 este porcentaje es estadísticamente significativa en ambos periodos de incubación, teniendo una reducción del 35 % y 45 % a 24 y 48 h, respectivamente. La disminución máxima del porcentaje de reducción de MTT se observa con 1.0 mM de CoCl_2 en ambos tiempos (75% a 24 h y 85% a 48 h).

La disminución de la señal de MTT en estas condiciones de estrés no corresponde de forma directa con la disminución del porcentaje de viabilidad celular. Los resultados de muerte celular por determinación del pico SubG0 indican que hay una menor disminución de células vivas. En la Figura 9 (B), se observa que la muerte celular aumenta de manera significativa con 1.0 mM de CoCl_2 a 24 h (16%) mientras que a 48 h con 0.5 mM y 1.0 mM aumenta el porcentaje de muerte celular de 20% a 40% respectivamente. Por lo tanto, a pesar de que los datos de MTT indican un porcentaje muy bajo de células "viables" a 1.0 mM, la técnica de SubG0 indica que en estas condiciones (CoCl_2 1.0 mM) en las que vemos estabilizado a HIF-1 α , la mayoría de las células están vivas, aunque han disminuido considerablemente su capacidad reductora.

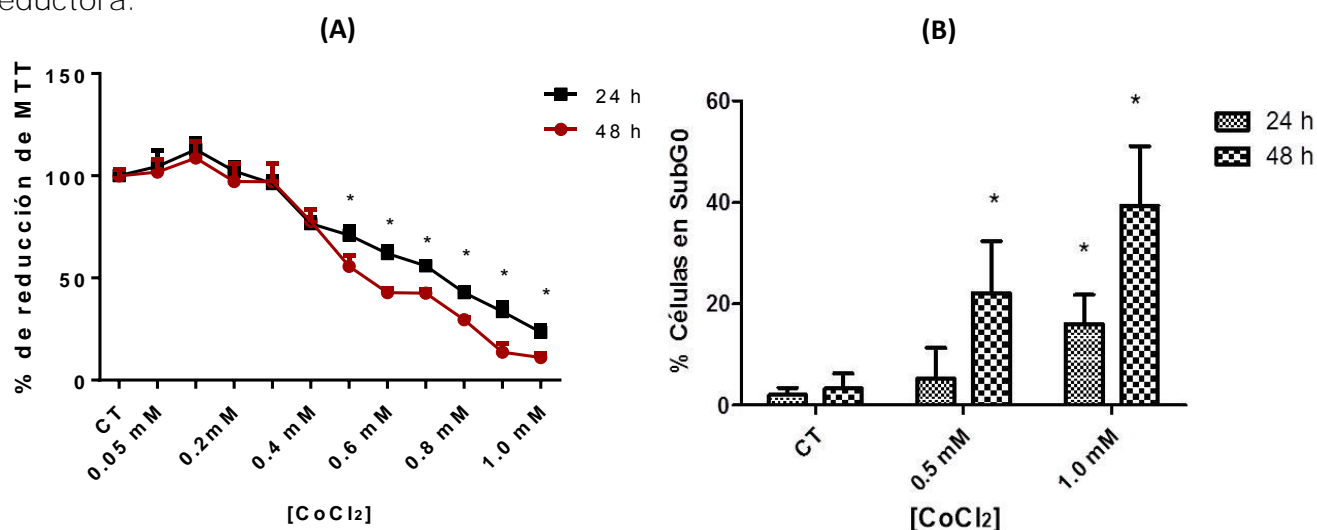


Figura 9. Caracterización de la viabilidad celular por efecto del CoCl_2 . (A) Viabilidad celular con concentraciones crecientes de CoCl_2 a 24 y 48 h determinada por MTT. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=6-8). *p<0.05 vs Control (CT) utilizando la herramienta estadística ANOVA seguido de un análisis Dunnet. (B) Porcentaje de muerte celular por Sub G0 con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl_2 a 24 y 48 h. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=3). *p<0.05 vs Control (CT) utilizando la herramienta estadística ANOVA seguido de un análisis Dunnet.

Con respecto a la morfología de las células, el CoCl_2 provoca una ligera disminución de células adheridas en la superficie y presentando espacios vacíos entre ellas (Figura 10). Estas observaciones indican que el CoCl_2 induce muerte celular. Por otro lado, las células también presentan cambios morfológicos en presencia del CoCl_2 , ya que se observa la formación de prolongaciones citoplásmicas denominadas como neuritas (flechas rojas Figura 10). La línea celular PC12 tiene la capacidad de diferenciarse a neuronas catecolaminérgicas en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF), debido a que las células expresan el receptor para este factor trófico. Ya se ha caracterizado que esta línea celular en condiciones de hipoxia por reducción de O_2 y estimuladas con CoCl_2 como inductor de hipoxia química, induce la formación de neuritas que en algún momento formarán proyecciones neuronales (axones y dendritas) (Kotake-Nara et al., 2005).

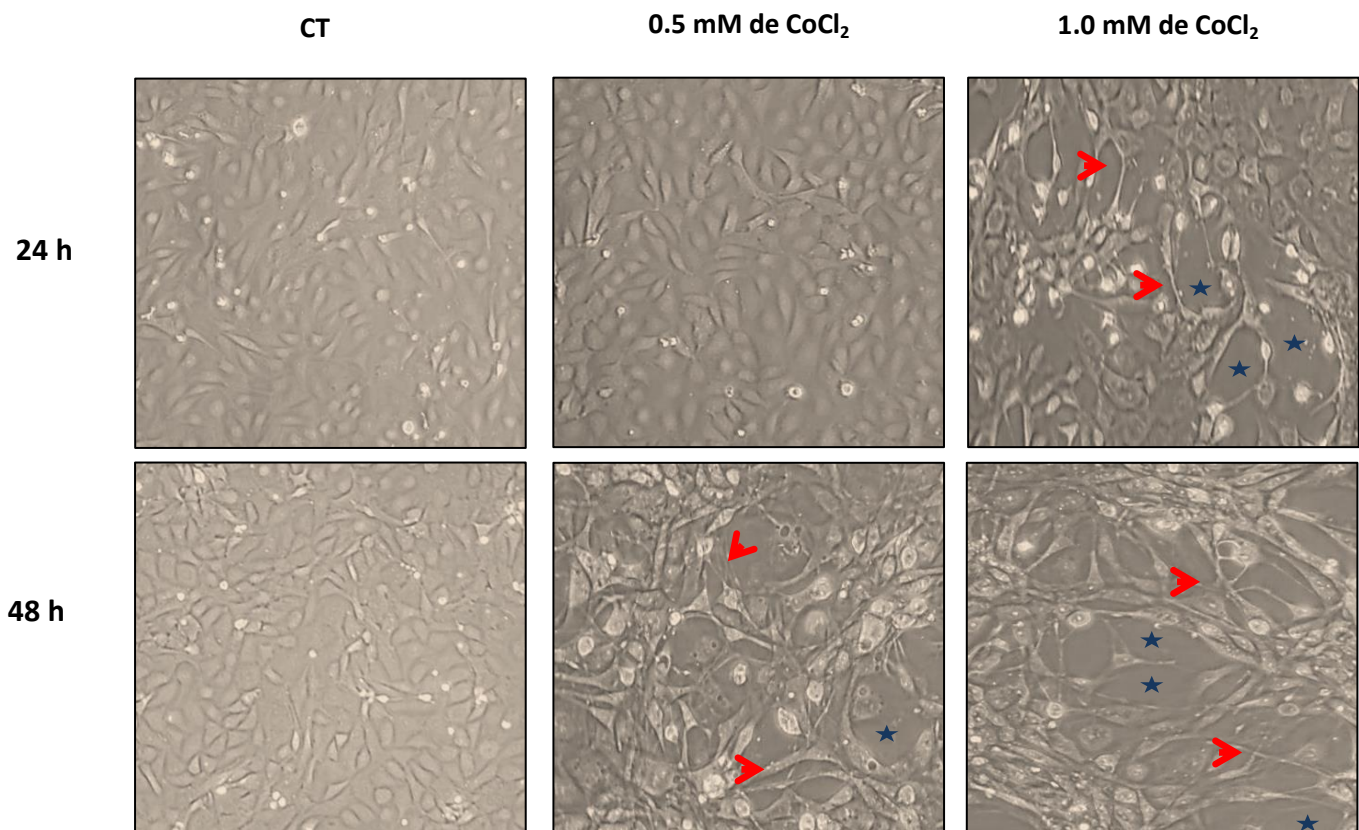


Figura 10. Efecto del CoCl_2 sobre la morfología de las células PC12. El CoCl_2 induce prolongaciones citoplásmicas que han sido denominadas neuritas (flechas rojas) caracterizadas por Kotake-Nara et al., 2005. También se observan espacios vacíos entre las células (estrella azul) indicando muerte celular. Imágenes tomadas por un microscopio de campo claro (*Krüss optronic*) a un aumento de 20X.

3. Respuesta de la HO-1 a nivel de ARNm en un modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl₂ en células PC12.

Una vez comprobado que la incubación de las células a 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ por 24 y 48 h genera una activación de HIF-1 α (Figura 8 A), se determinó la respuesta de la HO-1 a nivel de transcrito en estas condiciones de hipoxia química. En la figura 11 se observa que los niveles de ARNm de la HO-1 aumentan significativamente en todas las condiciones. Con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl₂ a 24 h se observa un incremento de 210 veces y 80 veces, respectivamente con respecto al control, mientras que el tiempo de incubación de 48 h se observa que los niveles de transcrito siguen incrementadas de manera significativa, 65 veces con 0.5 mM de CoCl₂ y 45 veces con 1.0 mM de CoCl₂ con respecto a su control.

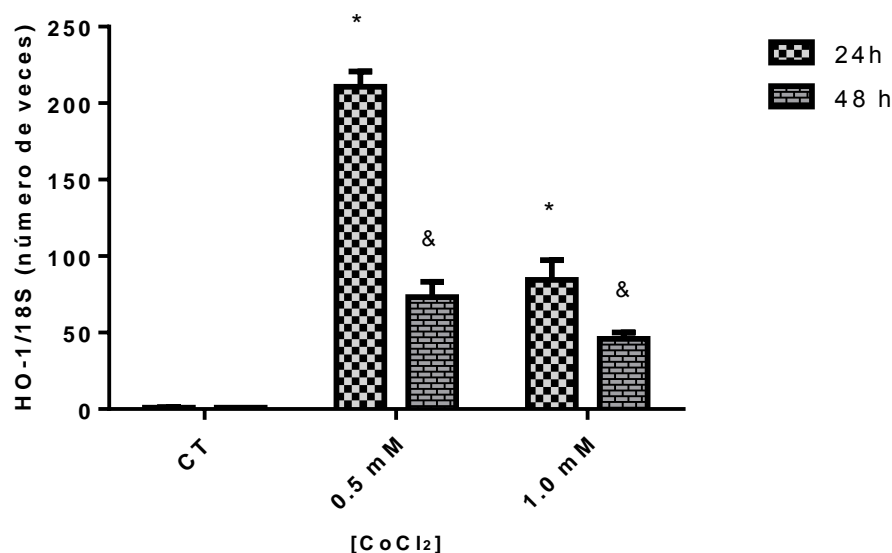


Figura 11. Niveles de ARNm de la HO-1 por efecto del CoCl₂ a 0.5 y 1.0 mM en células PC12 a 24 y 48 h de incubación determinado por PCR en tiempo real. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=4). *p<0.05 vs Control CT 24 h &p<0.05 vs CT 48 h utilizando la herramienta estadística ANOVA seguido de un análisis Dunnet.

4. Niveles proteicos de la HO-1 y su presencia en las fracciones nucleares y mitocondriales como respuesta al modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl₂ en células PC12.

A partir de las fracciones nucleares, mitocondriales y citoplásmicas de las células PC12 sometidas con CoCl₂, se evaluaron los niveles proteicos de la HO-1. Se realizó una ELISA para detectar a la HO-1 en las fracciones celulares y se interpolaron los valores de proteína a partir de una curva de calibración normalizada con los mg de proteína total. Como se observa en la Figura 12, en citoplasma hay un incremento de 82 ng en el grupo control a 2,500 y 4,110 ng de HO-1 con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a las

24 h, respectivamente, mientras que a 48 h se observó un incremento de 96 ng a 1,200 y 1,300 ng con 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 , respectivamente. En la fracción nuclear 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl_2 (24 h) incrementó la cantidad de HO-1 detectada de 100 ng (control) a 227 y 255 ng de HO-1, respectivamente. A las 48 h se observó que los niveles de HO-1 aumentan de 57 ng (control) a 116 ng con 0.5 mM y 208 ng con 1.0 mM de CoCl_2 .

Finalmente, la HO-1 también se detectó en la fracción mitocondrial. A las 24 h en el control, observamos valores de 129 ng de HO-1 las cuales incrementaron a 220 ng y 350 ng por efecto de 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 , mientras que a las 48 h, el control presenta una cantidad de 173 ng aumentando a 510 ng y 926 ng con 0.5 y 1.0 mM CoCl_2 , respectivamente.

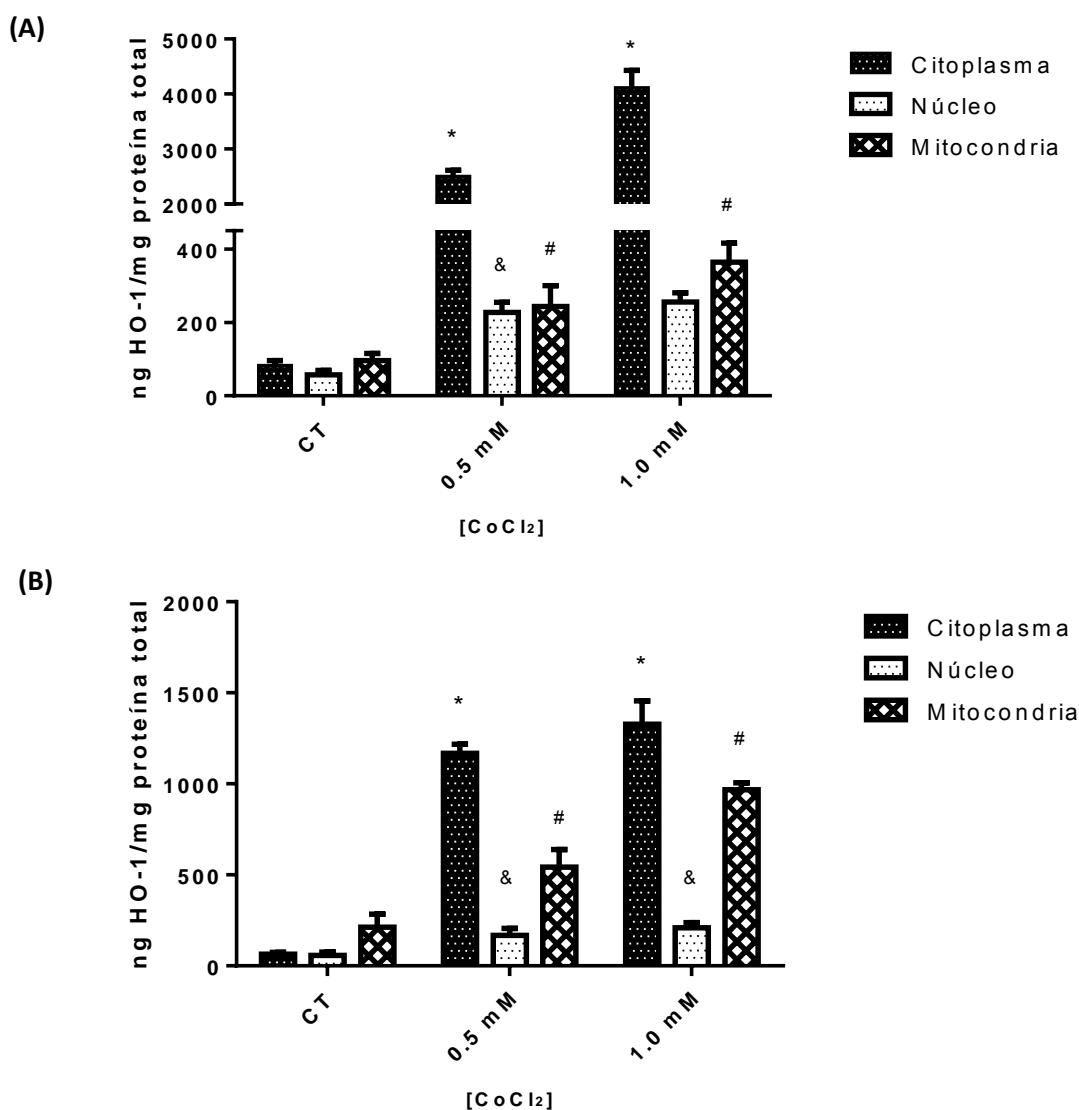


Figura 12. Niveles proteicos de la HO-1 por efecto del CoCl_2 0.5 mM y 1.0 mM en células PC12 en la fracción citoplásmica, nuclear y mitocondrial a 24 h (A) y a 48 h de incubación (B) determinado por ELISA. Los valores se expresan como la media \pm SEM, * $p < 0.05$ vs control CT en citoplasma, & $p < 0.05$ vs CT en núcleo, # $p < 0.05$ vs CT en mitocondria utilizando la herramienta estadística ANOVA seguido de un análisis Dunnet ($n=4$).

La presencia de la HO-1 también se observó en las fracciones citoplásmicas y nucleares por *Western blot*. Se verificó que las fracciones nucleares no estuvieran contaminadas con proteínas citoplásmicas realizando un western blot para la detección de la α -tubulina (Figura 13). En la Figura 14 se observa un aumento de los niveles proteicos de la HO-1 en citoplasma y núcleo con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl_2 a 24 y 48 h.

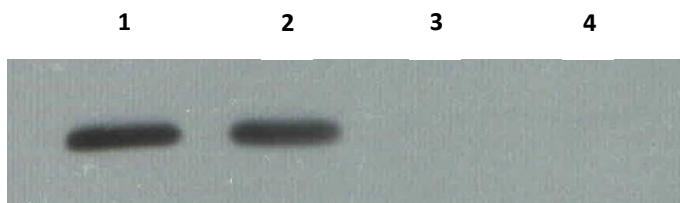


Figura 13. Pureza de las fracciones citoplásmicas (carriles 1 y 2) y nucleares (carriles 3 y 4) determinado con la inmunodetección de la α -tubulina por *Western blot*.

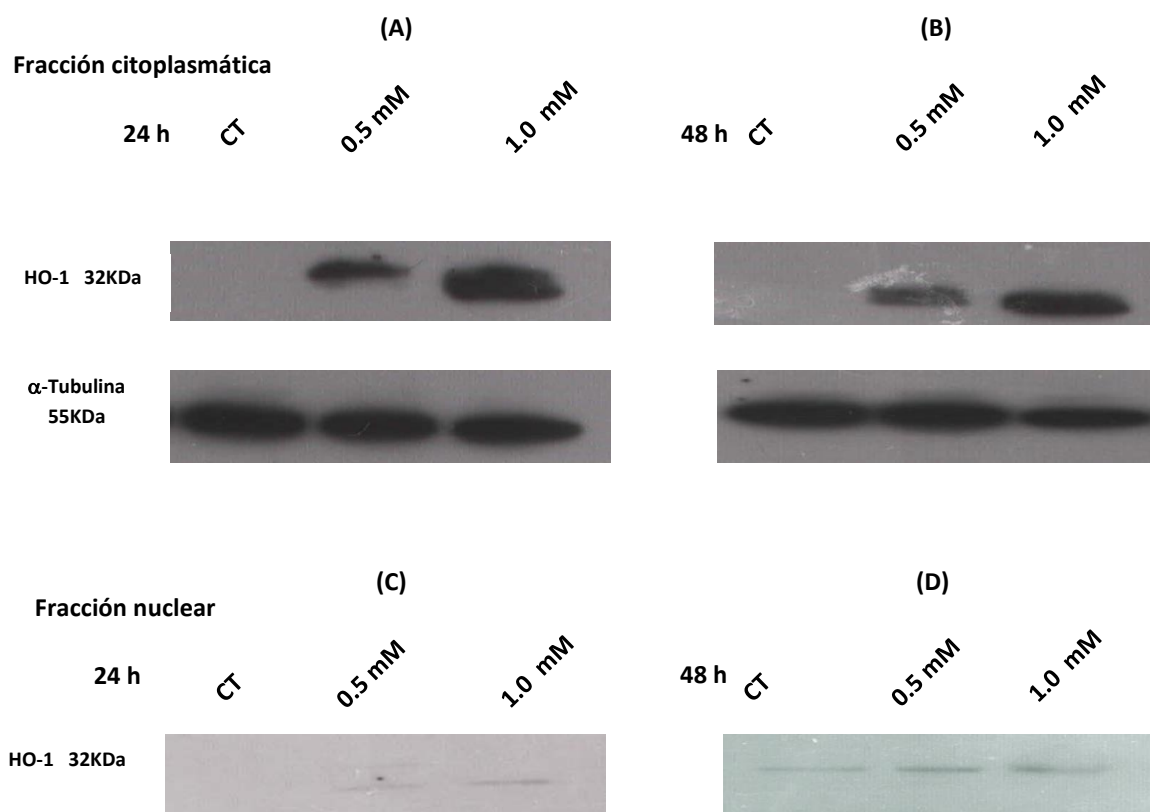


Figura 14. Niveles proteicos de la HO-1 por efecto del CoCl_2 a 0.5 mM y 1.0 mM en células PC12 en la fracción citoplásmica a 24 h (A) y 48 h (B) de incubación, en la fracción nuclear a 24 h (C) y 48 h (D) de incubación determinado por *Western blot*.

Para confirmar la inducción y la presencia de la HO-1 en núcleo y en mitocondria después de la exposición con CoCl_2 en las células PC12, se realizó un inmunomarcaje utilizando un anticuerpo primario específico para la HO-1 y un anticuerpo secundario α -IgG-*mouse* acoplado con el fluorocromo Alexa 488. Para el

marcaje de núcleos y de mitocondrias se utilizó *Hoechst* y *MitoTracker* rojo, respectivamente. El control negativo para Mitotracker rojo e IgG *mouse* Alexa 488 se observa en la figura 15. En la Figura 16 A y B, se observa que a 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 a 24 y 48 h de incubación la HO-1 se induce considerablemente. Adicionalmente, se observa que la HO-1 co-localiza en el núcleo a través del cambio de color azul de Hoechst a *cyan* y en mitocondria a partir del cambio de color rojo del *MitoTracker* a naranja, sugiriendo que la HO-1 se moviliza a diferentes compartimentos celulares como al núcleo y a la mitocondria después de un evento de hipoxia química inducido por el CoCl_2 .

Por otro lado, se observa que el CoCl_2 induce un arreglo diferencial de las mitocondrias, ya que en los controles se aprecia un acomodo reticular de éstas, mientras que con 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 a 24 y 48 h, las mitocondrias se deslocalizan en toda la célula, posiblemente sea debido a una fisión mitocondrial. Actualmente no existe un reporte sobre la distribución y morfología de las mitocondrias en presencia de CoCl_2 .

***MitoTracker* rojo negativo**
HO-1 IgG *mouse* Alexa 488 negativo

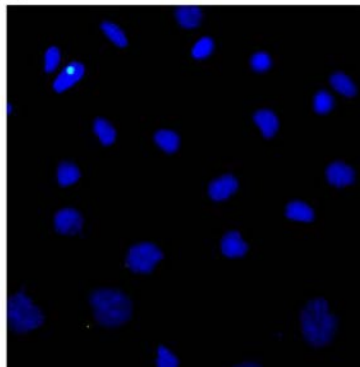


Figura 15. Control negativo para MitoTracker rojo e IgG *mouse* Alexa 488. La imagen fue tomada con el microscopio confocal FV10i (*Olympus*) con un aumento de 60X.

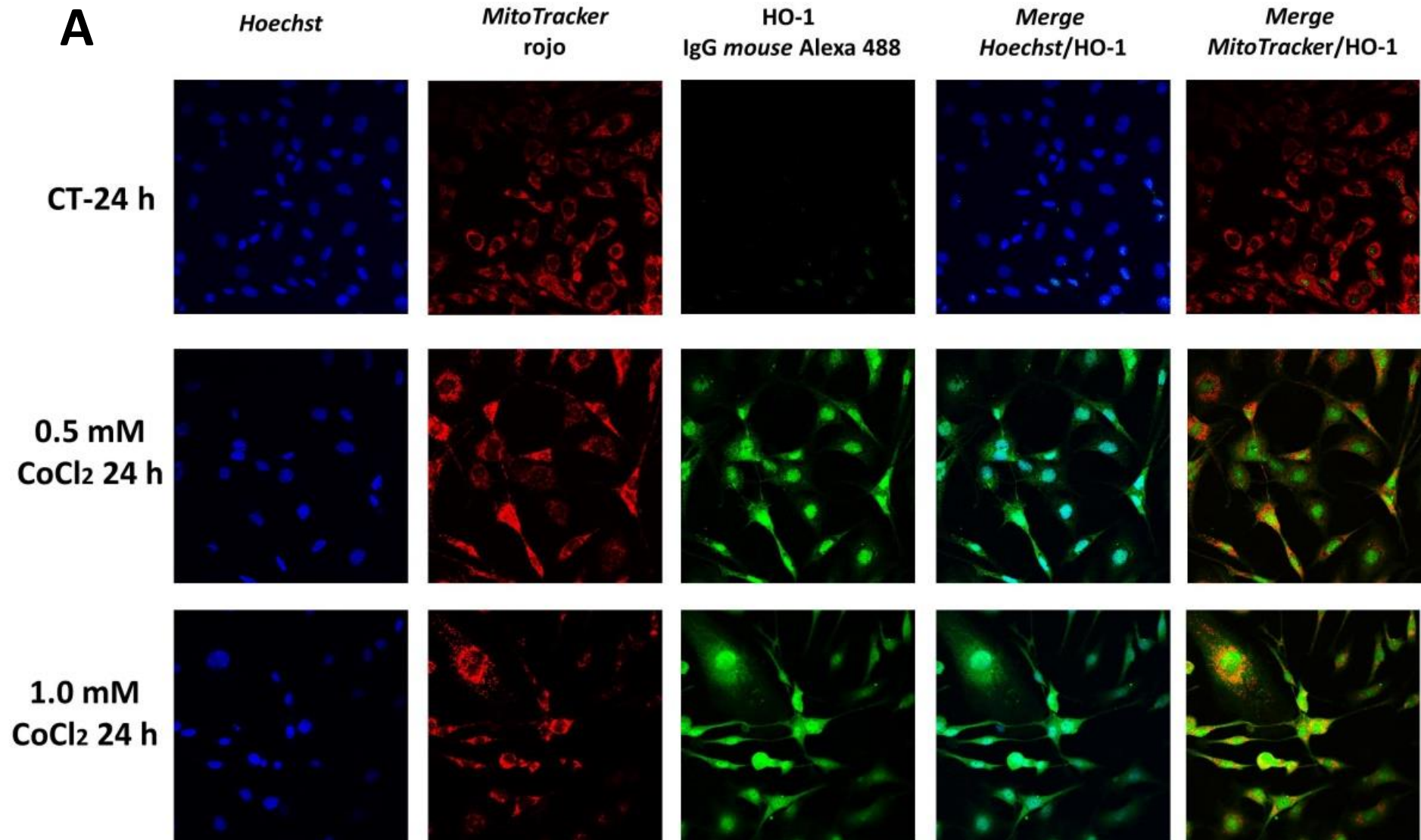


Figura 16 (A). La HO-1 se induce y se localiza en núcleo y mitocondria después de la exposición con CoCl₂. Las células PC12 fueron incubadas con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a 24 h de incubación. Se realizó un inmuno-marcaje utilizando un anticuerpo específico para la HO-1 y un anticuerpo secundario α -IgG-*mouse* IgG-Alexa 488. La co-localización nuclear de la HO-1 se observa con *Hoechst* indicado con color *Cyan* y la co-localización mitocondrial se observa con *MitoTracker* rojo indicado con color naranja. Las imágenes fueron tomadas con el Microscopio confocal FV10i (*Olympus*) con un aumento de 60X.

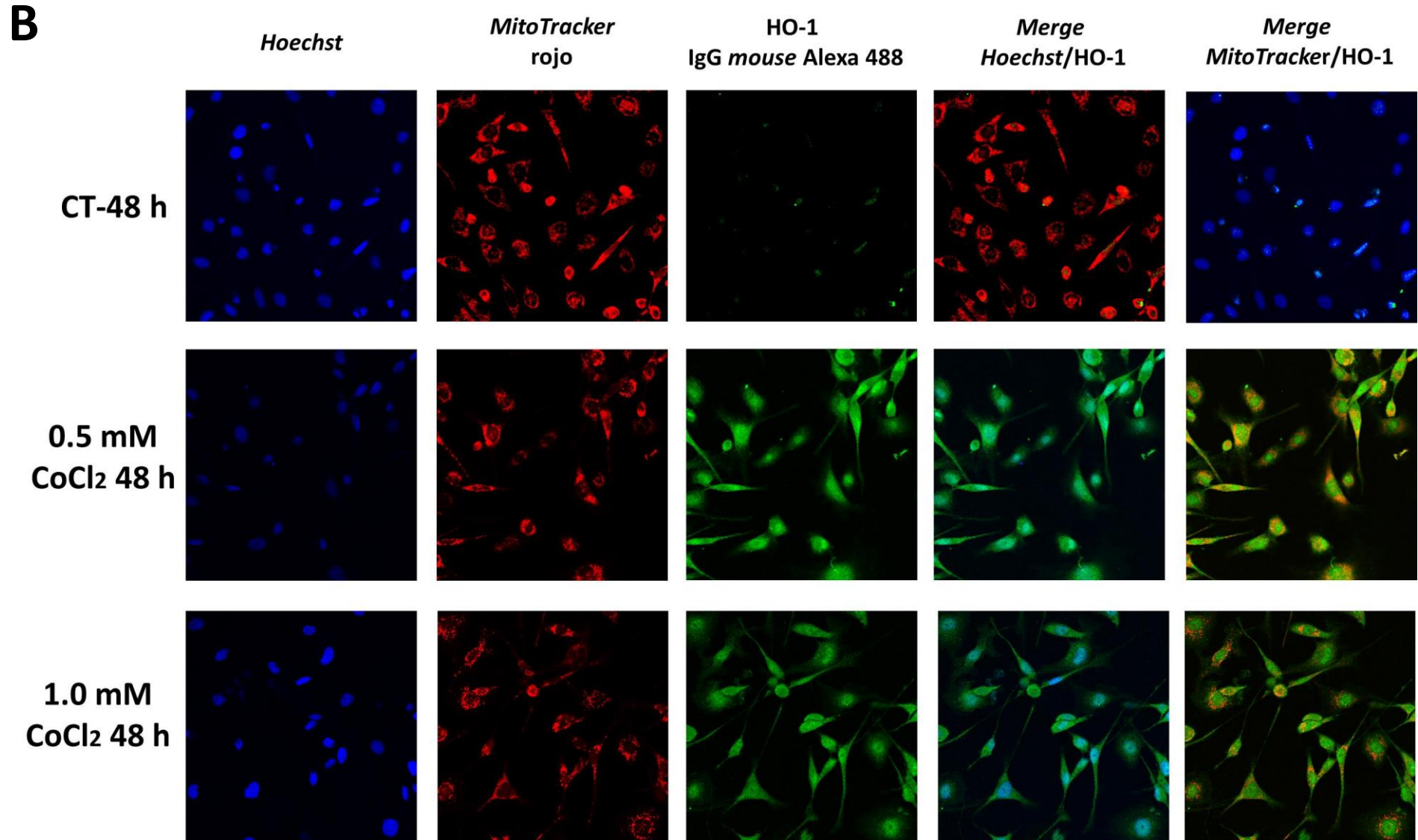


Figura 16 (B). La HO-1 se induce y se localiza en núcleo y mitocondria después de la exposición con CoCl₂. Las células PC12 fueron incubadas con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a 48 h (B) de incubación. Se realizó un inmuno-marcaje utilizando un anticuerpo específico para la HO-1 y un anticuerpo secundario α -IgG-*mouse* IgG-Alexa 488. La co-localización nuclear de la HO-1 se observa con *Hoechst* indicado con color *Cyan* y la co-localización mitocondrial se observa con *MitoTracker* rojo indicado con color naranja. Las imágenes fueron tomadas con el Microscopio confocal FV10i (*Olympus*) con un aumento de 60X.

5. Respuesta de la HO-2 a nivel de ARNm en un modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl₂ en células PC12.

Los niveles de ARNm de la HO-2 en células PC12 expuestas a 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a 24 y 48 h se presentan en la Figura 17. Se observa que en todas las condiciones el transcrito no presenta cambios estadísticamente significativos. Sin embargo, se observa una tendencia a disminuir con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl₂ a 24 h de incubación.

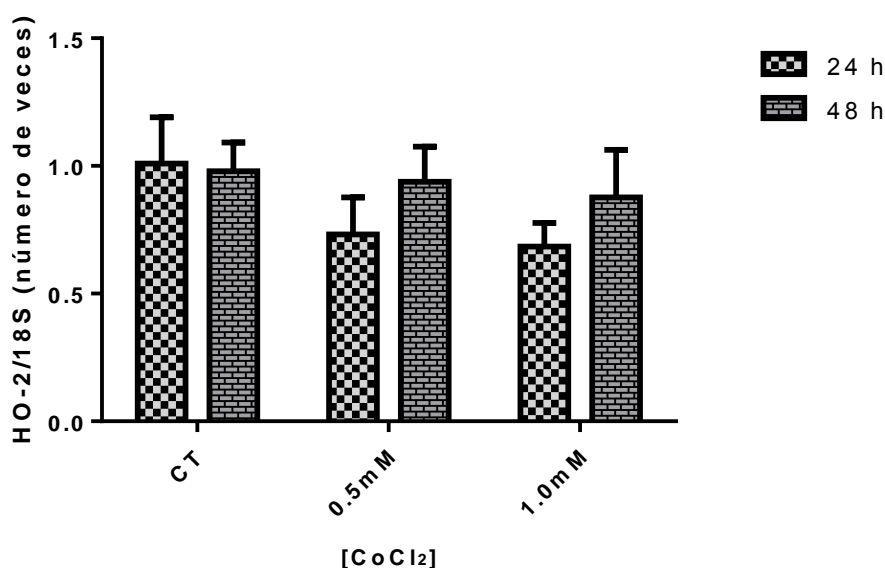


Figura 17. Niveles de ARNm de la HO-2 por efecto del CoCl₂ a 0.5 mM y 1.0 mM en células PC12 a 24 y 48 h de incubación determinado por PCR en tiempo real. Los valores se expresan como la media \pm SEM (n=4).

6. Niveles proteicos de la HO-2 y su presencia en las fracciones nucleares y mitocondriales como respuesta al modelo de hipoxia inducida químicamente por CoCl₂ en células PC12.

Se determinaron los niveles proteicos de la HO-2 a partir de las fracciones nucleares, mitocondriales y citoplásmicas de las células PC12 sometidas a las condiciones inducidas por CoCl₂. Se realizó un ELISA para detectar a la HO-2 en las fracciones celulares y se extrapolaron los valores de proteína a partir de una curva de calibración normalizada con los mg de proteína total. Se detectaron 4,847 pg de HO-2 en citoplasma en las células control. La incubación con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl₂ durante 24 h disminuyó significativamente, detectando 3,365 y 3,227 pg de HO-2 respectivamente. A 48 h de incubación se detectaron cerca de 2,222 pg de HO-2 en citoplasma, cantidad que disminuyó alrededor de un 75 y 60 % por efecto de 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂, respectivamente. En la fracción nuclear se detectaron niveles

proteicos de la HO-2 en controles (1,181 pg) y el efecto con CoCl_2 provocó una disminución con 0.5 mM (1,029 pg) y 1.0 mM de CoCl_2 (889 pg) siendo significativa sólo ésta última. (Figura 18 A). A las 48 h se observa que los niveles de HO-2 nuclear también disminuyen de 1,047 pg en el grupo control a 741 pg y 799 pg de HO-2 con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl_2 , respectivamente (Figura 18 B). Finalmente, en la fracción mitocondrial se detectaron niveles proteicos de HO-2 en el grupo control (1,187 pg) sin ningún cambio con CoCl_2 a las 24 h (Figura 18 A). Sin embargo, a las 48 h se observa que la HO-2 aumenta significativamente de 1,157 pg (grupo control) a 1,897 y 1,741 pg con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl_2 , respectivamente (Figura 18 B).

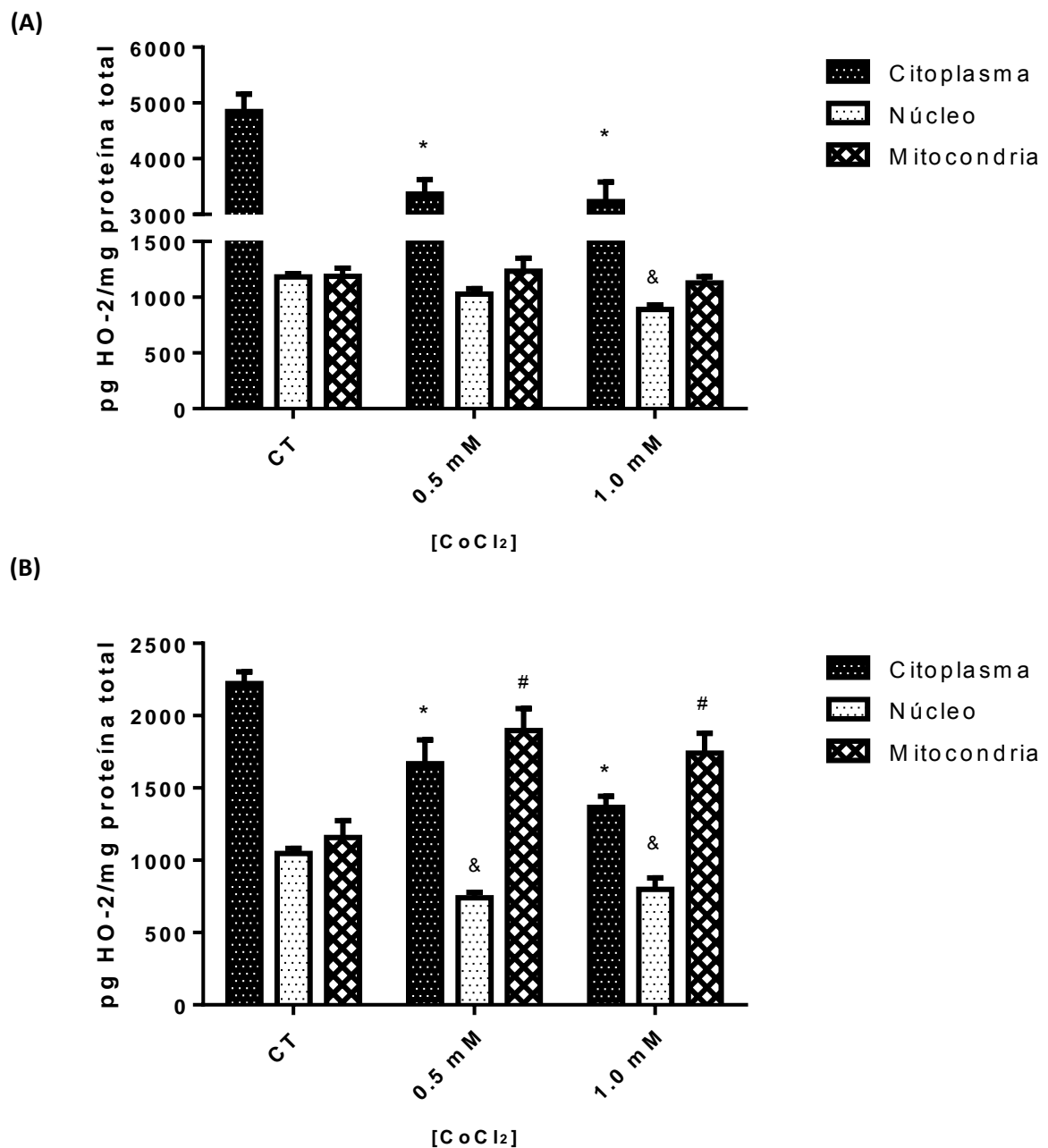


Figura 18. Niveles proteicos de la HO-2 por efecto del CoCl_2 a 0.5 mM y 1.0 mM en células PC12 en la fracción citoplasmica, nuclear y mitocondrial a 24 h (A) y a 48 h de incubación (B) determinados por ELISA. Los valores se expresan como la media \pm SEM, * $p < 0.05$ vs CT en citoplasma, & $p < 0.05$ vs CT en núcleo, # $p < 0.05$ vs CT en mitocondria utilizando la herramienta estadística ANOVA seguido de un análisis Dunnet ($n=4$).

Los cambios proteicos de la HO-2 como respuesta a la hipoxia química también se detectaron por *western blot* en las fracciones citoplásmicas y nucleares. En la Figura 19 se observa que los niveles proteicos de la HO-2 en citoplasma disminuyen con 0.5 mM y 1.0 mM de CoCl₂ a 24 y 48 h. En las fracciones nucleares, se detecta la presencia de la HO-2 en el grupo control y el efecto de ambas concentraciones de CoCl₂ y en ambos tiempos disminuye la cantidad de proteína.

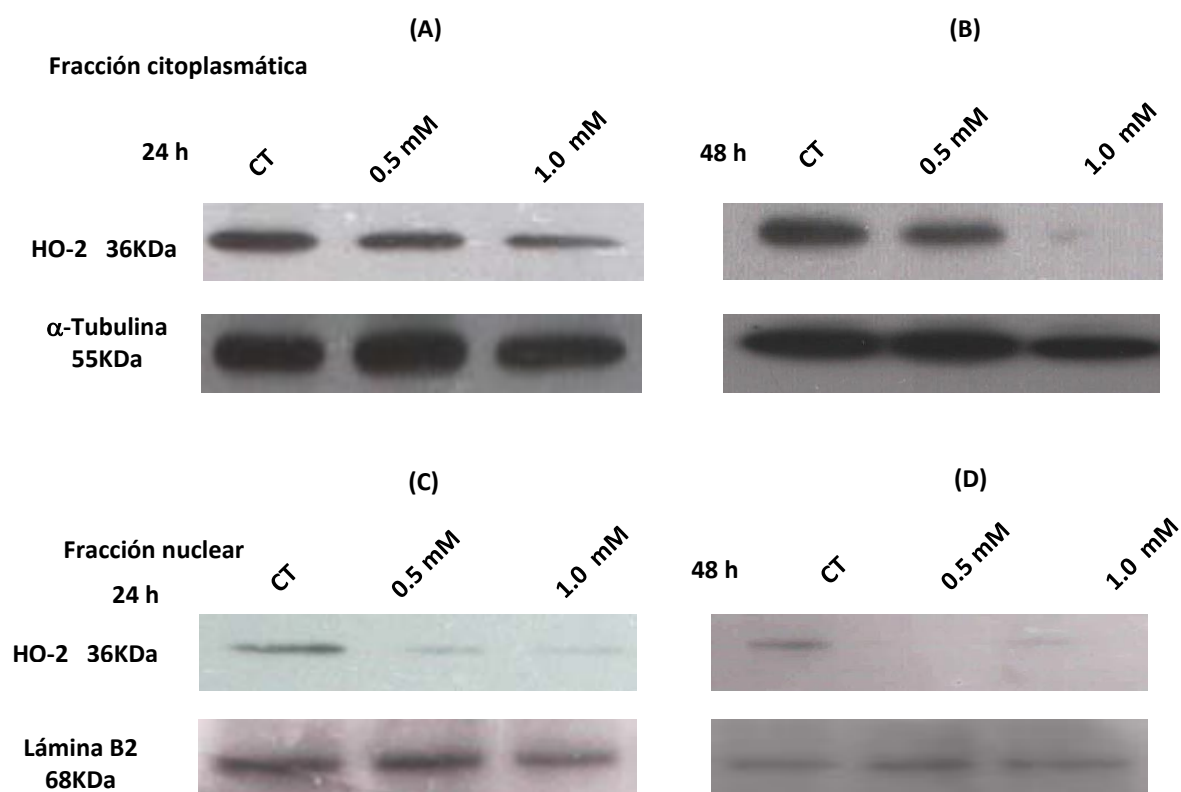


Figura 19. Niveles proteicos de la HO-2 por efecto del CoCl₂ a 0.5 mM y 1.0 mM en células PC12 en la fracción citoplásmica a 24 h (A) y 48 h (B) de incubación y en la fracción nuclear a 24 h (C) y 48 h (D) de incubación respectivamente por Western blot. Figura representativa de una n=3.

Para confirmar los cambios proteicos de la HO-2 inducidos por el CoCl₂ y su presencia en el núcleo y la mitocondria en las células PC12, se realizó un inmunomarcaje, utilizando un anticuerpo primario específico para la HO-2 y un anticuerpo secundario α -IgG-*rabbit* acoplado con el fluorocromo Alexa 488. Para el marcaje de núcleos y de mitocondrias se utilizó *Hoechst* y *MitoTracker* rojo respectivamente. El control negativo para Mitotracker rojo e IgG *rabbit* Alexa 488 se observa en la figura 20. En la figura 21 A y B, se observa que la HO-2 se encuentra presente en el núcleo y en la mitocondria a través del cambio de color azul de *Hoechst* a *cyan* y la de color rojo del *MitoTracker* a naranja, respectivamente en los grupos controles. El tratamiento con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a las 24 y 48 h muestra una

tendencia a disminuir los niveles de la HO-2 en la fracción nuclear y citoplásmica; mientras que en la mitocondria no fue posible observar claramente el aumento de esta isoenzima por efecto del CoCl_2 a 48 h, como se mostró con el método de ELISA (Figura 18B). Estos resultados sugieren que la HO-2 se compartimentaliza en diferentes organelos celulares como el núcleo y la mitocondria de forma diferencial a como lo hace la HO-1. Además, también demuestran que la HO-2 se localiza en el núcleo y mitocondria en este tipo celular (PC12) de forma fisiológica, un resultado que no ha sido reportado previamente.

MitoTracker rojo negativo
HO-2 IgG rabbit Alexa 488 negativo

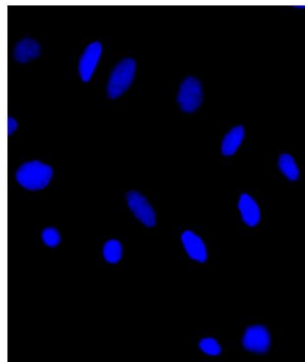


Figura 20. Control negativo para MitoTracker rojo e IgG *rabbit* Alexa 488. La imagen fue tomada con el Microscopio confocal FV10i (*Olympus*) con un aumento de 60X.

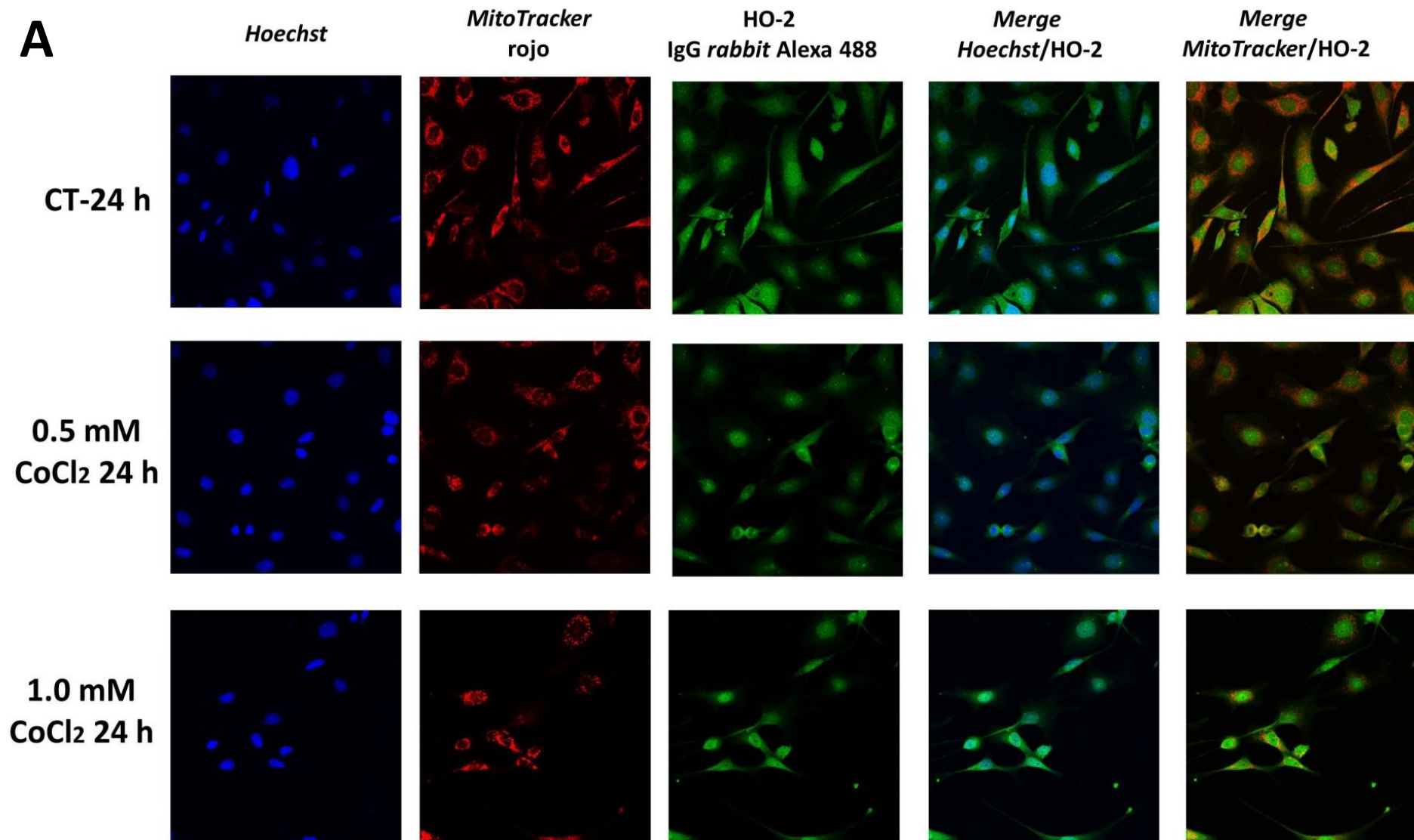


Figura 21 (A). La HO-2 se localiza en núcleo y mitocondria de manera fisiológica en las células PC12. Las células PC12 fueron incubadas con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a 24 h de incubación. Se realizó un inmuno-marcaje utilizando un anticuerpo específico para la HO-2 y un anticuerpo secundario α -IgG-*rabbit* IgG-Alexa 488. La co-localización nuclear de la HO-2 se observa con *Hoechst* indicado con color *Cyan* y la co-localización mitocondrial se observa con *MitoTracker* rojo indicado con color naranja. Las imágenes fueron tomadas con el Microscopio confocal FV10i (*Olympus*) con un aumento de 60X.

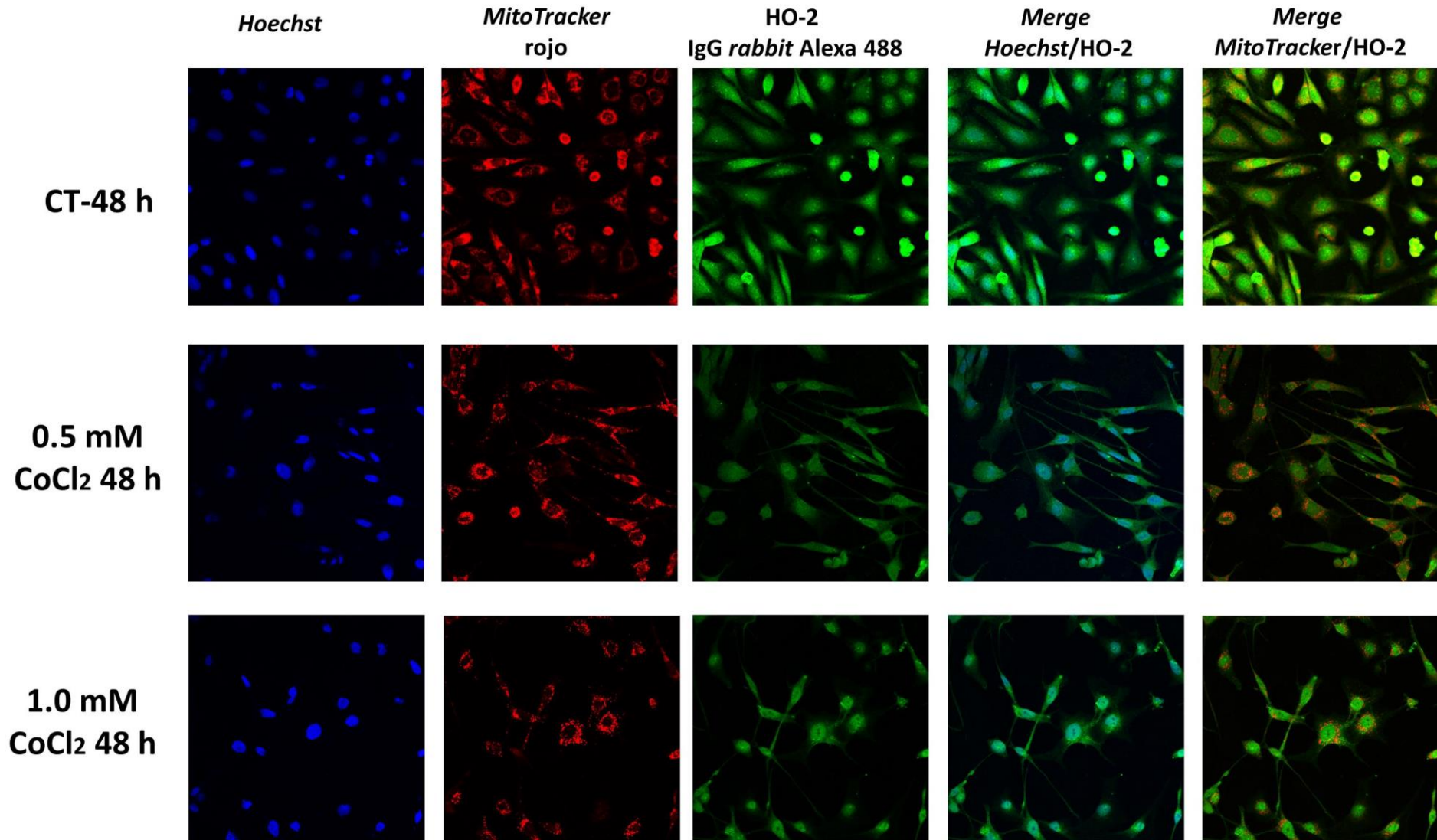


Figura 21 (B). La HO-2 se localiza en núcleo y mitocondria de manera fisiológica en las células PC12. Las células PC12 fueron incubadas con 0.5 y 1.0 mM de CoCl₂ a 48 h de incubación. Se realizó un inmuno-marcaje utilizando un anticuerpo específico para la HO-2 y un anticuerpo secundario α -IgG-*rabbit* IgG-Alexa 488. La co-localización nuclear de la HO-2 se observa con *Hoechst* indicado con color *Cyan* y la co-localización mitocondrial se observa con *MitoTracker* rojo indicado con color naranja. Las imágenes fueron tomadas con el Microscopio confocal FV10i (*Olympus*) con un aumento de 60X.

IX. DISCUSIÓN.

Las respuestas moleculares desencadenadas por las células ante los cambios de O_2 son esenciales para la adaptación y supervivencia celular. Para la comprensión de la adaptación celular a la hipoxia ha sido importante estudiar procesos de respuesta rápida como la detección de la disminución de O_2 así como la regulación transcripcional resultado de la hipoxia crónica. Los estudios relacionados al estrés hipóxico están enfocados principalmente a las vías reguladas por los factores HIFs, ya que son los principales mediadores de la adaptación celular en la hipoxia y se hallan fuertemente expresados en estas condiciones. En la actualidad, se han utilizado modelos de hipoxia inducida por agentes químicos denominados como mimetizadores de hipoxia como el Co^{2+} , debido a que provoca la acumulación del factor HIF-1 α , desencadenando una respuesta transcripcional similar al modelo por reducción de O_2 . En este trabajo empleamos la línea celular PC12 como modelo para estudiar las respuestas moleculares desencadenadas por la hipoxia, debido a la sensibilidad que tiene a los cambios de O_2 , así como a la capacidad de estabilizar los factores HIF-1 y -2 α . En este trabajo se observó la estabilización del factor HIF-1 nuclear después de 24 y 48 h de incubación con 0.5 mM y 1.0 mM de $CoCl_2$ en células PC12 (Figura 8A). Resultados experimentales de varios grupos han demostrado que en la hipoxia por reducción de O_2 se producen ERO y éstas son parcialmente responsables de la estabilización de las subunidades 1 y 2 α de los factores HIF. La generación de ERO inducidas por $CoCl_2$ a 0.5 mM y 1.0 mM de $CoCl_2$ fue determinada (Figura 8B) concluyendo que en nuestras condiciones, el modelo de hipoxia química reproduce estos dos efectos de forma similar a lo observado en el modelo por reducción de O_2 .

Por otro lado, la viabilidad celular en condiciones de hipoxia varía en función del tipo de celular. La evaluación de la muerte celular en los diferentes grupos experimentales es importante para conocer con qué porcentaje de células se trabaja en cada una de las condiciones. En este trabajo se evaluó el porcentaje de muerte celular a través de la determinación del pico SubG₀ y la respuesta metabólica en condiciones de hipoxia inducidas por $CoCl_2$ a través de la reducción de MTT. En las condiciones utilizadas para la inducción de hipoxia química (0.5 y 1.0 mM durante 24 o 48 h) se observó que el porcentaje de células vivas fue mayor al 50%. A partir de este porcentaje se observó que la capacidad de reducir el MTT es afectado de manera significativa por el $CoCl_2$ a partir de 0.5 mM a 24 y 48 h de incubación, observando un efecto mayor a 1.0 mM de $CoCl_2$ (Figura 9 A). Estos resultados indican que el $CoCl_2$

afecta el metabolismo celular, alterando posiblemente la actividad de varias enzimas deshidrogenasas como la succinato deshidrogenasa responsable de reducir al MTT para formar la sal de formazán correspondiente. La disminución de la capacidad reductora de las células inducida por el CoCl_2 indica una disminución de la función mitocondrial.

Los cambios morfológicos de las células PC12 inducidos por CoCl_2 y que se observan como prolongaciones citoplásmicas (Figura 10) indican posiblemente el crecimiento de neuritas. Se ha descrito que esta línea celular sometida a hipoxia por reducción de O_2 y por Co^{2+} se induce la expresión de marcadores neuronales paralelamente a la formación de neuritas que en algún periodo de la diferenciación darán origen a la formación de axones y dendritas. (Kotake-Nara et al., 2005).

1. HO-1.

El sistema HO es un conjunto de enzimas moduladoras de la supervivencia y protección a cualquier tipo de estrés celular debido al mantenimiento del grupo hemo y a las funciones que realizan los metabolitos producidos durante la reacción catalítica que lleva a cabo (Maines, 2000). La capacidad de sobreexpresión de la HO-1 como respuesta a varios factores que generan estrés oxidante provee de protección a una gran variedad de células y tejidos aminorando el daño celular (Abraham & Kappas, 2008). Varios investigadores la han catalogado como el gen que más se induce por diversos estímulos. Existen estudios en donde se demuestra que su expresión varía dependiendo de la intensidad del estímulo de la hipoxia, el tipo de tejido y la línea celular (He et al., 2010; Zhang et al., 2011). Se ha observado que en modelos de hipoxia tanto *in vitro* como *in vivo*, la HO-1 puede inducirse, desregularse o no sufrir cambios, sugiriendo que su respuesta en hipoxia no puede generalizarse. En el modelo de hipoxia inducido químicamente por CoCl_2 en células PC12 observamos que la HO-1 aumenta y significativamente tanto en niveles de ARNm (Figura 11) y proteína con respecto al control (Figuras 12, 14 y 16). Estos incrementos de la HO-1 podría ser debido a la acumulación del HIF-1 α (Figura 8A), ya que es un gen regulado por este factor de transcripción al contar con secuencias HRE en su promotor. Se observó también que por efecto del CoCl_2 , la HO-1 incrementó su presencia en el núcleo, sugiriendo un papel importante para modular la señal de hipoxia desencadenada por el CoCl_2 (Figuras 12, 14 y 16). Se ha propuesto que la presencia en núcleo de la HO-1 está relacionada con la regulación de varios factores de

transcripción por interacción proteína-proteína (NF κ -B, STAT3, AP-1, Nrf2, entre otros) y con otras proteínas de reparación de DNA como la PARP (Dennerly, 2014; Biswas et al., 2014, Lin et al., 2007). En el caso del factor de transcripción Nrf2, se ha descrito que la HO-1 se une directamente al dominio Neh5 de éste, aumentando su vida media, sosteniendo y prolongando la respuesta antioxidante desencadenada por el Nrf2, entre ellos la respuesta de la misma HO-1, un gen regulado por Nrf2. Otro de los factores que regula a la HO-1 es el factor de transcripción AP-1. Se ha observado que la HO-1 nuclear aumenta la actividad transcripcional de este factor (Biswas et al., 2014; Li et al., 2011). Estos datos sugieren que la HO-1 provoca una retroalimentación positiva para su propia regulación transcripcional, explicando en parte el número de veces que se induce ante varios estímulos. Estas funciones no enzimáticas de la HO-1 se han descrito recientemente y hasta el momento no se ha podido detectar actividad del sistema HO en el núcleo. De hecho, recientemente se ha descrito que la capacidad de translocarse hacia al núcleo en condiciones de estrés por hipoxia se debe al corte proteolítico de 36 residuos aproximadamente del dominio C-terminal (dominio transmembranal del retículo endoplásmico), exponiendo una secuencia putativa de exportación nuclear de la proteína Rev-1 del virus de inmunodeficiencia humana (Dennerly, 2014). Esta secuencia es posiblemente la señal que dirija su translocación al núcleo en condiciones de hipoxia. Adicionalmente se ha observado la interacción de la HO-1 con la proteína de exportación nuclear CRM1, lo que sugiere que la HO-1 es transportada hacia el núcleo por esta vía. Estas evidencias apoyan que la HO-1 puede translocarse al núcleo como respuesta al estímulo de estrés hipóxico, regulado muy posiblemente por los factores HIFs. En este trabajo se demostró y se confirmó por inmunofluorescencia que la HO-1 migra hacia al núcleo (Figura 16) como respuesta al CoCl₂, sugiriendo que la localización nuclear de la HO-1 es dependiente del factor transcripcional HIF-1, debido a que este modelo de hipoxia estabiliza a la subunidad α del HIF independientemente de O₂.

La presencia de la HO-1 en mitocondria ha sido descrita recientemente para otras condiciones de estrés. En estos casos, la HO-1 migra hacia la mitocondria para modular el estrés oxidante generado por este organelo a través de su actividad enzimática. De hecho, se ha reportado que la migración de HO-1 hacia la mitocondria está acompañada por la P450 NADPH óxido-reductasa, una enzima importante para la actividad del sistema HO. Se ha visto también la translocación de la BVR a la mitocondria para potenciar el efecto antioxidante de la BV a través de la conversión a BR (Bindu et al., 2011; Denery et al., 2014). Por lo tanto, la presencia de la HO-1 en mitocondria en el modelo químico de estrés hipóxico, posiblemente ocurre para

regular el estrés oxidante a través de la producción de ERO generados en este organelo (Figura 12 A y B; Figura 16 A y B).

2. HO-2.

La HO-2 ha atraído la atención de varios grupos de investigación. El trabajo con animales genéticamente modificados ha revelado que esta isoforma actúa como una proteína protectora ante el estrés en el sistema nervioso. Desempeña un papel importante por tener niveles de expresión altos en este tejido a diferencia de la HO-1, por lo que se convierte en una fuente primaria de defensa contra las ER y ERN. Resultados experimentales han permitido atribuirle un papel en la neuroprotección ante estímulos de daño como la isquemia y el daño hemorrágico cerebral con ratones *knock-out* para la HO-2 (Parfenova & Leffler, 2008). La pérdida de la actividad de la HO-2 en ratones knock-out (HO-2^{-/-}), provoca alteraciones en la fertilidad y genera obesidad, hipertensión y resistencia a la insulina en contraste con lo observado para ratones deficientes en HO-1 (Sodhi et al., 2009). Los ratones HO-2^{-/-} presentan una mayor susceptibilidad al daño por la isquemia inducida por oclusión de la arteria cerebral media, presentando una lesión de infarto de aproximadamente el doble que los ratones *wild type* (Doré et al., 1999).

Existen pocos estudios acerca del comportamiento de la expresión de la HO-2 a nivel de ARNm y proteína en varios estímulos de daño. Resultados en modelos *in vivo* e *in vitro* han revelado que la HO-2 presenta cambios en su expresión y que éstos varían dependiendo del tipo celular, tejido y estímulo estudiado. Zhang et al. (2006) determinaron que la expresión de la HO-2 durante 48 h de hipoxia (O₂ 1%), presentó una disminución a nivel de transcrito y proteína en 5 líneas celulares (Linfocitos T Jurkat, células de eritroleucemia YN-1 y K562, células HeLa y células HepG2). He et al. (2010) observaron que en células endoteliales humanas expuestas a 16 h de hipoxia (O₂ 1%) la HO-2 tuvo un decremento a nivel de ARNm sin ninguna alteración de los niveles proteicos. También observaron que a las 48 h de hipoxia, se presentó una recuperación de los niveles de ARNm de la HO-2 sin ningún cambio en el nivel de proteína. A pesar de la reducción de los niveles de transcrito de HO-2 y la reducción de la síntesis total de proteína, los niveles de proteína de la HO-2 no se modificaron. Este fenómeno fue explicado a través de un perfil de polisomas, el cual reveló un aumento en la asociación del transcrito de la HO-2 con polisomas durante la hipoxia

aumentando la traducción de la HO-2 a pesar de la reducción de los niveles del transcrito (Zhang et al., 2006; He et al., 2010).

Otra evidencia de que la HO-2 no es estrictamente constitutiva, se obtuvo a través del trabajo de Govindaraju et al. (2005), quienes determinaron que los niveles de proteína de la HO-2 aumentaron en endotelio aórtico de ratas tras 16 h de hipoxia. Han et al. (2010), también demostraron un aumento en los niveles proteicos de la HO-2 en miocardio en ratones expuestos a hipoxia durante 28 días. Sutherland et al. (2009), demostraron que en condiciones de hipoxia isquémica, es decir un modelo que combina un evento de hipoxia e isquemia global, existe un aumento en la expresión de la HO-2 en células neuronales, gliales y endoteliales.

Los resultados de la tesis de Muñoz-Sánchez, (2013) muestran que la HO-2 tiene una respuesta significativa en un evento de isquemia-reperusión cerebral en rata presentando cambios tanto a nivel de transcrito, como de proteína en corteza fronto-parietal y en tejido estriatal. En estriado, la HO-2 disminuyó a nivel de ARNm y de proteína; mientras que en la corteza se observó un incremento en el transcrito y la cantidad de proteína de la HO-2 a las 2 h de isquemia y 4 h de reperusión. Posteriormente, los niveles de ARNm disminuyó a partir de 6 h de reperusión manteniendo la proteína elevada hasta las 10 h de reperusión, (Muñoz-Sánchez, 2013). Existen evidencias de que la HO-2 posee mecanismos post-transcripcionales que regulan su estabilidad, degradación y eficiencia traduccional. Varios autores han establecido que la HO-2 tiene mecanismos de estabilidad transcripcional, aunque no han explicado de qué manera pueden modificar la estabilidad y promover un incremento en los niveles de ARNm ante varios estímulos, ya que el único elemento de respuesta transcripcional está mediado por glucocorticoides. Tampoco se conoce qué mecanismos moleculares son los responsables de un aumento en los niveles proteicos de la HO-2. Hasta ahora el mecanismo que trata de explicar por qué los niveles de proteína de HO-2 se mantienen o incrementan es el de la incorporación del transcrito en polisomas, lo que aumenta la eficiencia traduccional de la HO-2. Otros autores han postulado que también puede ser a través de mecanismos de degradación de la proteína, aunque actualmente no se conoce qué factores proteicos son los encargados de su degradación (He et al., 2010). En este trabajo se demostró que la HO-2 responde únicamente a nivel de proteína, siendo inversa a la observada para la HO-1 (Figuras 17, 18, 19 y 21). Se observó que el estrés hipóxico inducido químicamente por el CoCl_2 ocasionó una disminución de los niveles de HO-2 en la fracción citoplásmica, sugiriendo posiblemente una degradación. Adicionalmente se

demonstró que la HO-2 está presente en el núcleo en las células PC12 de manera fisiológica (Figuras 18, 19 y 21) y el CoCl_2 disminuye los niveles proteicos en este organelo. Existen reportes que indican que en células cancerosas así como en varias líneas tumorales la HO-1 está presente en el núcleo (Chau, 2015), sin embargo no existen reportes que indiquen si la HO-2 también es capaz de translocarse hacia el núcleo en células cancerosas. Éste sería el primer reporte que indique que la HO-2 también puede sufrir translocación nuclear en células cancerosas como la línea celular PC12 determinado por *Western blot*, ELISA e inmunofluorescencia, sugiriendo una función importante para la supervivencia de este tipo de células.

Finalmente, observamos que la HO-2 también está presente en mitocondria de manera fisiológica y aumenta su presencia únicamente al estrés hipóxico prolongado inducido por CoCl_2 (48 h) (Figura 17 B). También se observó a la HO-2 por inmunofluorescencia en el control de las mitocondrias, sin embargo, el aumento de esta isoforma en este organelo con 0.5 y 1.0 mM de CoCl_2 a 48 h no se observó claramente por esta técnica como se observa por ELISA. Posiblemente, estos resultados son debido a la sensibilidad de cada una de las técnicas. En la actualidad no hay reportes que indiquen que la HO-2 también tenga la capacidad de migración mitocondrial. Sin embargo, conociendo que existe dimerización entre la HO-1 y HO-2 (Hwang et al., 2014), es muy probable que la migración sea dependiente de la HO-1, y esto constituye un interesante tema de estudio sobre la HO-2.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la expresión y la regulación del sistema HO podría estar jugando un papel muy importante en la respuesta al estrés hipóxico y en particular en un modelo de hipoxia química inducido por CoCl_2 .

X. CONCLUSIONES.

El sistema HO presentó respuestas diferenciales a nivel de transcrito, proteína y localización subcelular los cuales podrían estar relacionadas con el aumento del factor HIF-1 α y la producción de ERO con el CoCl₂.

La HO-1 aumentó a nivel de transcrito y proteína y provocó la presencia de esta isoenzima en núcleo y mitocondria con el tratamiento con CoCl₂ sugiriendo que podría jugar un papel importante en mitigar el daño celular por hipoxia. La HO-2 no cambió a nivel de ARNm y disminuyó en citoplasma con el tratamiento con CoCl₂. Se demostró por primera vez la presencia de la HO-2 en núcleo y en mitocondria en las células PC12 sugiriendo que la HO-2 podría tener funciones importantes en la señalización nuclear y mitocondrial para mantener esta línea celular en un estado de inmortalización. El CoCl₂ redujo los niveles proteicos en núcleo, mientras que en mitocondria aumentó a 48 h posiblemente para aminorar el daño celular causado por la hipoxia inducida químicamente por CoCl₂. Los cambios observados con la HO-2 sugieren que esta isoenzima no es estrictamente constitutiva presentando una respuesta contraria a la observada de la HO-1.

XI. PERSPECTIVAS.

A partir de los resultados de este trabajo, se abre un campo en la investigación sobre las posibles funciones de la HO-1 y la HO-2 en diversos compartimentos celulares como el núcleo y la mitocondria por estrés hipóxico. Una de las interrogantes que deja este trabajo es conocer si la participación de ambas isoenzimas en estos organelos se debe principalmente a su actividad enzimática. Los estudios donde se reporta la presencia de la HO-1 en el núcleo sugieren que no posee actividad enzimática pero sí en la mitocondria determinado por un ensayo acoplado a la actividad de la BR, lo que sugiere funciones distintas en cada compartimento celular. En núcleo posiblemente actúe como moduladora de proteínas nucleares como factores de transcripción o de reparación de ADN por interacción proteína-proteína; mientras que su función en la mitocondria sugiere un papel importante que depende de su actividad enzimática. Actualmente, el principal problema que existe para diferenciar las actividades enzimáticas de la HO-1 y la HO-2 es la falta de inhibidores específicos. La mayor parte de los estudios atribuyen la actividad ya sea a la HO-1 o a la HO-2 dependiendo de su abundancia en el tejido, o bien se atribuye completamente a la

HO-1 debido a su inducción. Tradicionalmente, una gran parte de los trabajos utilizan inhibidores como las metaloporfirinas por su similitud estructural con el grupo hemo, afectando la actividad de ambas isoformas. En los últimos 10 años se han reportado estudios en los que se emplean derivados del imidazol-dioxolano para inhibir selectivamente a la HO-1 o HO-2 purificada a partir de sistemas recombinantes o en una preparación de microsomas. Sin embargo, ninguno de estos compuestos se ha utilizado aún para la resolución de problemas biológicos. El compuesto hidrocloreto de 2-[2-(4-clorofenil) etil]-2-[(1H-imidazol-1-il) metil]-4-metil-1,3-dioxolano ha presentado mayor selectividad en inhibir la HO-1 (Kinobe et al., 2006). A partir del desarrollo de este inhibidor específico, se podrá investigar con mayor precisión la actividad específica de la HO-1 y de la HO-2 en eventos de hipoxia y se podrá discernir qué papel juega la actividad enzimática de cada una de las isoenzimas ante un daño celular.

Por otro lado, en el núcleo sería interesante conocer si el sistema HO ejecuta una función independiente de su actividad enzimática como las interacciones proteicas con factores de transcripción, proteínas de reparación de ADN, proteínas involucradas con el remodelaje de la cromatina, mientras que en la mitocondria su relación con proteínas involucradas en la respiración oxidativa.

Finalmente, realizar un estudio sobre la respuesta del sistema HO en un modelo de hipoxia por reducción de O_2 puede contribuir a conocer si la respuesta generada del sistema HO por el $CoCl_2$ como mimetizador de hipoxia es dependiente o independiente de la presencia de O_2 y la posible contribución del factor HIF-1 para la generación de las respuestas de ambas isoformas.

XII. REFERENCIAS.

- Adachi T., Aida K., Nishihara H., Kamiya T. & Hara H. (2011). Effect of hypoxia mimetic cobalt chloride on the expression of extracellular-superoxide dismutase in retinal pericytes. *Biol Pharm Bull.* 34(8):1297-1300.
- Appelhoff R. J., Tian Y. M., Raval R. R., Turley H., Harris A. L., Pugh C. W., Ratcliffe P. J. & Gleadle J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 279(37):38458-38465.
- Arsham A. M., Howell J. J. & Simon M. C. (2003). A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem.* 278(32):29655-29660.
- Banasiak K. J., Xia Y. & Haddad G. G. (2000). Mechanism's underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 62(3):215-249.
- Befani C., Mylonis I., Gkotinakou I. M., Georgoulas P., Hu C. J., Simos G. & Liakos P. (2013). Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 45(11):2359-2368.
- Belcher J. D., Beckman J. D., Balla G., Balla J. & Vercellotti G. (2010). Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal.* 12(2):233-248.
- Bell E. L., Klimova T. A., Eisenbart J., Moraes C. T., Murphy M. P., Budinger G. R. & Chandel N. S. (2007). The Oo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell. Biol.* 177(6):1029-1036.
- Bergeron M., Ferriero D. M. & Sharp F. R. (1998). Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 105(2):181-194.
- Bickler P. E. & Donohoe P. H. (2002). Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 205(Pt 23):3579-3586.
- Bindu S., Pal C., Dey S., Goyal M., Alam A., Iqbal M. S., Dutta S., Sarkar S., Kumar R., Maity P., & Bandyopadhyay U. (2011). Translocation of heme oxygenase-1 to mitochondria is a novel cytoprotective mechanism against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury. *J Biol Chem.* 2011 Nov 11;286(45):39387-402.
- Biswas C., Shah N., Muthu M., La P., Fernando A. P., Sengupta S., Yang G. & Dennery P. A. (2014). Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J Biol Chem.* 289(39):26882-26894.

- Boehning D., Moon C., Sharma S., Hurt K. J., Hester L. D., Ronnett G. V., Shugar D. & Snyder S. H. (2003). Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *40(1):129-137.*
- Borcar A., Menze M. A., Toner M. & Hand S. C. (2013). Metabolic preconditioning of mammalian cells: mimetic agents for hypoxia lack fidelity in promoting phosphorylation of pyruvate dehydrogenase. *Cell Tissue Res. 351(1): 99-106.*
- Brahimi-Horn M. C. & Pouyssegu J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett. 581(19): 3582-3591.*
- Bracken C. P., Whitelaw M. L. & Peet D. J. (2003). The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci. 60(7): 1376-1393.*
- Brahimi-Horn M. C., Chiche J. & Pouyssegu J. (2007). Hypoxia signaling control metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol. 19(2): 223-229.*
- Brundin T. (1966). Studies on the preaortal paraganglia of newborn rabbits.. *Acta Physiol Scand Suppl.; 290: 1-54.*
- Bunn H. F., Gu J., Huang L. E., Park J. W. & Zhu H. (1998). Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol. 201(Pt 8): 1197-1201.*
- Carreau A., El Hafny-Rahbi B., Matejuk A., Grillon C. & Kieda C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell. Mol. Med. 15(6): 1239-53.*
- Cash T. P., Pan Y. & Simon M. C. (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med. 43(9): 1219-1225.*
- Chachami G., Simos G., Hatziefthimiou A., Bonanou S., Molyvdas P. A. & Paraskeva E. (2004). Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol. 31(5): 544-551.*
- Chan S. Y., Zhang Y. Y., Hemann C., Mahoney C. E., Zweier J. L. & Loscalzo J. (2009). MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab. 10(4): 273-284.*
- Chandel N. S. & Budinger G. R. (2007). The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med. 42(2): 165-174.*
- Chau L. Y. (2015). Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy. *J Biomed Sci. 21; 22:22.*
- Choi J. H., Cho H. K., Choi Y. H. & Cheong J. (2009). Activating transcription factor 2 increases

- transactivation and protein stability of hypoxia-inducible factor 1 α in hepatocytes. *Biochemical Journal* 424(2):285-296.
- Cleeter M. W., Cooper J. M., Darley-USmar V. M., Moncada S. & Schapira A. H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345(1):50-54.
- Conforti L. & Millhorn D. E. (1997). Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K⁺ channel in rat PC12 cells by hypoxia. *J Physiol.* 502 (Pt 2):293-305.
- Cui J., Yang H., & Lee U. S. (2009). Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci.* 66(5):852-875.
- Czyzyk-Krzeska M. F., Furnari B. A., Lawson E. E. & Millhorn D. E. (1994). Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem.* 269(1):760-764.
- Dengler V. L., Galbraith M. D. & Espinosa J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 49(1):1-15.
- Dennery P. A. (2000). Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr. Top. Cell Regul.* 36:181-199.
- Dennery P. A. (2014). Signaling function of heme oxygenase proteins. *Antioxid Redox Signal.* 10;20(11):1743-1753.
- Doré S., Sampei K., Goto S., Alkayed N. J., Guastella D., Blackshaw S., Gallagher M., Traystman R. J., Hurn P. D., Koehler R. C. & Snyder S. H. (1999). Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Mol Med.* 5:656-663.
- Edinger A. L. & Thompson C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16(6):663-9.
- Erecinska M. & Silver I. A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir. Physiol* 2001. 128(3):263-276.
- Evinger M. J., Cikos S., Nwafor-Anene V., Powers J. F. & Tischler A. S. (2002). Hypoxia activates multiple transcriptional pathways in mouse pheochromocytoma cells. *Ann N Y Acad Sci.* 971:61-5.
- Exner M., Minar E., Wagner O. & Schillinger M. (2004). The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med.* 37(8):1097-1104.
- Fandrey J. & Genius J. (2000). Reactive oxygen species as regulators of oxygen dependent gene expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 475:153-159.

Fedele A. O., Whitelaw M. L. & Peet D. J. (2002). Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Molecular Interventions*. 2(4):229-243.

Fruehauf J. P & Meyskens F. L Jr. (2007). Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clin. Cancer Res*. 13(3):789-94.

Fujiwara S., Nakagawa K., Harada H., Nagato S., Furukawa K., Teraoka M., Seno T., Oka K., Iwata S., & Ohnishi T. (2007). Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int. J. Oncol*. 30(4):793-802.

Gilany K. & Vafakhah M. (2010). Hypoxia: a Review. *Journal of Paramedical Sciences*. 1(2)43-60.

Gottlieb Y., Truman M., Cohen L. A., Leichtmann-Bardoogo Y. & Meyron-Holtz E. G. (2012). Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica*, 97(10):1489-1493.

.Govindaraju V., Teoh H, Hamid Q., Cernacek P. & Ward M. E. (2005). Interaction between heme oxygenase-2 and endothelin-1 in altered aortic reactivity after hypoxia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H962-H970.

Graeber T. G., Peterson J. F., Tsai M., Monica K., Fornace A. J. Jr. & Giaccia A. J. (1994). Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol. Cell Biol*. 14(9):6264-6277

Greijer A. E. & van der W. E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J. Clin. Pathol*. 57(10):1009-1014.

Guzy R. D. & Schumacker P. T. (2006). Oxygen sensing by mitochondrial at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol*. 91(5):807-819.

Haga Y., Tempero M. A. & Zetterman R. K. (1996). Unconjugated bilirubin inhibits in vitro major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1316 (1):29-34.

Han F., Takeda K., Ono M., Date F., Ishikawa K., Yokoyama S., Shinozawa Y, Furuyama K & Shibahara S. (2010). Hypoxemia induces expression of heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2 proteins in the mouse myocardium. *J Biochem*. 147(1):143-51

Hardie D. G. (2003). Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 144(12):5179-5183.

Hartney T., Birari R., Venkataraman S., Villegas L., Martinez M., Black S. M., Stenmark K. R. & Nozik-Grayck E. (2011). Xanthine oxidase-derived ROS upregulate Egr-1 via ERK1/2 in PA smooth muscle cells; model to test impact of extracellular ROS in chronic hypoxia. *PLoS One*.6(11):e27531.

- Harvey A. J., Kind K. L. & Thompson J. G. (2004). Effect of the oxidative phosphorylation uncoupler 2, 4-dinitrophenol on hypoxia-inducible factor-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Reprod Fertil Dev.* 16(7):665-673.
- Hayashi S., Omata Y., Sakamoto H., Higashimoto Y., Hara T., Sagara Y., & Noguchi M. (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene.* 336(2):241-50.
- He J. Z., Ho J. J., Gingerich S., Courtman D. W., Marsden P. A. & Ward M. E. (2010). Enhanced translation of heme oxygenase-2 preserves human endothelial cell viability during hypoxia. *J Biol Chem.* 285(13):9452-61.
- Hellen C. U. & Sarnow P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15(13):1593-1612.
- Hensley K., Robinson K. A., Gabbita S. P., Salsman S. & Floyd R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28(10):1456-1462.
- Hervonen A. & Korkala O. (1972). The effect of hypoxia on the catecholamine content of human fetal abdominal paraganglia and adrenal medulla. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 51(1):17-24.
- Hewitson K. S., Schofield C. J. (2004). The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug Discov Today.* 9(16):704-711.
- Hewitson K. S., McNeill L. A. & Schofield C. J. (2004). Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer. *Curr Pharm Des.* 10(8):821-833.
- Hirsilä M., Koivunen P., Xu L., Seeley T., Kivirikko K. I. & Myllyharju J. (2005). Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *FASEB J.* 2005 (10):1308-1310.
- Holmquist-Mengelbier L., Fredlund E., Löfstedt T., Noguera R., Navarro S., Nilsson H., Pietras A., Vallon-Christersson J., Borg A., Gradin K., Poellinger L. & Pahlman S. (2006). Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell.* 10(5):413-423.
- Hon T., Hach A., Lee H. C., Cheng T. & Zhang L. (2000). Functional analysis of heme regulatory elements of the transcriptional activator Hap1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273(2):584-591.
- Hori R., Kashiba M., Toma T., Yachie A., Goda N., Makino N., Soejima A., Nagasawa T., Nakabayashi K. & Suematsu M. (2002). Gene transfection of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *J Biol Chem.* 277(12):10712-10718.
- Hu C. J., Sataur A., Wang L., Chen H. & Simon M. C. (2007). The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha. *Mol. Biol. Cell.*

18(11):4528-4542.

Huang B. W., Miyazawa M. & Tsuji Y. (2014). Distinct regulatory mechanisms of the human ferritin gene by hypoxia and hypoxia mimetic cobalt chloride at the transcriptional and post-transcriptional levels. *Cell Signal*. 26(12):2702-2709.

Immenschuh S. & Ramadori G. (2000). Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol*. 60(8):1121-1128.

Jansen T. & Daiber A. (2012). Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase?. *Front Pharmacol*. 16;3:30.

Jansen T., Hortmann M., Oelze M., Opitz B., Steven S., Schell R., Knorr M., Karbach S., Schuhmacher S., Wenzel P., Munzel T., & Daiber A. (2010). Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1: evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. *J Mol Cell Cardiol*. 49(2):186-195.

Jeon E.S., Shin J. H., Hwang S. J., Moon G. J., Bang O. Y. & Kim H. H. (2014). Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through upregulation of microRNA-124a. *Biochem Biophys Res Commun*. 444(4):581-587.

Jung N. H., Kim H. P., Kim B. R., Cha S. H., Kim G. A., Ha H., Na Y. E. & Cha Y. N. (2003). Evidence for heme oxygenase-1 association with caveolin-1 and -2 in mouse mesangial cells. *IUBMB Life*. 55(9):525-532.

Kaczmarek M., Cachau R. E., Topol I. A., Kasprzak K. S., Ghio A. & Salnikow K. (2009). Metal ions-stimulated iron oxidation in hydroxylases facilitates stabilization of HIF-1 alpha protein. *Toxicol Sci*. 107(2):394-403.

Kang K., Peng X., Zhang X., Wang Y., Zhang L., Gao L., Weng T., Zhang H., Ramchandran R., Raj J. U., Gou D. & Liu L. (2013). MicroRNA-124 suppresses the transactivation of nuclear factor of activated T cells by targeting multiple genes and inhibits the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 288(35):25414-25427.

Kato K., Yamaguchi-Yamada M. & Yamamoto Y. (2010). Short-term hypoxia increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in rat carotid body. *J Histochem Cytochem*. 58(9):839-846.

Keith B., Johnson R. S. & Simon M. C. (2012). HIF1 alpha and HIF2 alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer*. 12(1):9-22.

Kikuchi G., Yoshida T. & Noguchi M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 338(1):558-67.

Kim Y. M., Chung H. T., Simmons R. L. & Billiar T. R. (2000). Cellular non-heme iron content is a

- determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* 275(15):10954-61.
- Kim J. W., Tchernyshyov I., Semenza G. L. & Dang C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3(3):177-185.
- Kinobe R. T., Vlahakis J. Z., Vreman H. J., Stevenson D. K., Brien J. F., Szarek W. A., & Nakatsu K (2006) Selectivity of imidazole-dioxolane compounds for in vitro inhibition of microsomal haem oxygenase isoforms. *Br J Pharmacol* 147: 307
- Kitagishi Y., Kobayashi M., Kikuta K. & Matsuda S. (2012). Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. *Depress Res Treat.* 752563.
- Koh M. Y., Lemos R. Jr., Liu X. & Powis G. (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 alpha- to HIF-2 alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 71(11):4015-4027.
- Koh M. Y. & Powis G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 37(9):364-372.
- Koh M. Y., Spivak-Kroizman T. R. & Powis G. (2008). HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci.* 33(11):526-534.
- Koivunen P., Hirsilä M., Günzler V., Kivirikko K. I. & Myllyharju J. (2004) Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J. Biol. Chem.* 279(11):9899-9904.
- Komar A. A. & Hatzoglou M. (2011). Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle.* 10(2): 229–240.
- Kotake-Nara E., Takizawa S., Quan J., Wang H. & Saida K. (2005). Cobalt chloride induces neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC-12 cells through regulation of endothelin-2/vasoactive intestinal contractor. *J Neurosci Res.* 81(4):563-571.
- Kumar S & Bandyopadhyay U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 157(3):175-88.
- Lee S. H., Lee M. Y. & Han H. J. (2008). Short-period hypoxia increases mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of arachidonic acid and PI3K/Akt signalling pathways. *Cell Prolif.* 41(2):230-247.
- Lee H. C., Hon T., Lan C. & Zhang L. (2003). Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the heme activator protein Hap1. *Mol. Cell. Biol.* 23(16):5857-5866.

- Lee K., Roth R. A. & LaPres J. J. (2007). Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol. Ther* 113(2):229-46.
- Lendahl U., Lee K. L., Yang H. & Poellinger L. (2009). Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nat Rev Genet*. 10(12):821-832.
- Lerner-Marmarosh N., Shen J., Torno M. D., Kravets A., Hu Z., & Maines M. D. (2005). Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(20):7109-7114.
- Li J., Bosch-Marce M., Nanayakkara A., Savransky V., Fried S. K., Semenza G. L. & Polotsky V. Y. (2006). Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1 α . *Physiol Genomics*. 25(3):450-457.
- Lin Q., Weis S., Yang G., Weng Y. H., Helston R., Rish K., Smith A., Bordner J., Polte T., Gaunitz F. & Dennery P. A. (2007). Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem*. 282(28):20621-20633.
- Lin Q. S., Weis S., Yang G., Zhuang T., Abate A. & Dennery P. A. (2008). Catalytic inactive heme oxygenase-1 protein regulates its own expression in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 44(5):847-855.
- Linnenbaum M., Busker M., Kraehling J. R. & Behrends S. (2012). Heme oxygenase isoforms differ in their subcellular trafficking during hypoxia and are differentially modulated by cytochrome P450 reductase. *PLoS One*. 2012;7(4):e35483.
- Liu L. & Simon M. C. (2004). Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol Ther*. 3(6):492-497.
- López-Barneo J. (1996). Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions. *Trends Neurosci*. 19(10):435-40.
- López-Barneo J., Pardal R. & Ortega-Saenz P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu. Rev. Physiol*. 63:259-287.
- Maines M. D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37:517-554.
- Maines M. D. (2000). The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Molec Biol*. 46(3):573-585.
- Mancuso C & Barone E. (2009). The heme oxygenase/biliverdin reductase pathway in drug research and development. *Curr Drug Metab*. 10(6):579-94.

Marti H. H., Jung H. H., Pfeilschifter J. & Bauer C. (1994). Hypoxia and cobalt stimulate lactate dehydrogenase (LDH) activity in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 429(2):216-222.

Mason S. D., Rundqvist H., Papandreou I., Duh R., McNulty W. J., Howlett R. A., Olfert I. M., Sundberg C. J., Denko N. C., Poellinger L. & Johnson R. S. (2007). HIF-1 alpha in endurance training: suppression of oxidative metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293(5):R2059-R2069.

McClintock D. S., Santore M. T., Lee V. Y., Brunelle J., Budinger G. R., Zong W. X., Thompson C. B., Hay N. & Chandel N. S. (2002). Bcl-2 Family Members and Functional Electron Transport Chain Regulate Oxygen Deprivation-Induced Cell Death. *Mol. Cell Biol.* 22(1):94-104.

McCoubrey W. K. Jr. & Maines M. D. (1993). Domains of rat heme oxygenase-2. The amino terminus and histidine 151 are required for catalytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 302(2):402-408.

McCoubrey W. K. Jr., Eke B. & Maines M. D. (1995). Multiple transcripts encoding HO- 2 in rat testis: Developmental and cell specific regulation of transcripts and protein. *Biol. Reprod.* 53(6):1330-1338.

Minchenko A. & Caro J. (2000). Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsive element. *Mol Cell Biochem.* 208(1-2):53-62.

Mole D. R., Schlemminger I., McNeill L. A., Hewitson K. S., Pugh C. W., Ratcliffe P. J. & Schofield C. J. (2003). 2-oxoglutarate analogue inhibitors of HIF prolyl hydroxylase. *Bioorg Med Chem Lett.* 13(16):2677-2680.

Mole D. R., Blancher C., Copley R. R., Pollard P. J., Gleadle J. M., Ragoussis J. & Ratcliffe P. J. (2009). Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1a and HIF-2a DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem.* 284(25):16767-16775.

Muñoz-Sánchez J. (2013). Efecto de la isquemia y la reperfusión en la expresión de la hemoxigenasa-2 en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral. Tesis Lic. Químico Farmacéutico Biológico. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.

Muñoz-Sánchez J., Chánez-Cárdenas M. E. (2014). A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxid Med Cell Longev.* 604981.

Otterbein L. E., Bach F. H., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis R. J., Flavell R. A. & Choi A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 6(4):422-428.

Pagé E. L., Robitaille G. A., Pouysségur J. & Richard D. E. (2002). Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem.* 277(50):48403-48409.

- Papandreou I., Cairns R. A., Fontana L., Lim A. L. & Denko N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3(3):187-97.
- Parfenova H. & Leffler C. W. (2008). Cerebroprotective functions of HO-2. *Curr Pharm Des.* 14:443-453.
- Piret J. P., Mottet D., Raes M. & Michiels C. (2002). Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem. Pharmacol.* 64(5-6):889-892.
- Pouyssegur J., Dayan F. & Mazure N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 441(7092):437-443.
- Pouyssegur J. & Mechta-Grigoriou F. (2006). Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol. Chem.* 387(10-11):1337-1346.
- Puissegur M. P., Mazure N. M., Bertero T., Pradelli L., Grosso S., Robbe-Sermesant K., Maurin T., Lebrigand K., Cardinaud B., Hofman V., Fourre S., Magnone V., Ricci J. E., Pouyssegur J., Gounon P., Hofman P., Barbry P. & Mari B. (2010). miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ.* 18(3):465-478.
- Qiao H., Li L., Qu Z. C. & May J. M. (2009). Cobalt-induced oxidant stress in cultured endothelial cells: prevention by ascorbate in relation to HIF-1 α . *Biofactors.* 35(3):306-313.
- Ragsdale S. W. & Yi L. (2011). Thiol/Disulfide Redox Switches in the Regulation of Heme Binding to Proteins. *Antioxidants & redox signaling.* 14(6):1039-1047.
- Raju V. S., McCoubrey Jr. W. K. & Maines M. D. (1997). Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim Biophys Acta.* 1351(1-2):89-104.
- Rotenberg M. O. & Maines M. D. (1991). Characterization of a cDNA encoding rabbit brain heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isozymes: possible heme-binding site? *Arch. Biochem. Biophys.* 290(2):336-344.
- Ryter S. W. & Tyrrell R. M. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 15; 28(2):289-309.
- Salnikow K., Donald S. P., Bruick R. K., Zhitkovich A., Phang J. M. & Kasprzak K. S. (2004). Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem.* 24; 279(39):40337-40344.
- Sanchez M., Galy B., Muckenthaler M. U. & Hentze M. W. (2007). Iron-regulatory proteins limit

- hypoxia-inducible factor-2 alpha expression in iron deficiency. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(5):420-426.
- Sauer H., Wartenberg M. & Hescheler J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol. Biochem.* 11(4):173-186.
- Schipper H. M. (2000). Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp. Gerontol.* 35(6-7):821-30.
- Schipper H. M. (2004). Brain iron deposition and the free radical mitochondrial theory of ageing. *Ageing Res Rev.* 3(3):265-301.
- Schödel J., Oikonomopoulos S., Ragoussis J., Pugh C. W., Ratcliffe P. J. & Mole D. R. (2011). High resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood.* 117(23):e207-17.
- Sedlak T. W & Snyder S. H. (2004). Review Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics.* 113(6):1776-82.
- Semenza G. L., Roth P. H., Fang H. M. & Wang G. L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 269(38):23757-23763.
- Semenza G. L. (1999). Perspectives on oxygen sensing. *Cell.* 98(3):281-284.
- Semenza G. L. (2001). HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.* 107(1):1-3.
- Semenza G. L., Shimoda L. A. & Prabhakar N. R. (2006). Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp.* 272:2-8; discussion 8-14, 33-6.
- Sendoel A. & Hengartner M. O. (2014). Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology (Bethesda).* 29(3):168-176.
- Seta K. A., Yuan Y., Spicer Z., Lu G., Bedard J., Ferguson T. K., Pathrose P., Cole-Strauss A., Kaufhold A. & Millhorn D. E. (2004). The role of calcium in hypoxia-induced signal transduction and gene expression. *Cell Calcium.* 36(3-4):331-40.
- Shan Y., Lambrecht R. W., Donohue S. E. & Bonkovsky H. L. (2006). Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* 20(14):2651-2653.
- Shaw K., Montague W. & Pallot D. J. (1989). Biochemical studies on the release of catecholamines from the rat carotid body in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1013(1):42-46.
- Sluimer J. C., Gasc J. M., van Wanroij J. L., Kisters N., Groeneweg M., Sollewijn G., Cleutjens J. P, van den Akker L. H., Corvol P., Wouters B. G., Daemen M. J. & Bijmens A. P. (2008). Hypoxia. Hypoxia-

inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51(13):1258-65.

Sodhi K., Inoue K., Gotlinger K. H., Canestraro M., Vanella L., Kim D. H., Manthati V. L., Koduru S. R., Falck J. R., Schwartzman M. L. & Abraham N. G. (2009). Epoxyeicosatrienoic acid agonist rescues the metabolic syndrome phenotype of HO-2-null mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 331(3):906-16.

Spicer Z. & Millhorn D. E. (2003). Oxygen Sensing in Neuroendocrine Cells and Other Cell Types: Pheochromocytoma (PC12) Cells as an Experimental Model. *Endocr Pathol.* 14(4):277-291.

Sudarshan S., Sourbier C., Kong H. S., Block K., Valera Romero V. A., Yang Y., Galindo C., Mollapour M., Scroggins B., Goode N., Lee M. J., Gourlay C. W., Trepel J., Linehan W. M. & Neckers L. (2009). Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1 α stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Mol Cell Biol.* 29(15):4080-4090.

Sun Y., Rotenberg M. O. & Maines M. D. (1990). Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain: Two HO-2 mRNAs are detected. *J Biol Chem.* 265(14):8212-8217.

Taira J., Sugishima M., Kida Y., Oda E., Noguchi M., & Higashimoto Y. (2011). Caveolin-1 is a competitive inhibitor of heme oxygenase-1 (HO-1) with heme: identification of a minimum sequence in caveolin-1 for binding to HO-1. *Biochemistry.* 50(32):6824-6831.

Taylor C. T. (2008). Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem. J.* 409(1):19-26.

Triantafyllou A., Liakos P., Tsakalof A., Georgatsou E., Simos G. & Bonanou S. (2006). Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radic Res.* 40(8):847-856.

Uchida T., Rossignol F., Matthay M. A., Mounier R., Couette S., Clottes E. & Clerici C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J. Biol. Chem.* 279(15):14871-14878.

Vitek L. & Schwertner H. A. (2007). The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress- mediated diseases. *Adv.Clin.Chem.* 43, 1–57

Wagener F. A., Volk H. D., Willis D., Abraham N. G., Soares M. P., Adema G. J. & Figdor C. G. (2003). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev.* 55(3):551-71.

Ward J. P. (2008). Oxygen sensors in context. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 1-14.

Warnecke C., Zaborowska Z., Kurreck J., Erdmann V. A., Frei U., Wiesener M. & Eckardt K. U. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by

the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* 18(12):1462-4.

Webster K. A., Discher D. J., Kaiser S., Hernandez O., Sato B. & Bishopric N. H. (1999). Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J. Clin. Invest.* 104(3):239-52.

Wheaton W. W. & Chandel N. S. (2011). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300(3):C385-93.

Wilks A., Ortiz de Montellano P. R., Sun J. & Loehr T. M. (1996). Heme oxygenase (HO-1): His-132 stabilizes a distal water ligand and assists catalysis. *Biochemistry.* 35(3):930-936.

Wu T. W., Fung K. P. & Yang C. C (1994). Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox. *LifeSci.* 54(25):477-481.

Wu I. C., Ohsawa I., Fuku N. & Tanaka M. (2010). Metabolic analysis of ¹³C-labeled pyruvate for noninvasive assessment of mitochondrial function. *Ann NY Acad Sci.* 1201:111-120.

Yi L. & Ragsdale S. W. (2007). Evidence that the heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 serve as a thiol/disulfide redox switch regulating heme binding. *J Biol Chem.* 282(29):21056-21067.

Yi L., Jenkins P. M., Leichert L. I., Jakob U., Martens J. R., & Ragsdale S. W. (2009). The heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 form a thiol/disulfide redox switch that responds to the cellular redox state. *J Biol Chem.* 284(31):20556-20561.

Young R. M., Wang S. J., Gordan J. D., Ji X., Liebhaber S. A. & Simon M. C. (2008). Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism. *J Biol Chem.* 283(24):16309-16319.

Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T. & Millhorn D. E. (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J Biol Chem.* 278(18):15911-15916.

Zauner A., Daugherty W. P., Bullock M. R. & Warner D. S. (2002). Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery;* 51(2):289-301.

Zhang Z., Yan J., Chang Y., ShiDu Yan S. & Shi H. (2011). Hypoxia inducible factor-1 as a target for neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem.* 18(28):4335-4343.

Zhang Y., Furuyama K., Kaneko K., Ding Y., Ogawa K., Yoshizawa M., Kawamura M., Takeda K., Yoshida T. & Shibahara S. (2006). Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. *FEBS J.*

273(14):3136-47.

Zhang S., Yang C., Yang Z., Zhang D., Ma X., Mills G. & Liu Z. (2015). Homeostasis of redox status derived from glucose metabolic pathway could be the key to understanding the Warburg effect. *Am J Cancer Res.* 5(3):928-944.

Zhu W. H., Conforti L., Czyzyk-Krzeska M. F. & Millhorn D. E. (1996). Membrane depolarization in PC-12 cells during hypoxia is regulated by an O₂-sensitive K⁺ current. *Am J Physiol.* 271(2 Pt 1):C658-C665.

Zhu W. H., Conforti L. & Millhorn D. E. (1997). Expression of dopamine D2 receptor in PC-12 cells and regulation of membrane conductances by dopamine. *Am J Physiol.* 273(4 Pt 1):C1143-C1150.