

Tesis Doctoral

Adaptación del miocardio de rata a la hipoxia hipobárica crónica. Actividad mecánica y mecanismos celulares

La Padula, Pablo Hugo

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

La Padula, Pablo Hugo. (2010). Adaptación del miocardio de rata a la hipoxia hipobárica crónica. Actividad mecánica y mecanismos celulares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

La Padula, Pablo Hugo. "Adaptación del miocardio de rata a la hipoxia hipobárica crónica. Actividad mecánica y mecanismos celulares". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

**ADAPTACION DEL MIOCARDIO DE RATA A LA HIPOXIA HIPOBARICA
CRONICA. ACTIVIDAD MECANICA Y MECANISMOS CELULARES**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Ciencias Biológicas

Pablo Hugo La Padula

Director de Tesis: Dra. Lidia E Costa

Consejero de Estudios: Prof. Dr. Osvaldo Uchitel

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de
Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2010

ADAPTACION DEL MIOCARDIO DE RATA A LA HIPOXIA HIPOBARICA CRONICA. ACTIVIDAD MECANICA Y MECANISMOS CELULARES

La actividad mecánica y su respuesta a la hipoxia/reoxigenación fue estudiada en músculos papilares de ventrículo izquierdo de ratas sometidas a hipoxia hipobárica (53.8 kPa) durante varios períodos y en sus controles (101.3 kPa). Un retardo en la declinación de la contractilidad asociada a la edad y una mayor recuperación post-hipoxia se desarrollaron durante la aclimatización. Entre las enzimas mitocondriales analizadas en ventrículo izquierdo, se encontró una regulación específica de la mtNOS por la hipoxia. Para evaluar la regresión de estos efectos durante el retorno a la normoxia, se investigó la contractilidad en respuesta al calcio y a la hipoxia/reoxigenación y la actividad y expresión de mtNOS al cabo de tres períodos de desaclimatización. La actividad mecánica basal, la recuperación post-hipoxia, y la actividad de mtNOS declinaron linealmente, con un tiempo medio de 5.9, 5.3 y 5.0 meses, respectivamente. La expresión de mtNOS, la cual reaccionó con anticuerpos iNOS y nNOS, mostró un comportamiento similar. Se halló una correlación bifásica entre la actividad de mtNOS y la contractilidad, resultando ésta máxima a $0.70-0.74 \text{ nmol NO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$. Este modelo experimental proveería el efecto más persistente conocido actualmente sobre la preservación de la función miocárdica y la tolerancia a la hipoxia. Los resultados sugieren la participación de la mtNOS en el mecanismo involucrado.

Palabras claves: Hipoxia hipobárica crónica; aclimatización a la altura; contractilidad cardíaca: hipoxia-reoxigenación; óxido nítrico sintasa mitocondrial

ADAPTATION OF RAT MYOCARDIUM TO CHRONIC HYPOBARIC HYPOXIA: MECHANICAL ACTIVITY AND CELLULAR MECHANISMS

Parameters of contractile function and their response to hypoxia/reoxygenation were measured in papillary muscles isolated from left ventricle of rats submitted to hypobaric hypoxia (53.8 kPa) for several periods and of their controls (101.3 kPa). Retardation of age-associated decline in mechanical activity and improved post-hypoxic recovery developed during acclimatization. Among left ventricle mitochondrial enzymes analyzed, specific upregulation of nitric oxide synthase (mtNOS) by hypoxia was found. To evaluate the time course of regression of these effects upon deacclimatization, a group of 5 mo-acclimatized rats were returned to normoxic conditions similar to controls. After three time-periods, contractile function in response to calcium and to hypoxia/reoxygenation and mtNOS activity and expression were determined. All measured parameters showed linear decline during deacclimatization, with mean half-time of 5.9, 5.3, and 5.0 mo, for basal mechanical activity, post-hypoxic recovery, and mtNOS activity, respectively. The expression of mtNOS, which reacted with iNOS and nNOS antibodies, showed similar behavior. The correlation of mtNOS activity with muscle contractility sustained a biphasic modulation, showing optimal performance at 0.70-0.74 nmol NO.min⁻¹.mg protein⁻¹. This experimental model would provide the most persistent effect known at present on preservation of myocardial function and improved tolerance to O₂ deprivation. Results strongly support the putative role of mtNOS in the mechanism involved.

Key words: chronic hypobaric hypoxia; acclimatization to high altitude; heart contractility; hypoxia-reoxygenation; mitochondrial nitric oxide synthase.

Agradecimientos

A la Dra. Lidia E. Costa por quien, gracias a su capacidad científica e intelectual de excelencia y a su inestimable dedicación, ayuda y paciencia, esta tesis fue posible.

A la memoria del Prof. Dr. Alberto C. Taquini, quien me presentó a la Dra Lidia E. Costa, y sentamos juntos las bases de lo que sería luego de su fallecimiento el delineamiento de este proyecto.

Al Prof. Dr. José Milei quien, como Director del ININCA, apoyó incondicionalmente el desarrollo de esta Tesis.

Al Prof. Dr. Alberto Boveris por su aporte intelectual y material durante la primera etapa de esta tesis.

A las Dras. Juanita Bustamante y Analía Czerniczyniec por su gran amabilidad y ayuda en las cuestiones más diversas del armado de la tesis y por enseñarme metodologías experimentales fundamentales para el presente trabajo.

A la memoria del Dr. Carlos M. Taquini y al Dr. Hernán Gómez LLambí, con quienes comencé mi formación en la fisiología cardíaca.

A la Med. Vet. Nora Paglia y a Pablo Cepero, por su inestimable ayuda como bioteristas del ININCA en el dificultoso mantenimiento de los animales en condiciones prolongadas de hipoxia crónica.

A mis colegas del ININCA, en particular a las Dras. Patricia Bonazzola y Angélica Muller, siempre dispuestas a enseñarme y ayudarme en todo lo posible.

A todo el personal del ININCA, particularmente a la Lic. Patricia Alegre por su paciencia, voluntad y eficacia y a Nelly Montiel por su buena voluntad y afecto.

A las Dras. Laura Valdéz y Tamara Zaobornyj, con quienes realicé los estudios bioquímicos de la primera etapa de la tesis.

A toda la gente de la Cátedra de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que aportó los fondos necesarios para el desarrollo de esta investigación.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, la cual a pesar de las innumerables condiciones adversas mantiene un nivel de excelencia académico, formando recursos científicos calificados a nivel internacional y constituyéndose en un referente científico en América Latina.

A la Universidad de Buenos Aires, por continuar brindando una educación pública de alta calidad, sin la cual esta tesis no hubiera sido posible.

Dedicatorias

Dedico esta tesis a

 Mi hija Renata, quien nació cuando comenzaba la tesis, potenciando mi felicidad y energía en todos los planos que pudiera imaginar.

 Mi mujer Silvana, por su amor, gentileza, dedicación y paciencia durante estos años de doctorando.

 Mis padres, quienes siempre me brindaron su amor y estimularon incondicionalmente en mí el saber y el conocimiento.

 Mi hermano Mauro, quien me hace sentir que un mundo mejor es posible.

 Mi abuelo el ingeniero, quien iluminó pueblos cordilleranos y cuyo ingenio aún hoy continúa protegiendo sus cultivos del granizo.

 Todos mis amigos por estimular y sobrellevar mi obsesión por la hipoxia hipobárica crónica durante tantos años.

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1. Adaptación a la hipoxia hipobárica	1
1.1.1. Aclimatización	4
1.1.2. Efectos cardioprotectores de la hipoxia	7
1.2. Actividad mecánica del miocardio. Acoplamiento mecano-energético	11
1.2.1. Mecanismo de la contracción muscular	13
1.2.1.1. Rol del ATP en la contractilidad miocárdica	15
1.2.1.2. Rol del Ca ²⁺ en la contractilidad miocárdica	16
1.2.2. Energética de la contracción miocárdica	17
1.2.2.1. Producción de ATP por las mitocondrias	21
1.2.2.2. Producción de radicales libres del oxígeno por la cadena respiratoria mitocondrial	24
1.3. Rol del óxido nítrico en la adaptación del miocardio a la hipoxia	25
1.3.1. Mecanismos bioquímicos de acción del óxido nítrico (NO)	27
1.3.2. Oxido nítrico sintasas (NOS)	28
1.3.3. Oxido nítrico y sistema cardiovascular	31
1.3.3.1. Efecto del NO sobre la contractilidad cardíaca	32
1.3.3.2. Rol del NO en la protección del miocardio	33
1.4. Finalidades de esta investigación	35

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Hipoxia hipobárica crónica	38
2.2. Determinación del peso corporal	40
2.3. Determinación del hematocrito	41
2.4. Extracción del corazón funcional	42

2.5. Disección de los músculos papilares del ventrículo izquierdo	42
2.6. Disección de los ventrículos	44
2.7. Contracción isométrica del músculo papilar aislado	44
2.7.1. Montaje de los músculos papilares aislados	46
2.7.2. Estimulación eléctrica del preparado	46
2.7.3. Longitud máxima de estiramiento del músculo	46
2.7.4. Registro de la actividad mecánica muscular	49
2.8. Determinación de la actividad mecánica basal	51
2.9. Respuesta a la hipoxia y reoxigenación	51
2.10. Respuesta al calcio	52
2.11. Aislamiento de mitocondrias	52
2.12. Determinación de la producción de NO	53
2.13. Determinación de la actividad de NADH-citocromo c reductasa	56
2.14. Determinación de la actividad de citocromo oxidasa	56
2.15. Determinación del contenido de citocromos	56
2.16. Expresión de proteínas por Western Blot	58
2.17. Análisis estadístico	59

3. RESULTADOS

3.1. Efectos de la hipoxia hipobárica crónica durante la maduración y el envejecimiento. Actividad mecánica del miocardio

3.1.1. Parámetros biológicos	60
3.1.2. Parámetros de contractilidad basal	61
3.1.3. Hipoxia y reoxigenación	64

3.2. Desaclimatización. Duración de la protección conferida al miocardio por la hipoxia hipobárica crónica

3.2.1. Parámetros biológicos	69
3.2.2. Parámetros de contractilidad basal. Respuesta al calcio	71
3.2.3. Hipoxia y reoxigenación	73

3.3. Mecanismos celulares. Participación de la mtNOS en la protección

conferida al miocardio por la hipoxia hipobárica crónica	
3.3.1. Producción de NO por mitocondrias cardíacas	74
3.3.2. Efecto de la hipoxia hipobárica y del envejecimiento sobre la producción mitocondrial de NO	76
3.3.3. Efecto de la hipoxia hipobárica y del envejecimiento sobre la cadena respiratoria mitocondrial	77
3.3.4. Producción de NO por mitocondrias cardíacas durante la desaclimatización	79
3.3.5. Expresión de NOS en mitocondrias cardíacas	80
3.3.6. Producción mitocondrial de NO y actividad mecánica del ventrículo izquierdo durante la maduración y el envejecimiento bajo condiciones de hipoxia y de normoxia	81
3.3.7. Correlación entre la producción mitocondrial de NO y la actividad mecánica del ventrículo izquierdo durante la aclimatización y la desaclimatización	86

4. DISCUSION

4.1. Efectos de la hipoxia hipobárica crónica durante la maduración y el envejecimiento. Actividad mecánica del miocardio	
4.1.1. Parámetros biológicos	88
4.1.2. Parámetros de contractilidad basal	90
4.1.3. Hipoxia y reoxigenación	91
4.2. Desaclimatización. Duración de la protección conferida al miocardio por la hipoxia hipobárica crónica	
	93
4.3. Mecanismos celulares. Participación de la mtNOS en la protección conferida al miocardio por la hipoxia hipobárica crónica	
4.3.1. Producción de NO por mitocondrias cardíacas	94
4.3.2. Efecto de la hipoxia hipobárica y del envejecimiento sobre la	

producción mitocondrial de NO	95
4.3.3. Efecto de la hipoxia hipobárica y del envejecimiento sobre la cadena respiratoria mitocondrial	96
4.3.4. Producción de NO por mitocondrias cardíacas durante la desaclimatización	97
4.3.5. Expresión de NOS en mitocondrias cardíacas	97
4.3.6. Producción mitocondrial de NO y actividad mecánica del ventrículo izquierdo durante la maduración y el envejecimiento bajo condiciones de hipoxia y de normoxia	99
4.3.7. Correlación entre la producción mitocondrial de NO y la actividad mecánica del ventrículo izquierdo durante la aclimatización y la desaclimatización	100
4.3.8. Mecanismos moduladores de la contractilidad. Rol del NO mitocondrial	102
5. CONCLUSIONES	109
<hr/>	
6. RESUMEN	112
<hr/>	
7. PUBLICACIONES	116
<hr/>	
8. REFERENCIAS	117
<hr/>	

"Una época o una cultura se caracteriza no tanto por la extensión de los conocimientos adquiridos como por las preguntas que se plantean"

François Jacob

1. INTRODUCCION

1.1. Adaptación a la hipoxia hipobárica.

Durante la conquista de los Incas en Perú, los españoles fueron los primeros en notar que la altura tenía efectos desfavorables sobre las funciones normales de individuos acostumbrados a vivir a nivel del mar (Kellogg, 1978). En 1590, el misionero jesuita Padre José de Acosta, en su Historia Natural y Moral de las Indias, describió claramente por primera vez el mal de montaña, experimentado por sujetos residentes en regiones bajas cuando se trasladaban a la altura; también fue el primero en puntualizar, en su informe sobre su expedición a los Andes, que existe un proceso de aclimatación por el cual los residentes del nivel del mar que previamente a un ascenso a grandes alturas habían estado en alturas intermedias eran menos afectados que los que ascendían directamente (Acosta, 1590). En 1854 el médico suizo Conrad Meyer-Ahrens publica el primer libro dedicado al mal de la altura, en el que compila las experiencias descritas por muchos viajeros y aeronautas y las diversas teorías propuestas para explicar su etiología, las cuales no permitían arribar a una conclusión clara. En 1861, Jourdanet hizo la sugerencia de fundamental importancia de que la disminución en la oxigenación de la sangre es la responsable de los efectos del llamado mal de la altura. El mismo persuadió luego a Paul Bert (1833-1886), afamado fisiólogo respiratorio, de que se ocupara del estudio de la fisiología de la altura y lo proveyó de una cámara de hipopresión para sus experimentos.

Los experimentos de Bert, publicados a partir de 1871 y descritos en su libro "La pression barométrique: recherches de physiologie expérimentale" (Bert, 1878), demostraron por primera vez que la enfermedad de la altura es causada específicamente por la baja presión de oxígeno y puede ser evitada aumentando el porcentaje de O₂ en el aire respirado. Bert concluyó, además, que la sangre de los animales aclimatados a la altura debía tener una capacidad de transporte de oxígeno aumentada. Fue también el primero que sugirió la búsqueda de las causas finales de la hipoxia y la hiperoxia a nivel celular. La afirmación de Bert atribuyendo a la hipoxemia la enfermedad de la altura fue muy discutida en el ámbito científico durante varias décadas (Kellogg,

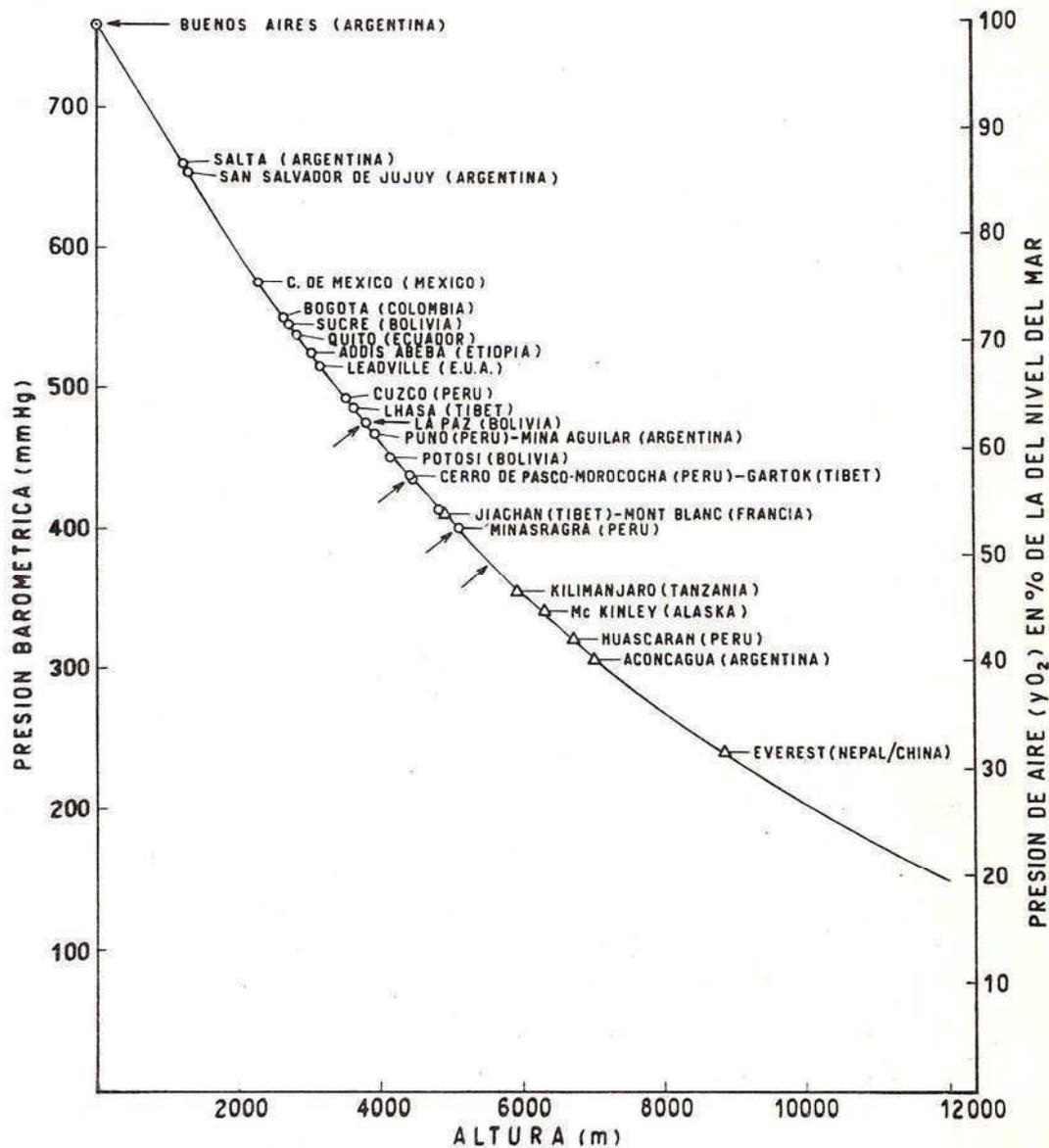


Fig. 1.1. Presión barométrica y presión de oxígeno en la altura. Las ciudades y poblaciones están representadas por círculos. Las cimas, indicadas con triángulos, son las más elevadas de Europa, de África, de América del Norte y Central, de Perú, de América y del mundo. Las flechas señalan las condiciones empleadas en los estudios realizados en nuestro laboratorio.

1978). Lograda su aceptación, los mecanismos por los cuales el hombre y los animales se adaptan a los efectos de la hipoxia hipobárica natural y experimental han sido objeto de numerosos trabajos de investigación (Lenfant y Sullivan, 1971; Frisancho, 1975; Costa, 2007). Paul Bert es considerado el padre de la fisiología de la altura.

La presión parcial de oxígeno de la atmósfera disminuye progresivamente conforme aumenta la altura. La cantidad de oxígeno en la

atmósfera, 20.94%, permanece constante hasta una altura de 110000 m. Sin embargo, como el aire es compresible, el número de moléculas gaseosas que contiene disminuye con la altura. Este es el problema fundamental de la hipoxia de la altura o hipoxia hipobárica: el aire respirado, aunque con un porcentaje de oxígeno igual al del nivel del mar, tiene una concentración molecular menor. Al nivel del mar la presión barométrica es de 760 mmHg = 101.3 kPa, y la presión parcial de oxígeno en el aire seco es aproximadamente de 159 mmHg = 21.2 kPa, y puede disminuir hasta en 10 mmHg cuando el mismo contiene mucho vapor de agua. En la Fig. 1.1 se muestran la presión barométrica y la presión parcial de O₂ en las cimas más elevadas y las más importantes poblaciones de la altura.

En términos generales, el estrés causado por la hipoxia se manifiesta usualmente por la incapacidad de realizar actividades físicas y mentales, porque la privación de O₂ rápidamente reduce la provisión de ATP. Los síntomas iniciales del mal de la altura incluyen disnea, fatiga física y mental, aceleración del pulso, somnolencia, sueño interrumpido, astenia, cefalea intensificada por la actividad y, frecuentemente, un estado de euforia. También pueden ocurrir ligeros trastornos digestivos y una marcada pérdida de peso. Este último síntoma es fácilmente detectable en los animales de laboratorio. Pueden presentarse náuseas y vómitos, disminución de la capacidad visual y sangrado de encías. Un efecto importante de la hipoxia es la disminución mental para el discernimiento, para los movimientos motores y la memoria.

Estos efectos comienzan a aparecer, en general, a alturas superiores a 2400 m (ver Tabla 1.1), y no suelen aparecer cuando se permanece por períodos breves a una altura de hasta 5000 m. El mal de las alturas se conoce también en los Andes con el nombre de “soroche”. Algunos individuos presentan predisposición al soroche, en tanto que otros sólo sienten moderados trastornos, superables con la aclimatación. El límite de tolerancia a la hipoxia en seres humanos parece alcanzarse a 8600 m; los nativos con aclimatación natural pueden sobrevivir varias horas a 10000 m sin respirar oxígeno suplementario, altura que sería mortal aún para el habitante del llano mejor aclimatado.

Tabla 1.1. Presión ambiental y cambios fisiológicos con la altura (reproducido parcialmente de Selkurt, 1975).

Falta grave de oxígeno pese a inhalar oxígeno 100%	12.000 m	141	30
Presión atmosférica 1/4 respecto del mar (calambres)	10.000 m	179	38
Cumbre monte Everest	8.708 m	190	40
Peligro para la vida a menos que se añada O ₂ al aire inspirado	6.900 m	235	49
	6.000 m	307	64
	5.400 m	349	73
Altura máxima poblaciones humanas permanentes	5.400 m	379	79
Falta definida de oxígeno	4.500 m	429	90
	3.600 m	483	101
Zona segura (efectos escasos o nulos)	3.000 m	523	110
	2.400 m	564	118
	1.500 m	632	132
	0	760	159
	ALTURA (metros)	TOTAL	OXIGENO
		PRESION ATMOSF (mm Hg)	

Por debajo de un umbral crítico, los organismos son capaces de adaptarse a la hipoxia crónica de una manera que varía con la severidad y la duración del estímulo. Este puede durar horas a años, e.g., residentes del nivel del mar que van a la altura, toda la vida, e.g., los nativos de los Andes que han nacido y crecido en la altura, o bien muchas generaciones, suficientes para adaptarse genotípicamente como consecuencia de la evolución. Dentro de esta última categoría, los Sherpas y los Tibetanos parecen mejor adaptados para la vida y el trabajo en la altura en comparación con otras poblaciones (Marconi y col., 2006; Wu y Kayser, 2006).

La adaptación que tiene lugar durante una fracción del ciclo de vida del organismo se denomina aclimatización. Una opinión ampliamente aceptada (Heath y Williams, 1979) es que los Quechuas nativos de las alturas de los Andes probablemente se ajustan a su ambiente mediante un proceso de aclimatización similar al de los individuos del nivel del mar, pero en mayor grado, mientras que los animales indígenas de la altura y los Sherpas de los Himalayas, que han vivido en la altura por un tiempo mucho mayor, quizás medio millón de años, estarían en el estado más avanzado de adaptación.

1.1.1. Aclimatización.

El transporte de O₂ desde la atmósfera hasta las mitocondrias está determinado por una ordenada secuencia de funciones que están asociadas a

una secuencia de estructuras, desde el pulmón a través de la circulación de la sangre hasta las mitocondrias. La PO_2 ambiental desempeña un rol fundamental como la fuerza conductora del flujo de O_2 a las mitocondrias. La respuesta inicial a la hipoxia aguda es provista por mecanismos preexistentes e involucra la activación de sistemas limitantes del estrés, conduciendo al desarrollo de respuestas fisiológicas urgentes: respiración rápida, circulación aumentada y producción muscular de ácido láctico. Cuando la exposición a la hipoxia se hace crónica, se desarrolla una respuesta más eficiente a medida que tiene lugar la aclimatización. La activación génica capacita la transición entre la fase aguda y la adaptación de largo plazo o crónica. La activación temprana de genes regulatorios que codifican protooncogenes y proteínas de estrés no es específica porque ocurre en la adaptación a diferentes factores. Subsiguientemente, se activan genes estructurales específicos tardíos que codifican proteínas involucradas en el transporte de oxígeno, el crecimiento de vasos sanguíneos coronarios y la eritropoiesis (Sarkar y col., 2003).

Varias respuestas sistémicas bien conocidas ocurren durante la aclimatización a la altura. Los cambios cardio-respiratorios están dirigidos a mantener los niveles de O_2 en células y tejidos. La hiperventilación y la policitemia son las respuestas más remarcables a la hipoxia crónica. Sin embargo, décadas atrás comenzó a reconocerse que sólo podían amortiguar (Fig. 1.2) pero no prevenir la caída de la PO_2 en la sangre capilar y venosa mixta (que representa mejor la PO_2 tisular) por debajo de límites normales (Hurtado, 1960) y que no son mecanismos energéticamente económicos para sujetos crónicamente expuestos a la altura (Reynafarje y col., 1985). Más aún, la hiperventilación se atenúa con el progreso de la aclimatización (Lenfant y Sullivan, 1971). Los niveles de hemoglobina no están elevados en los Sherpas y en camélidos indígenas de la altura. Llamas y vicuñas nacidas y criadas en la altura no muestran niveles elevados de hemoglobina o masa globular (Heath y Williams, 1979). De acuerdo a la experiencia de nuestro laboratorio, cobayos nativos de La Paz (Bolivia) a 3700 m, mostraron valores de hematocrito y concentración de hemoglobina similares a los de nivel del mar (Costa, 2007). Por otra parte, la actividad física en sujetos aclimatizados resulta en una menor producción de lactato que en sujetos de nivel del mar. Esta observación, conocida como “la paradoja del lactato” es aún controvertida (West, 2007), pero contribuyó, junto

con las descriptas previamente, a sugerir que la “verdadera adaptación” (Hochachka, 1992) debía buscarse a nivel tisular y, en última instancia, en el principal sitio de utilización de O₂, las mitocondrias.

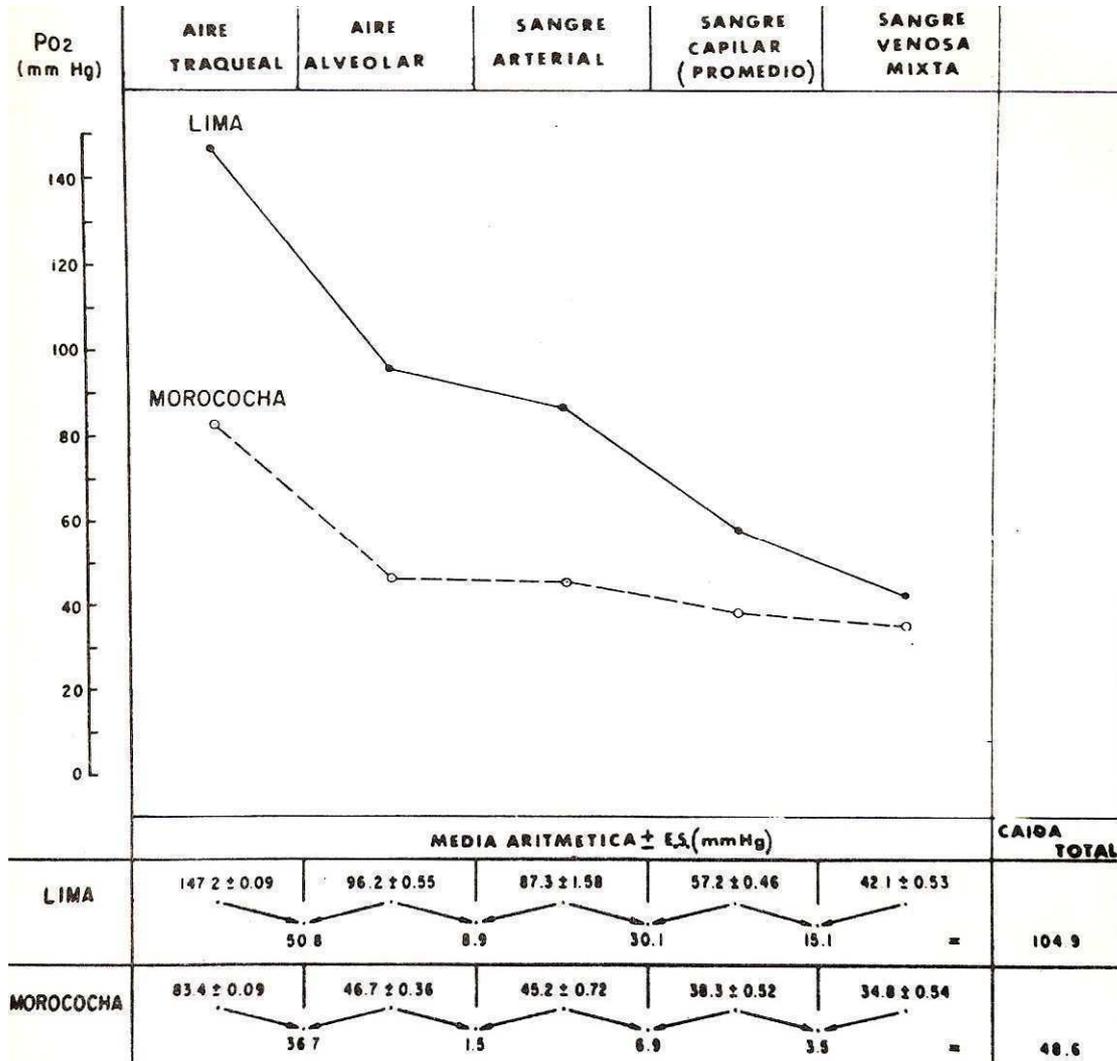


Fig. 1.2. Gradientes de PO₂ media, desde el aire traqueal a la sangre venosa mixta en residentes nativos de Lima (nivel del mar) y Morococha (4540m), (adaptado de Hurtado, 1964).

Con esta finalidad, un modelo experimental de aclimatización a la hipoxia fue exhaustivamente estudiado en nuestro laboratorio. La ventaja de estudiar animales expuestos a altura simulada con respecto a poblaciones nativas reside en el hecho de que las condiciones ambientales y hereditarias son controladas. Aunque la hipoxia es el factor adverso más importante en la altura, los organismos aclimatizados naturalmente (aclimatados), están

expuestos a la influencia de otros factores, tales como el frío, la baja humedad relativa, la incrementada radiación solar, ultravioleta y cósmica, y diferentes factores climáticos.

Tabla 1.2. Parámetros fisiológicos en ratas aclimatizadas a una altura simulada de 4,400m y en sus controles a presión atmosférica a nivel del mar (reproducido de Costa, 2007).

Parámetro	Sexo	58.7 kPa	101.3 kPa	p <
Incremento de longitud de la cola, mm	M	44.6 ± 1.3	49.9 ± 1.2	0.005
	H	30.3 ± 1.2	32.0 ± 0.9	NS
Incremento del peso corporal, g	M	160 ± 4	232 ± 7	0.001
	H	78 ± 3	91 ± 3	0.02
Peso corporal (PC), g	M	302 ± 16	362 ± 19	0.02
	H	198 ± 6.4	206 ± 13	NS
Contenido de grasa, g/100 g de PC	M	8.7 ± 0.9	14.0 ± 0.6	0.001
	H	7.1 ± 0.9	10.8 ± 1.3	0.05
Volumen sanguíneo, ml/100 g PC magro	M	10.5 ± 0.3	8.0 ± 0.1	0.001
	H	8.3 ± 0.2	7.7 ± 0.2	0.05
Volumen de agua en plasma, g/100 g PC magro	M	4.4 ± 0.2	4.1 ± 0.1	NS
	H	3.9 ± 0.1	4.6 ± 0.1	0.001
Hematocrito, %	M	56.3 ± 1.8	45.0 ± 1.1	0.001
	H	49.2 ± 1.0	37.5 ± 1.5	0.001
DPG eritrocítico, µmoles/ml RBC	M	9.0 ± 0.2	7.6 ± 0.2	0.001
	H	8.8 ± 0.1	7.3 ± 0.1	0.001
PO ₂ arterial, mmHg	M	64.1 ± 1.7	106 ± 1.9	0.001
	H	70.6 ± 2.5	107 ± 2.4	0.001
PCO ₂ , arterial, mmHg.	M	14.9 ± 0.8	22.0 ± 0.5	0.001
	H	13.0 ± 0.7	21.7 ± 2.1	0.001
pH arterial	M	7.48 ± 0.02	7.45 ± 0.03	NS
	H	7.45 ± 0.01	7.48 ± 0.01	NS

Los valores se expresan como las medias ± ES. M, machos; H, hembras. DPG, 2,3-difosfoglicerato.

Una cámara de hipopresión de gran tamaño y versatilidad fue especialmente diseñada y construida para estas investigaciones. Los resultados más significativos previamente obtenidos a nivel sistémico así como a nivel celular en distintos tejidos están sintetizados en las tablas 1.2 y 1.3 (Costa, 2007).

1.1.2. Efectos cardioprotectores de la hipoxia

La tolerancia del miocardio a la privación de oxígeno puede ser incrementada por intervención farmacológica, preconditionamiento isquémico o

hipoxia crónica. Los estados hipóxicos del sistema cardiovascular están indudablemente asociados con las patologías más frecuentes de la actualidad.

Tabla 1.3. Cambios a nivel tisular y celular en ratas sometidas a hipoxia hipobárica, comparadas con sus controles a nivel del mar (reproducido de Costa, 2007).

Tejido	58.7 kPa Aumento (%)	50.6 kPa Aumento (%)	*p <	Ref.
Ovarios				
Peso del órgano, mg/100 cm ² de área corporal	nd	65.3	0.001	19
Biosíntesis de estradiol, % conversión 4- ¹⁴ C-pregnenolona/100 cm ² de área corporal	nd	120	0.01	19
Hígado				
Peso del órgano, mg/100 cm ² de área corporal	NS	-13	0.02	42
Quimioluminiscencia in situ, cps/cm ²	-40	nd	0.01	64
Masa de retículo endoplásmico, mg proteína microsomal/g tejido	NS	-16	0.05	42
Masa mitocondrial, mg proteína mitocondrial/g de tejido	22	nd	0.02	43
Agrupación mitocondrial	37	nd	0.02	43
Actividad de citocromo oxidasa, min ⁻¹ /mg tejido	30	nd	0.02	43
Contenido de citocromo P-450, nmol/g tejido	NS	-12	0.02	42,64
Actividad de superóxido dismutasa, U/mg tejido	-26	-40	0.05	42,64
Actividad de catalasa, U/mg tejido	NS	-30	0.05	42,64
Actividad de glutatión peroxidasa, U/mg tejido	NS	-35	0.05	42,64
Producción mitocondrial de H ₂ O ₂ , nmol/min.mg proteína	-53	nd	0.02	64
Citocromo b mitocondrial , nmol/mg proteína	36	nd	0.05	64
Músculo esquelético				
Contenido de mioglobina, mg/g tejido	nd	17	0.001	39
Corazón				
Peso del órgano, mg/100 cm ² de área corporal	21	21	0.02	43,69
Contenido de mioglobina, mg/g tejido	nd	19	0.01	39
Contenido de ubiquinona, µg/g tejido	-15	-25	0.01	69
Densidad numérica mitocondrial	18	nd	0.05	43
Producción mitocondrial de H ₂ O ₂ , nmol/min.mg proteína	-35	nd	0.05	64

* grado de significancia de la diferencia; nd: no determinado.

La hipoxia del miocardio es el resultado del desbalance entre el suministro y la demanda de O₂. Entre las causas más frecuentes de una disminuida provisión de O₂ al miocardio, la hipoxia hipóxica, caracterizada por una caída en la pO₂ de la sangre arterial aunque con perfusión adecuada, está asociada a la enfermedad cor pulmonar crónica (Taquín, 1954), afecciones cardíacas congénitas y las grandes alturas. En sujetos que viven permanentemente en la altura, la hipoxia sistémica puede ser calificada como fisiológica.

La adaptación a la hipoxia crónica se caracteriza por una variedad de cambios funcionales que ayudan a mantener la homeostasis. Este ajuste protegería al corazón bajo condiciones que requieran mayor trabajo y, consecuentemente, un metabolismo aumentado.

Hacia fines de la década del cincuenta aparecieron las primeras observaciones (Hurtado, 1960) señalando que la incidencia de infartos de miocardio era menor en poblaciones de la altura (Perú, 4000 m). Estas observaciones epidemiológicas sobre el efecto cardioprotector de la altura tuvieron su correlato en estudios experimentales realizados fundamentalmente por investigadores checoslovacos (Kopecky y Daum, 1958; Poupa y col., 1966), quienes utilizaron un modelo de altura simulada intermitente en una cámara de hipopresión. Los hallazgos fueron confirmados usando variados protocolos de adaptación a la hipoxia hipobárica intermitente y diferentes puntos finales de injuria, centrando su atención en el ventrículo derecho (Poupa y col., 1966; McGrath y col., 1973; Meerson y col., 1973; Turek y col., 1980; Kolar y Ostadal, 2004). Sin embargo, estas investigaciones no tuvieron repercusión en la comunidad científica mundial. Mientras tanto, los estudios controlados en la hipoxia hipobárica continua permanecieron limitados.

Después de un largo período de escepticismo durante el cual los estudios sobre protección farmacológica directa resultaron decepcionantes (Bolli, 2007), el descubrimiento de la isquemia preconditionante (PC), inició una nueva etapa en los estudios sobre cardioprotección (Murry y col., 1986). La isquemia PC es el fenómeno por el cual breves episodios de isquemia, ocasionados por oclusión de las coronarias, mejoran la resistencia del corazón a una injuria isquémica subsiguiente. Durante los años siguientes a la observación seminal de Murry y col., el número de estudios sobre la isquemia PC escaló drásticamente, instaurándose como nuevo paradigma

cardioprotector, y siendo reconocido como la forma de protección mas efectiva y poderosa desarrollada *in vivo* contra la injuria miocárdica por isquemia/reperfusión (Kloner, 1998). A partir de la descripción de la isquemia PC fue posible pensar en un mecanismo cardioprotector ante la deficiencia de O₂, mediado por la propia falta de O₂, es decir, un mecanismo protector endógeno, conceptualmente análogo al principio funcional de las vacunas.

El comienzo de los años noventa traería consigo otro punto de inflexión en las investigaciones sobre cardioprotección. La protección conferida por medios farmacológicos no posee memoria, se anula al suprimir la medicación, y esto dificulta su uso de modo preventivo. En el año 1993 se descubre que la isquemia PC consta de dos fases: una fase temprana, la cual se desarrolla muy rápido, en los primeros minutos de exposición al estímulo, pero es efímera, persistiendo sólo por 1-2 h (éste es el fenómeno descrito originalmente por Murry y col), y una fase tardía, la cual requiere entre 6 y 12 h para desarrollarse pero dura 3 a 4 días (Kuzuya y col., 1993; Marber y col., 1993). Los mecanismos involucrados en estas dos fases resultaron ser de naturaleza diferente. La fase temprana es causada por una rápida modificación postranslacional de proteínas preexistentes, mientras que la fase tardía es causada por la síntesis de nuevas proteínas cardioprotectoras. El rango de protección es también diferente. La fase temprana es muy efectiva en limitar el daño letal irreversible causado por una isquemia/reperfusión aguda, pero no para proteger contra la disfunción contráctil postisquémica reversible (miocardio atontado). La fase tardía protege contra el infarto y el atontamiento y, como su duración es 30-40 veces mayor que la de la fase temprana, es probable que tenga mayor relevancia clínica, así como que comparta mecanismos en común con la cardioprotección por hipoxia crónica. Recientemente, breves episodios de hipoxia sistémica intermitente o continua mostraron la capacidad de inducir cardioprotección tardía (Xi y col., 2002; Cai y col., 2003). Surgió así un renovado interés por los efectos de la hipoxia crónica sobre el corazón. Esencialmente, dos modelos de cardioprotección por hipoxia crónica están siendo estudiados exhaustivamente. En el modelo establecido tempranamente de hipoxia hipobárica intermitente (Kolar y Ostadal, 2004), las ratas son sometidas ya sea a 5000 o 7000 m de altura simulada durante 4-8 horas diarias, 5 días por semana, durante un máximo de 6 semanas. El otro es un

modelo de hipoxia crónica normobárica desarrollado en conejos recién nacidos (Baker, 2004) que son expuestos durante 8 a 10 días a un ambiente hipóxico (fracción de O₂ inspirado = 0.12, equivalente a una altura de 4400 m). El aumento de la resistencia del miocardio a la isquemia conferido por este último tratamiento persistió por 20 días una vez suspendido el estímulo hipóxico (Fitzpatrick y col., 2005). La reducción del área infartada por la hipoxia hipobárica intermitente persistió 35 días (Neckar y col., 2004), mientras que el aumento en la tolerancia del ventrículo derecho a la disfunción contráctil post-anóxica duró hasta 4 meses de subsiguiente normoxia (Ostadal y col., 1985); este efecto persistió hasta aún después de la regresión de otros cambios inducidos por la aclimatización a la hipoxia, tales como la policitemia, la hipertensión pulmonar y la hipertrofia ventricular derecha.

Ambos fenómenos protectores de corto y largo plazo posiblemente compartan, al menos en parte, las mismas vías de señalización o sus componentes moleculares. Teniendo en cuenta la duración marcadamente superior de la cardioprotección conferida por la hipoxia crónica frente a la otorgada por la isquemia PC, se comprende la potencial implicancia clínica de la dilucidación del mecanismo molecular de este fenómeno. Sin embargo, una enorme y creciente cantidad de estudios han sido dedicados a los mecanismos moleculares involucrados en la isquemia PC (Bolli, 2007), mientras que los mecanismos de cardioprotección por hipoxia crónica han sido poco estudiados.

1.2. Actividad mecánica del miocardio. Acoplamiento mecano-energético

El músculo cardíaco constituye la mayor parte de la masa de las aurículas y ventrículos. Las células contráctiles o miocitos, responsables del trabajo mecánico de bombear sangre, poseen todos los elementos comunes a cualquier célula. Poseen además las denominadas miofibrillas, que son adaptaciones morfológicas a la función específica del músculo, la contracción.

Observadas con microscopio óptico, las células musculares cardíacas presentan una sucesión de bandas transversales claras (bandas I) y oscuras (bandas A), dispuestas regularmente en forma alternada. Esta estriación, característica de los músculos esquelético y cardíaco, se encuentra en las miofibrillas, que se hallan dispuestas longitudinalmente a lo largo del sarcoplasma.

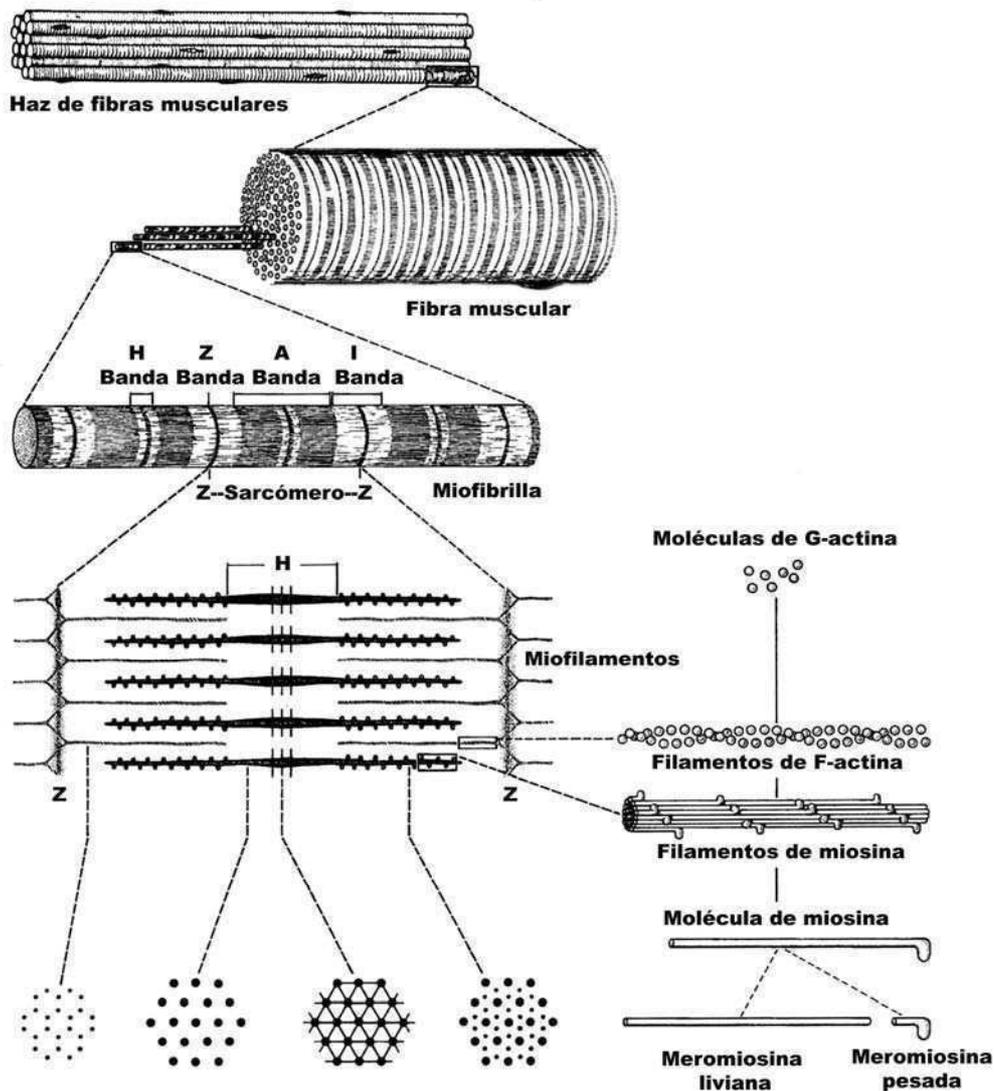


Fig. 1.3. Distintos niveles de organización estructural del músculo cardíaco.

La estriación de las miofibrillas se debe a la repetición a lo largo de ellas de la unidad contráctil del músculo: el sarcómero. Cada sarcómero está compuesto por un conjunto de filamentos gruesos y finos, interdigitados entre sí (Fig. 1.3). El filamento grueso está compuesto por miosina, molécula con la forma de un bastoncito con una cabeza globular flexible. La cabeza tiene actividad ATPasa y capacidad de unión a la forma polimerizada de la actina, constituyente principal del filamento fino. Esta interacción, que conduce a la formación de los puentes cruzados, resulta crítica para la generación de la fuerza muscular. La miosina es una de las proteínas de mayor peso molecular que existen y está constituida por dos cadenas pesadas principales idénticas y

cuatro cadenas livianas. A su vez, la miosina puede ser disociada enzimáticamente con tripsina en dos fragmentos (Szent-Gyorgyi, 1953): meromiosina liviana, que tiene la propiedad de formar filamentos, y meromiosina pesada, que posee actividad ATPasa y capacidad de unión a la actina. Diferentes isoformas de la meromiosina pesada junto con su nivel de fosforilación son responsables de las variaciones en la cinética de los puentes cruzados.

Los filamentos finos se extienden desde las denominadas líneas Z, que constituyen los límites del sarcómero, hacia el centro de éste (Fig.1.3). Estos filamentos finos están compuestos fundamentalmente por actina, pero contienen además otras proteínas que resultan fundamentales en la regulación de la contracción muscular: la troponina y la tropomiosina. La actina posee dos propiedades biológicas fundamentales que son la capacidad de interactuar con la miosina y la de activar la propiedad ATPasa de ésta. La molécula de troponina está formada por tres componentes: T, I y C. La troponina T es la que une el complejo troponínico a la tropomiosina; la I se denomina así porque inhibe, junto con la tropomiosina, la interacción entre la actina y la miosina; la C recibe este nombre porque tiene capacidad de unión al ión Ca^{2+} . Las isoformas de la troponina y de la tropomiosina determinan la sensibilidad variable al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles.

Además de las proteínas contráctiles y regulatorias mencionadas, se describen otras proteínas asociadas al sarcómero, tales como la titina o conectina, y la nebulina, que forman los filamentos de titina y nebulina. Las propiedades elásticas de la titina explican en gran parte la relación tensión-longitud de reposo del músculo estriado. Las diferentes isoformas de la titina determinan las propiedades elásticas de las fibras en reposo.

1.2.1. Mecanismo de la contracción muscular.

En 1954, A.F Huxley y R Niedergerke y H.E. Huxley y J. Hanson obtuvieron la evidencia clave acerca de la naturaleza de la contracción muscular y propusieron, independientemente, que el acortamiento del músculo estriado durante la contracción muscular es el resultado del movimiento de los filamentos finos sobre los gruesos hacia el centro del sarcómero. Cada uno de los sarcómeros se acorta, sin que la longitud de los filamentos individuales se

modifique. Esta es la denominada teoría del deslizamiento de los filamentos, confirmada en la actualidad por un sinnúmero de datos experimentales (Fig. 1.4 A).

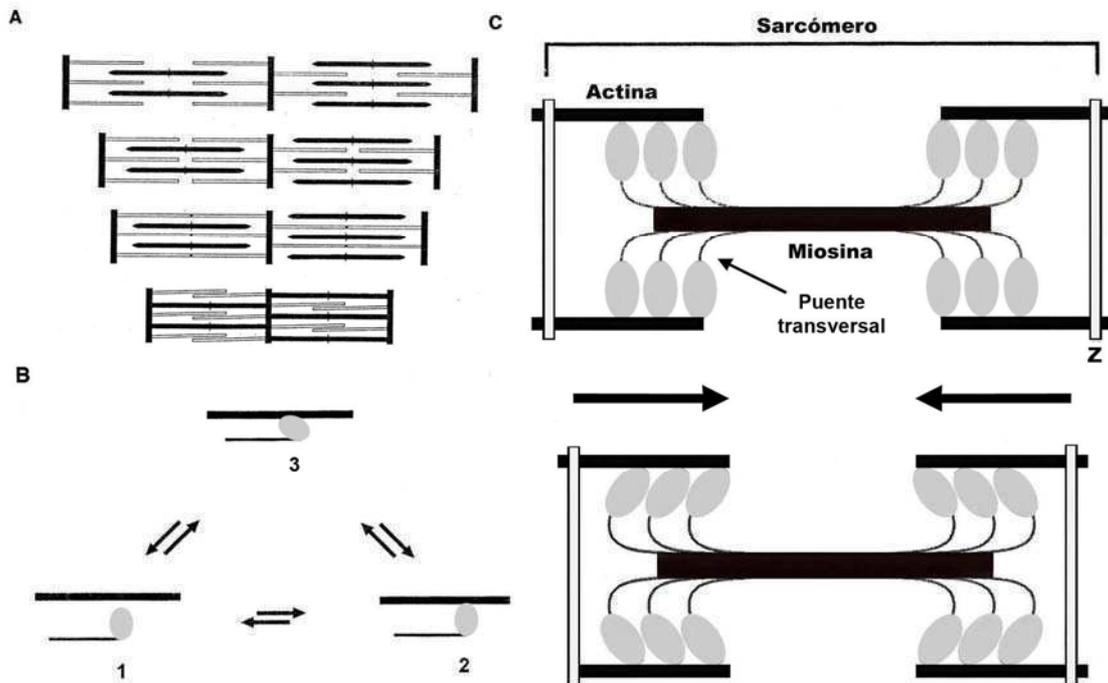


Fig. 1.4. **A.** Representación esquemática de los sarcómeros de un músculo en secciones longitudinales a diferentes grados de acortamiento. A pesar del acortamiento del sarcómero, el ancho de la banda no varía, ya que corresponde a la longitud constante de los filamentos de miosina. **B.** Esquema simplificado del ciclo de los puentes cruzados. El puente cruzado se une al filamento fino (estado 2), produce tensión (estado 3) y se desprende (estado 1) cíclicamente. **C.** Interacción de los puentes transversales con los filamentos de actina y su rotación para el deslizamiento de los filamentos y la producción de fuerza (adaptado de Mattiazzi, 2000).

Las fuerzas que se generan durante la interacción cíclica entre las cabezas de la miosina con la actina, asociada con la hidrólisis de ATP, hacen posible el deslizamiento de los miofilamentos. La cabeza de la miosina se une al filamento fino formando un puente transversal (estado 2), gira sobre su eje desarrollando tensión y tracciona sobre el filamento fino, el cual se desliza sobre el filamento grueso (estado 3) y se desune (estado 1), para volver a unirse a otro punto del filamento fino (Fig. 1.4 B). Los puentes transversales de las mitades opuestas del sarcómero giran en direcciones opuestas y de esta manera, acercan cada mitad del sarcómero hacia el centro (Fig. 1.4 C) Los estados 1 y 2 de la Fig. 1.4 B son de no generación de fuerza, y con una unión

débil para el denominado estado 2. El estado 3 de la Fig. 4 B, representa el de generación de fuerza, con una unión fuerte.

1.2.1.1. Rol del ATP en la contractilidad miocárdica

La energía para la contracción muscular proviene de la hidrólisis del ATP en ADP y fosfato inorgánico (Pi). El ciclo del ATP, que conduce a la transformación de energía química en mecánica, resulta en la generación de fuerza por parte del músculo.

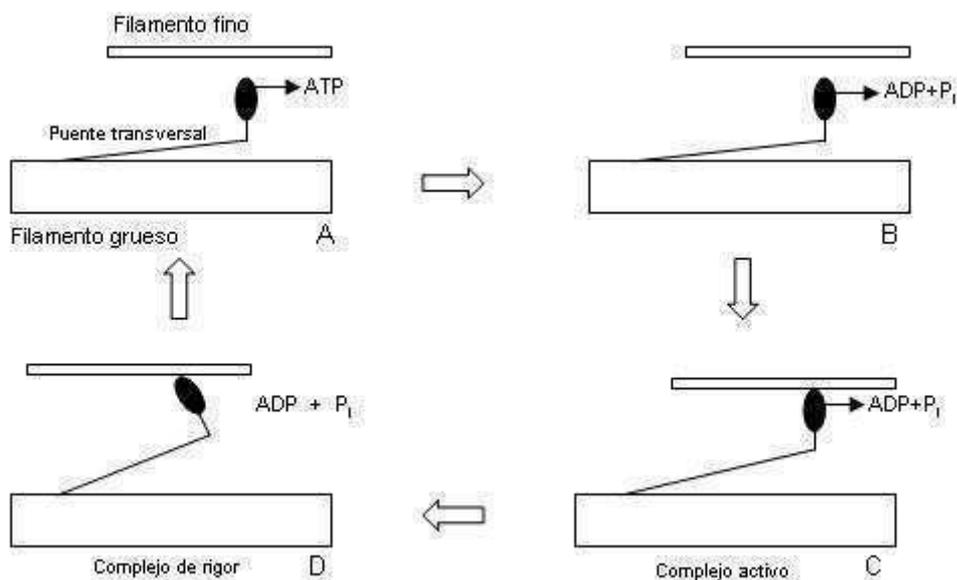


Fig. 1.5. Esquema de los procesos bioquímicos que tienen lugar durante un ciclo de contracción muscular. Rol del ATP (adaptado de Mattiazzi, 2000).

La unión del ATP a la miosina inhibe el sitio de unión de ésta a la actina. La afinidad de la miosina por el ATP es muy grande por lo que, en condiciones de reposo, cada puente transversal tiene unida una molécula de ATP. La interacción de la actina con la miosina activa a la ATPasa de la miosina y permite la unión fuerte de la miosina a la actina que se acompaña de un cambio en la posición del puente transversal (Fig. 1.5), lo que provoca el deslizamiento del filamento fino sobre el grueso; este proceso representa la transformación químico-mecánica del proceso contráctil. El nuevo complejo formado se denomina complejo de rigor, posee bajo nivel energético y

permanece intacto hasta que una nueva molécula de ATP se une a la miosina. Esto ocurre inmediatamente en una célula con un nivel normal de producción de ATP. Cuando falta ATP, en cambio, este complejo es muy estable y conduce a la contractura. La extrema rigidez que se desarrolla en los músculos luego de la muerte se debe a la desaparición gradual de ATP, que lleva a la formación de un número cada vez mayor de complejos de rigor, por lo cual el músculo se hace cada vez más inextensible.

1.2.1.2. Rol del Ca^{2+} en la contractilidad miocárdica

El ciclo descrito podría cumplirse continuamente mientras hubiera ATP. Esto no ocurre debido a la presencia de la troponina y la tropomiosina en el filamento fino, que actúan como inhibidores naturales del proceso contráctil, e impiden la interacción entre la actina y la miosina.

El Ca^{2+} intracelular desempeña un papel fundamental en la contracción-relajación muscular, ya que es responsable de la desinhibición de los miofilamentos sobre los que actúa directamente.

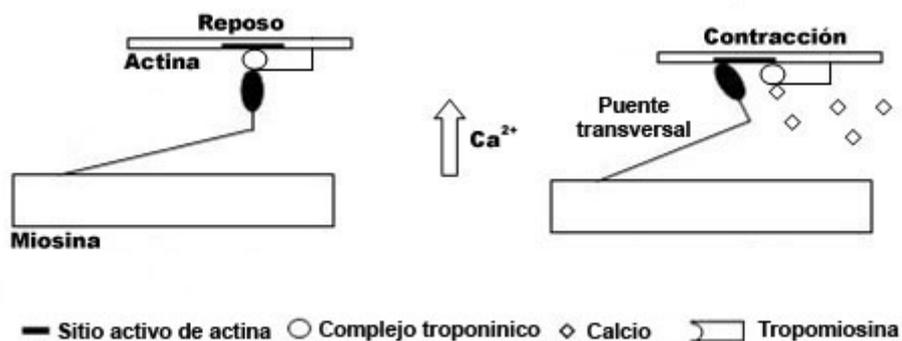


Fig. 1.6. Regulación de la contracción muscular por el ión Ca^{2+} . En reposo, la tropomiosina y la troponina impedirían la interacción actina-miosina. Al aumentar el Ca^{2+} luego del estímulo, la unión de éste a la troponina C produciría el corrimiento del complejo troponina-tropomiosina, lo cual deja libre el sitio activo de la actina (adaptado de Mattiazzi, 2000).

Cuando el músculo está relajado, el complejo troponina-tropomiosina cubriría físicamente el sitio activo de la actina, bloqueando así la interacción actina-miosina. Cuando el Ca^{2+} intracelular aumenta luego de la llegada del impulso despolarizante excitador, se une a la troponina C. Esta unión produce

un cambio del complejo troponina-tropomiosina que determina el corrimiento de la tropomiosina y libera el sitio activo de la actina, permitiendo entonces la interacción con la miosina y la consiguiente activación de la ATPasa (Fig. 1.6). El músculo retorna a su estado de relajación cuando la concentración de Ca^{2+} citoplasmática vuelve a disminuir, en presencia de ATP. El calcio se constituye entonces en la molécula pivote de la contractilidad miocárdica.

Existen tres maneras diferentes por medio de las cuales la fuerza contráctil del corazón puede ser controlada a nivel celular: (1) Por alteración del aumento transitorio del Ca^{2+} intracelular que ocurre luego de la llegada de un potencial de acción; (2) Por alteración de la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos, mecanismo que tiene lugar a nivel de los miofilamentos finos; y (3) Por alteración de la fuerza máxima que los miofilamentos son capaces de realizar, mecanismo que tiene lugar a nivel de los filamentos gruesos (puentes transversales). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y un estímulo que actúe como agonista puede tener efectos sobre uno sólo, sobre dos o sobre los tres.

1.2.2. Energética de la contracción miocárdica

Para adaptar la provisión de sangre a la demanda del organismo, el corazón presenta tres mecanismos que le permiten aumentar el volumen minuto: a) la relación fuerza-frecuencia (Bowditch, 1871), b) la activación de la fuerza contráctil por estiramiento de la fibra muscular (Frank, 1885; Patterson y col., 1914; Saks y col., 2006), y c) la activación simpática (Brodde y Michel, 1999). Estos tres mecanismos pueden aumentar la fuerza generada por el miocardio hasta 5 veces, al mismo tiempo que incrementan la demanda energética celular (Maack y O'Rourke, 2007).

Los procesos de excitación-contracción (EC) demandan gran cantidad de energía. Los principales consumidores de la energía celular son la miosina ATPasa de los filamentos contráctiles, la Na/K ATPasa sarcolemal, y la Ca-ATPasa de retículo sarcoplásmico (Bers, 2002).

Los principales sitios productores de energía son las mitocondrias (ver 1.2.2.1.), las cuales ocupan aproximadamente un 30% del volumen del miocito (Costa y col., 1988; Zhou y col., 1998; Bers, 2002), y están localizadas en las cercanías de los principales sitios de consumo energético, o sea, los

miofilamentos (Fig.1.7), el retículo sarcoplásmico (RS) y los túbulos-T del sarcolema (Yoshikane y col., 1986; Territo y col., 2001a).

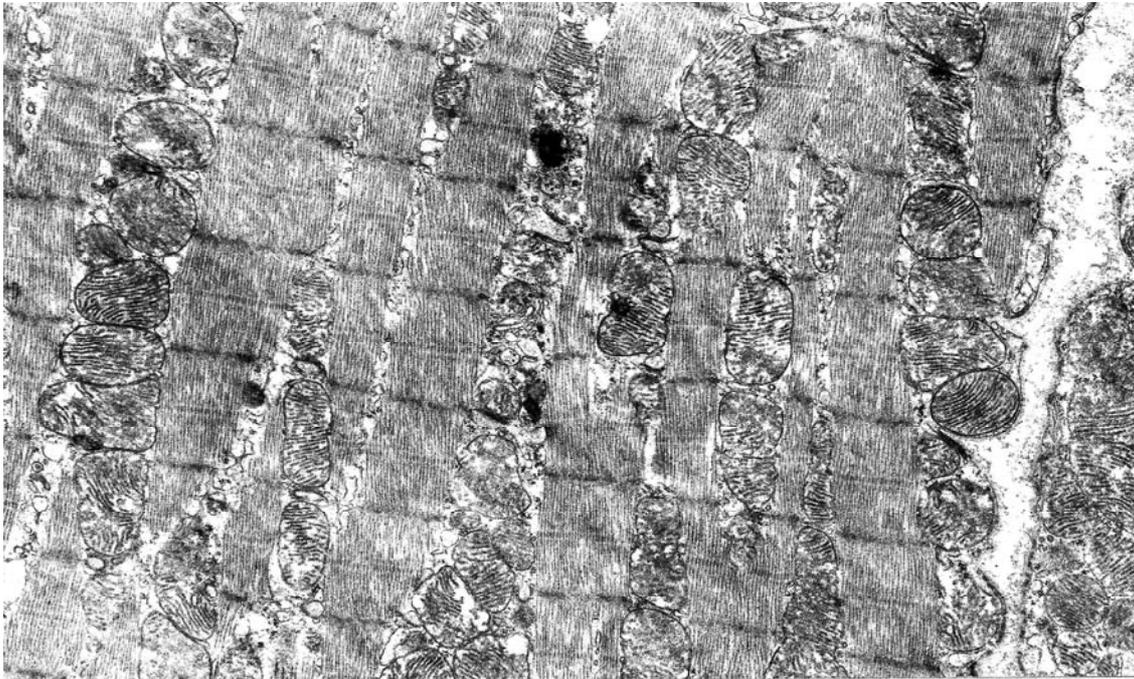


Fig.1.7. Miocardio de rata. Acetato de uranilo-citrato de plomo. 12500 x (Costa y col., 1988).

Bajo condiciones fisiológicas, la glucosa es transformada en piruvato, el cual entra a la mitocondria y es convertido en acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH). Los ácidos grasos, fuente importante en la energética cardíaca, son activados a acil-CoA grasos en el citosol y transportados a las mitocondrias vía carnitina-aciltranslocasa. El acil-CoA entra al proceso de β -oxidación, generando acetil-CoA, NADH y $FADH_2$ como productos principales. El acetil-CoA, proveniente tanto de la glucólisis como de la β -oxidación, entra en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) o ciclo de Krebs, el cual produce finalmente NADH y $FADH_2$.

El NADH y otros sustratos proveen de electrones a la cadena respiratoria, a través de la cual estos fluyen hasta ser transferidos al oxígeno, formando H_2O . Este proceso, denominado respiración, provee la energía libre necesaria para la síntesis de ATP a partir del ADP, proceso denominado fosforilación oxidativa (ver 1.2.2.1.).

Para ajustar el flujo de energía a los permanentes cambios en el trabajo cardíaco, un eficiente acoplamiento entre la oferta y la demanda energética se tornan esenciales. Los factores regulatorios sobre los que existe más consenso son el ADP y el calcio (Chance y Williams, 1955a; Hansford, 1985; McCormack y col., 1990; Brandes y Bers, 1997; Territo y col., 2000; Balaban, 2002; Brandes y Bers, 2002; Cortassa y col., 2003; Saks y col., 2004; Cortassa y col., 2006; Saks y col., 2006). La clásica hipótesis del control respiratorio de Chance y Williams (Chance y Williams, 1955a; Chance y Williams, 1955b; Chance y Williams, 1955d; Chance y Williams, 1955c) implica que la tasa respiratoria es regulada por la disponibilidad de ADP a la F1/F0-ATPasa. Esta hipótesis se basa en la observación de que cuando se añade ADP a suspensiones mitocondriales aisladas, el consumo de oxígeno aumenta (estado respiratorio 3), y cuando el ADP se consume, la velocidad de respiración disminuye nuevamente (estado respiratorio 4). Sin embargo, a fines de la década de 1980, una serie de experimentos cuestionaron el rol regulador del ADP en la respiración in vivo. En corazones aislados de ratas (Katz y col., 1987; Katz y col., 1988) o de perros in vivo (Katz y col., 1989), el incremento en el trabajo cardíaco aumentó el consumo de oxígeno sin cambiar los niveles de ADP, ATP, Pi, y fosfocreatina (PCr). Los autores concluyeron que la respiración es regulada por la disponibilidad de electrones para la cadena respiratoria, es decir del estado redox determinado por la relación NADH/NAD⁺, más que por los niveles de ADP (Katz y col., 1987; Katz y col., 1989). Como el NADH es producido por el ciclo de Krebs, y tres enzimas claves de este ciclo (PDH, isocitrato y α -cetoglutarato deshidrogenasa) son reguladas por los niveles de calcio (Denton y col., 1972; Denton y col., 1978; McCormack y Denton, 1979; McCormack y Denton, 1984; Denton y McCormack, 1985; Denton y McCormack, 1990) se propuso que el calcio modularía la actividad respiratoria mitocondrial in vivo más que el ADP (Katz y col., 1988). Estudios recientes de estos autores mostraron que el calcio activaría así mismo a la F1/F0-ATPasa (Territo y col., 2000; Territo y col., 2001b).

Sin embargo, la estimulación de la fosforilación oxidativa por el calcio resulta insuficiente para dar cuenta de la adaptación de la energética mitocondrial a las variaciones en la actividad cardíaca inducidas por modificaciones en el grado de estiramiento de las fibras musculares, ya que

éstas ocurren mayormente sin modificaciones en los niveles de calcio transiente, base metabólica de la ley de Frank-Starling (Saks y col., 2006). Además, mientras que el calcio es capaz de duplicar la tasa respiratoria, las modificaciones por el grado de estiramiento de la pared ventricular incrementan la actividad respiratoria más de 10 veces (Williamson y col., 1976; Territo y col., 2001a; Cortassa y col., 2003; Saks y col., 2006).

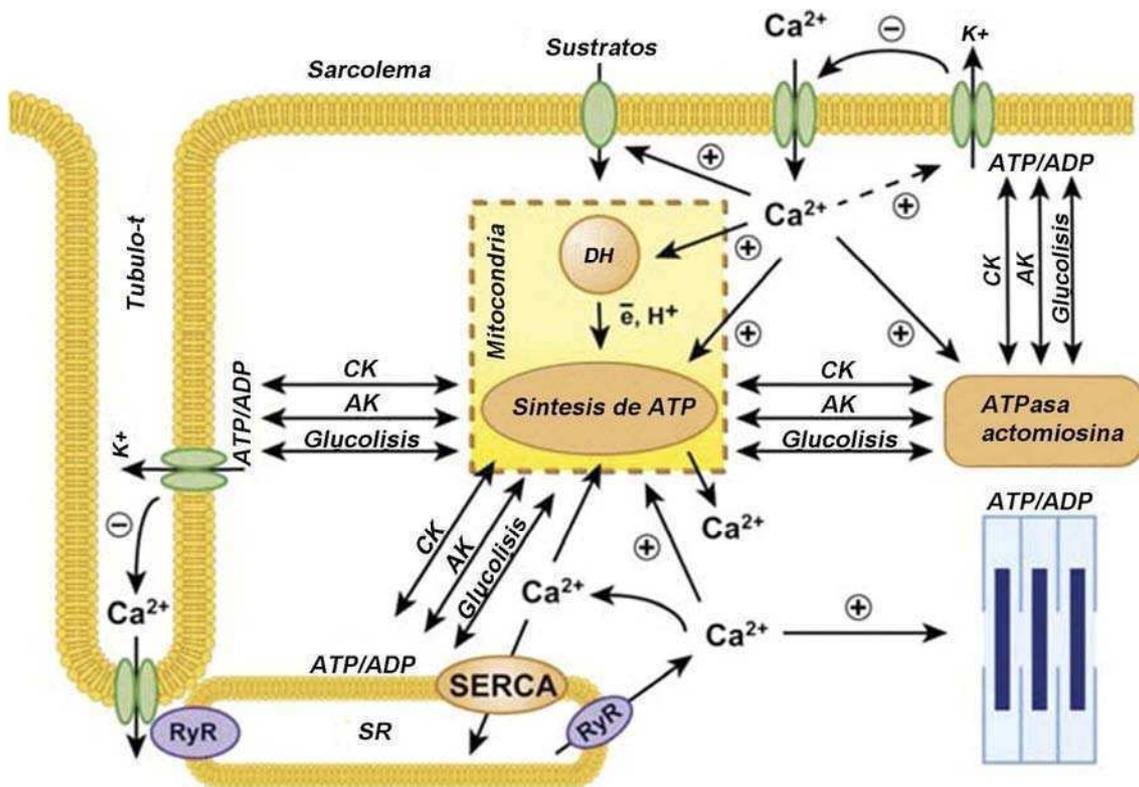


Fig.1.8. Acoplamiento mecano-energético. La interrelación entre CK, AK, y glucólisis, las mitocondrias y ATPasas, los canales de K_{ATP} , y los transientes de Ca^{2+} , generan señales metabólicas en sincronía con la actividad eléctrica y funcional para asegurar la homeostasis de la energética celular. CK: creatina quinasa, AK: adenilato quinasa, DH: deshidrogenasas (adaptado de Saks y col., 2006).

Esto ha dado lugar a proponer otros mensajeros que acoplen la actividad energética a la mecánica cardíaca. Los sistemas citoplasmáticos que mantienen la homeostasis de fosfatos de alta energía, como ser la creatina quinasa (CK) y la rápidamente difusible fosfocreatina (PCr), junto con el sistema de transporte de nucleótidos de adenina a la mitocondria (ANT), presentes en los miocitos, pueden limitar los cambios en los niveles de ATP, transfiriendo efectivamente la señal energética desde el sitio de la hidrólisis del ATP a la mitocondria (Saks y col, 2006). De acuerdo a evidencias recientes, el

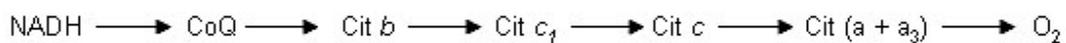
calcio, el ADP y el Pi probablemente regulen la respiración de una manera complementaria (Fig.1.8) en sitios up y downstream de la cadena respiratoria, proveyendo así una disponibilidad balanceada del ATP y NADH reducido (Brandes y Bers, 1997; Brandes y Bers, 2002; Cortassa y col., 2003; Cortassa y col., 2006; Maack y col., 2006; Saks y col., 2006). Actualmente, como se explica más adelante, se acumulan evidencias sobre el rol del oxígeno y del NO como moduladores fisiológicos de la actividad respiratoria mitocondrial.

1.2.2.1. Producción de ATP por las mitocondrias

Las mitocondrias constituyen las organelas clave en la producción del ATP celular y son las encargadas de aportar la energía necesaria para la función contráctil.

Las técnicas de aislamiento fueron diseñadas hacia el final de la década de 1940. E. Kennedy y A. Lehninger descubrieron entonces que las mitocondrias contenían el sistema respiratorio, las enzimas del ciclo del ácido cítrico y las de la oxidación de los ácidos grasos. Los estudios de microscopía electrónica revelaron que las mitocondrias poseen dos sistemas membranosos: una membrana externa y una membrana interna extensa y muy replegada formando crestas. Los conjuntos respiratorios integran la membrana interna, mientras que las reacciones del ciclo del ácido cítrico y de la oxidación de los ácidos grasos se producen en la matriz (Fig. 1.9).

Las membranas externa e interna muestran permeabilidades diferentes: pequeñas moléculas e iones atraviesan fácilmente la membrana exterior, pero no penetran en el compartimiento interno. Existen proteínas transportadoras específicas para moléculas como ADP y ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana interna mitocondrial. Los electrones se transfieren desde el NADH al O₂ a través de una serie de transportadores de electrones, de acuerdo al siguiente orden:



La primera reacción es la oxidación del NADH por la NADH-deshidrogenasa, flavoproteína que contiene flavin mononucleótido (FMN).

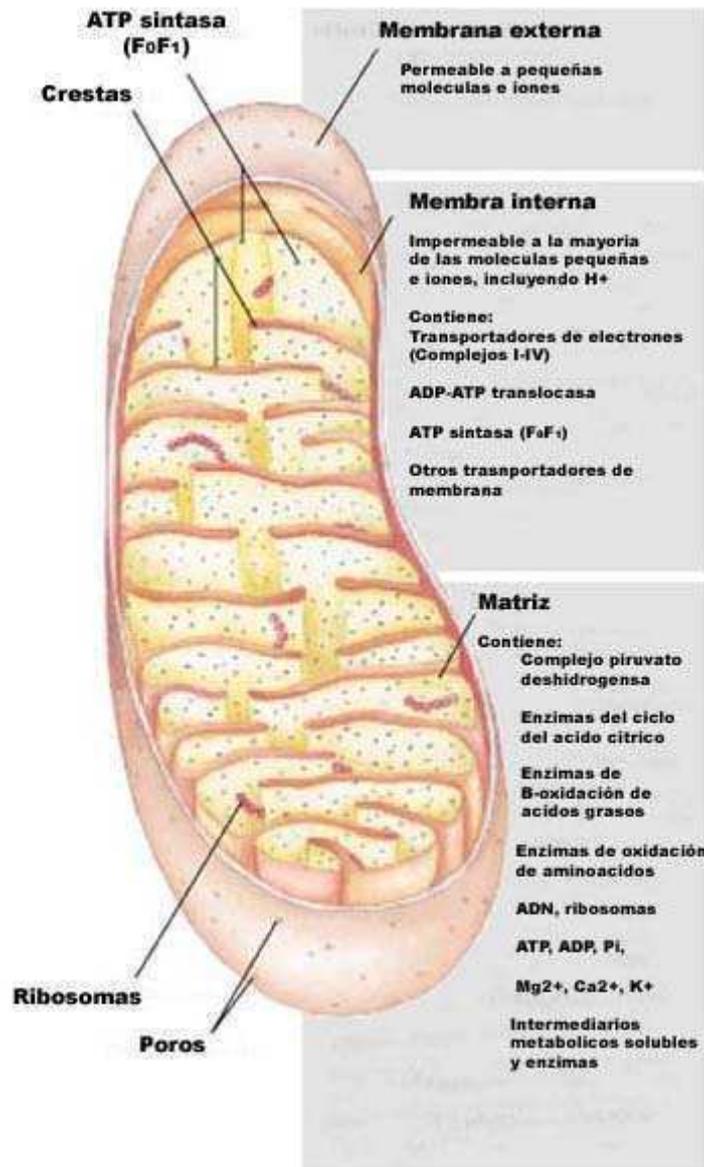


Fig.1.9. Esquema de mitocondria. Las crestas mitocondriales son mas profusas en los miocitos, y contienen tres veces mas complejos de transferencia de electrones que los hepatocitos. El pool mitocondrial de coenzimas e intermediarios bioquímicos se hallan funcionalmente separados de los citosolicos (adaptado de Lehninger, 2004).

Se transfieren dos electrones del NADH al FMN para dar la forma reducida FMNH_2 . Los electrones se transfieren luego del FMNH_2 de la NADH deshidrogenasa a la coenzima Q (CoQ) o ubiquinona. Los transportadores de electrones entre la CoQ y el O_2 son los citocromos, proteínas que poseen un grupo prostético hemo. Durante el transporte de electrones, el átomo de hierro de los citocromos alterna entre un estado reducido ferroso (+2) y uno oxidado férrico (+3). Dado que el grupo hemo transfiere un solo electrón, la CoQ

reducida debe transferir sus dos electrones a dos moléculas de citocromo *b*, el siguiente miembro de la cadena respiratoria.

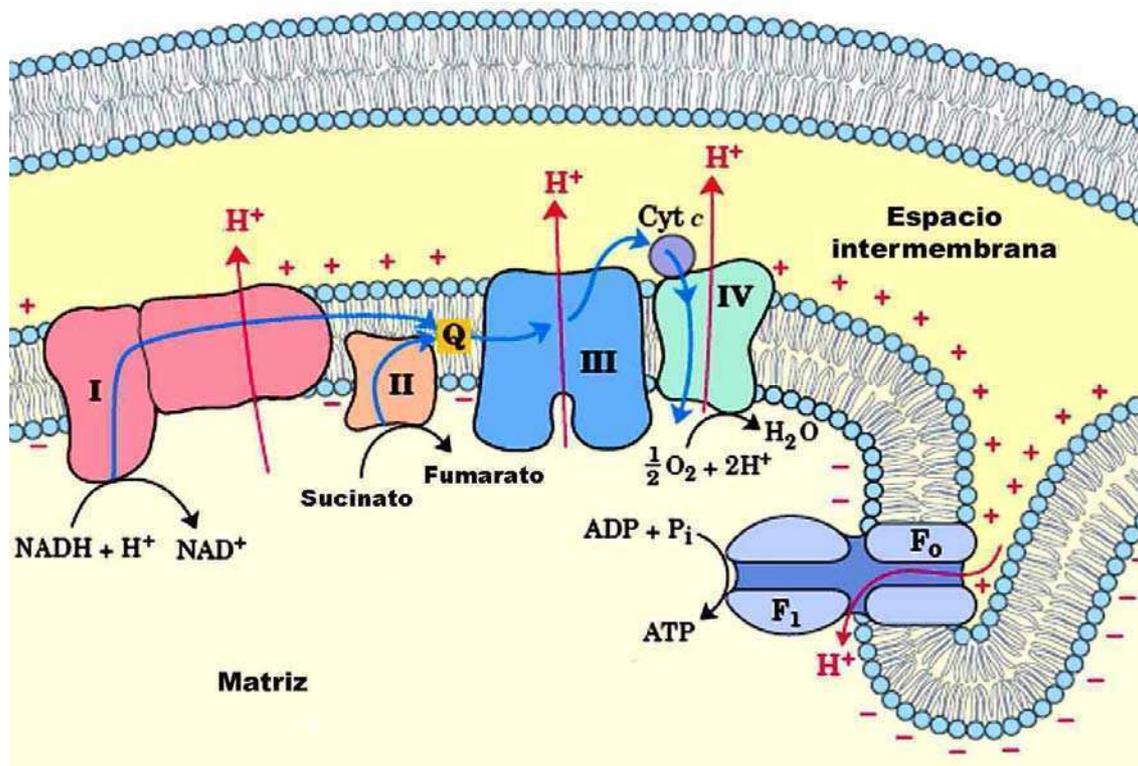


Fig. 1.10. Fosforilación oxidativa. Se muestra el flujo de electrones a través de los cuatro complejos respiratorios. Los electrones llegan a Q desde los Complejos I y II. La QH₂, sirve como transportador de electrones y protones. Transfiere los electrones al Complejo III, el cual los transfiere al citocromo c. El Complejo IV transfiere electrones del citocromo c reducido al oxígeno. El flujo de electrones a través de los Complejos I, III, y IV es acompañado por un flujo de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, produciendo un gradiente químico y eléctrico. Al reentrar los protones a la matriz mitocondrial, a través de la F₀F₁ATPasa, se sintetiza ATP. Q: ubiquinona, QH₂: ubiquinona reducida (adaptado de Lehninger, 2004).

Los potenciales redox de los citocromos aumentan secuencialmente. Los citocromos *a* y *a*₃ son los miembros terminales de la cadena respiratoria, y existen como complejo, integrando la citocromo oxidasa. Los electrones son transferidos al citocromo *a* y luego al citocromo *a*₃ que contiene cobre. Este átomo de cobre alterna entre la forma oxidada +2 y la reducida +1 a medida que transfiere los electrones desde el citocromo *a*₃ hasta el oxígeno molecular.

El tratamiento de la membrana mitocondrial interna con detergentes permite la separación de cuatro complejos respiratorios, cada uno de ellos

capaz de catalizar la transferencia de electrones a través de una porción de la cadena. Los complejos I y II catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona desde el NADH (complejo I) y desde el succinato (complejo II); el complejo III (citocromos b y c_1) transfiere electrones desde la ubiquinona reducida al citocromo c, y el complejo IV o citocromo oxidasa completa la secuencia transfiriendo electrones desde el citocromo c reducido al oxígeno (Fig. 1.10).

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la fosforilación oxidativa. La hipótesis actualmente aceptada, denominada teoría quimiosmótica, propone que la energía electroquímica inherente a la diferencia en la concentración de protones y la separación de cargas a través de la membrana mitocondrial interna, generada por la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, impulsa la síntesis de ATP a medida que los protones retornan a la matriz mitocondrial a través de la F_0F_1 ATPasa (Fig. 1.10)

Estudios recientes muestran que los complejos respiratorios se hallan organizados dentro de la membrana interna como asociaciones supramoleculares. La presencia de estos supercomplejos, además de brindar una ventaja cinética, desempeñaría un rol en la estabilidad y ensamblaje de los complejos individuales y en la prevención del exceso de formación de radicales libres del oxígeno (Lenaz y Genova, 2009b; Lenaz y Genova, 2009a).

1.2.2.2. Producción de radicales libres del oxígeno por la cadena respiratoria mitocondrial.

La transferencia de electrones desde los sustratos hasta el oxígeno a través de la cadena respiratoria mitocondrial no es perfecta: una parte de los electrones reacciona directamente con el oxígeno molecular produciendo el radical libre anión superóxido (O_2^-).

Esta autooxidación ocurre principalmente a nivel de la ubisemiquinona y la flavin- semiquinona de la NADH-deshidrogenasa. La enzima superóxido dismutasa (SOD), presente en la matriz mitocondrial, transforma el anión superóxido en peróxido de hidrogeno (H_2O_2). A su vez el H_2O_2 es reducido a agua por la glutatión peroxidasa. La glutatión reductasa recicla al glutatión oxidado a su forma reducida, jugando así un relevante rol en la defensa antioxidante mitocondrial (Fig.1.11).

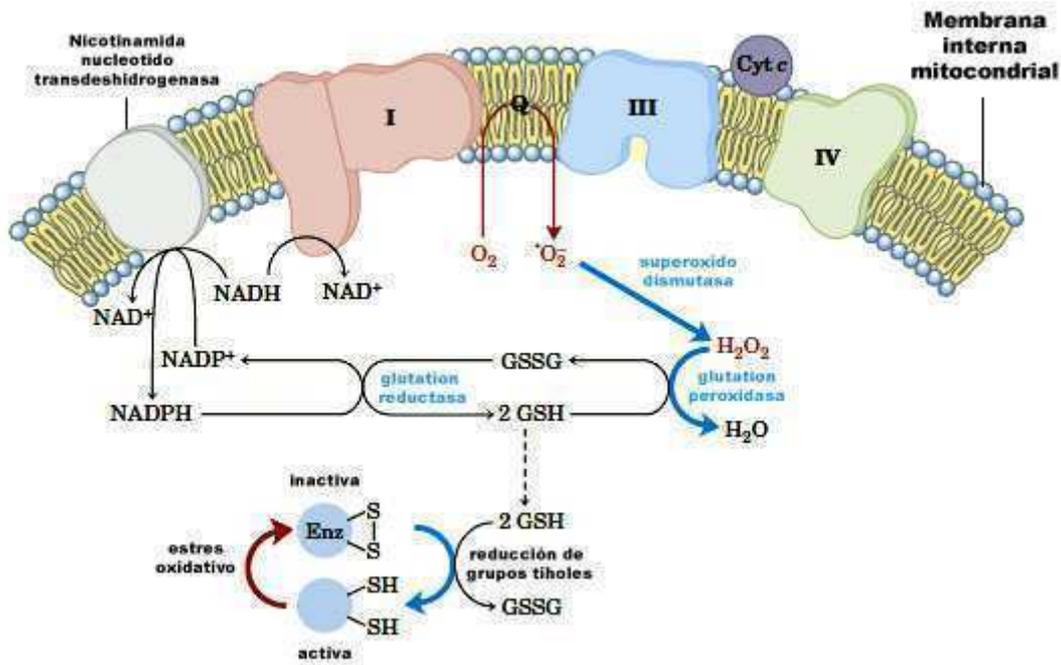


Fig. 1.11. El radical superóxido (O_2^-) se forma a nivel de los Complejos I y III por transferencia directa de un electrón al oxígeno. Las reacciones en línea azul defienden a la célula contra los efectos dañinos del superóxido. El glutatión reducido (GSH) dona electrones para la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y para los residuos oxidados de cisteína (-S-S-) en proteínas. El GSH es regenerado a partir de su forma oxidada (GSSG) por reducción con el NADPH (adaptado de Lehninger, 2004).

La producción primaria de O_2^- y H_2O_2 puede iniciar la reacción en cadena de radicales libres debido a la formación de radical hidroxilo ($HO\cdot$) por las reacciones químicas de Fenton-Haber Weiss (Fig. 1.12). Similarmente, la producción de óxido nítrico (NO) acoplada a la producción de O_2^- conduce, a través de la producción de peroxinitrito ($ONOO^-$) por la reacción de Beckman-Radi-Freeman, a la producción de $HO\cdot$, el cual inicia procesos que llevan al daño celular (Fig. 1.12). Las enzimas antioxidantes mitocondriales actúan minimizando los efectos potencialmente tóxicos de los radicales libres. Por otra parte, el O_2^- , el H_2O_2 y el NO constituyen parte de un sistema integrado de señalización mitocondrial para la regulación celular (Trachootham y col., 2008).

1.3. Rol del óxido nítrico en la adaptación del miocardio a la hipoxia.

El descubrimiento del rol del NO como mensajero en el sistema cardiovascular condujo a la obtención del Premio Nóbel de Fisiología y

Medicina 1998 a R. Furchgott, L. Ignarro y F. Murad. El NO generado por la activación de la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) difunde a las células musculares lisas adyacentes, las cuales responden con la activación de la guanilato ciclasa. El cGMP así producido activa a su vez la bomba de calcio endoplasmática, reduciendo la concentración de calcio intracelular y desfosforilando las cadenas livianas de miosina (Rapoport y col., 1983).

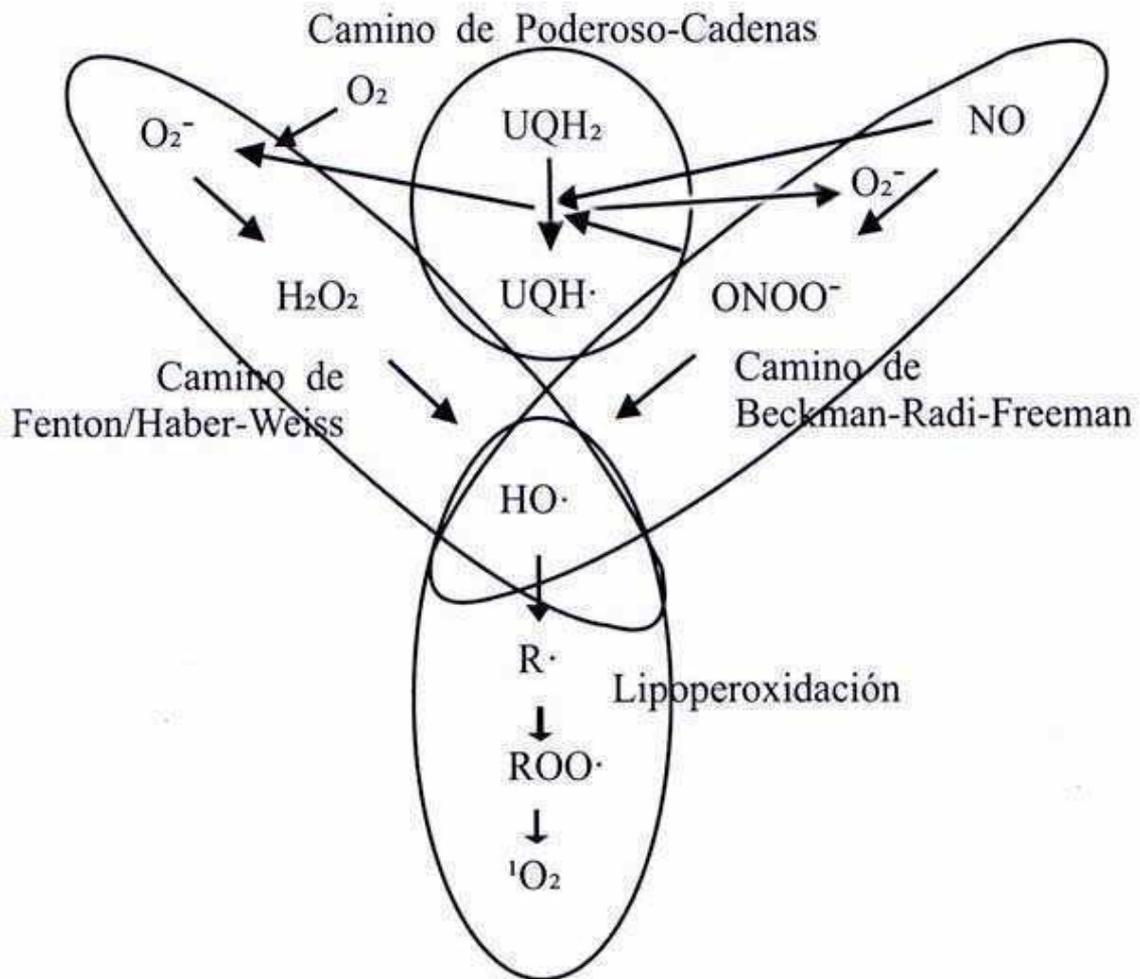


Fig. 1.12. Los caminos cruzados de la cadena de reacciones bioquímicas de radicales libres oxidativos. La producción primaria de los radicales libres $O_2^{\cdot-}$ y NO en dos reacciones de iniciación lleva en forma convergente a la generación del radical hidroxilo (HO^{\cdot}), el cual inicia, entre otras, la reacción en cadena de lipoperoxidación (Valdez y col., 2000).

En las arteriolas, el NO produce vasodilatación e incrementa el flujo sanguíneo y la liberación de O_2 a los tejidos (Clementi y col., 1999). La dilatación hipóxica en las pequeñas arterias coronarias de ratas es dependiente del NO endotelial, ya que es bloqueada por la adición de L-NAME (inhibidor de la NOS) o por remoción del endotelio vascular (Lynch y col., 2006).

Más tarde se descubrió que, además de su efecto vasodilatador, el NO afecta la función de una variedad de órganos, incluyendo el corazón, y es producido por varios tipos celulares, incluyendo los cardiomiocitos. Actualmente se sabe que el NO participa en la regulación de la contractilidad miocárdica y contribuye a la protección del miocardio en la isquemia pre- y postcondicionante (Rastaldo y col., 2007).

Granger y Lehninger reconocieron tempranamente que la citotoxicidad de los macrófagos se ejerce en parte inhibiendo la respiración mitocondrial (Granger y Lehninger, 1982); este hallazgo, interpretado diez años más tarde a partir de la observación de la producción de NO por macrófagos activados y neutrófilos (Yui y col., 1991; Nathan, 1992), promovió los estudios del efecto del NO sobre la cadena respiratoria. El reconocimiento del NO como el primer regulador fisiológico conocido que actúa directamente sobre la cadena respiratoria mitocondrial (Cleeter y col., 1994; Brown y Cooper, 1994) reveló la importancia que el NO podría tener en la adaptación mitocondrial a la hipoxia. Asimilando el efecto del NO al propuesto previamente para la redistribución de las mitocondrias (Costa y col., 1988) se sugirió que, a través de su control sobre la respiración mitocondrial, el NO mejoraría la difusión del oxígeno, permitiendo una mayor eficiencia en su utilización (Poderoso y col., 1996; Thomas y col., 2001).

El posible rol del NO como sensor específico que ajusta la respuesta del sistema cardiovascular a las oscilaciones locales en la demanda tisular de O₂ es entonces particularmente interesante, teniendo en cuenta que puede modular tanto el suministro, a través de su acción vasodilatadora, como el consumo de O₂, a través de su acción inhibitoria sobre la cadena respiratoria mitocondrial (Chen y col., 2008; Pittman, 2010).

1.3.1. Mecanismos bioquímicos de acción del óxido nítrico

A concentraciones intracelulares fisiológicas, el NO presenta tres formas básicas de acción y señalización celular. La primera es la activación de la guanilato ciclasa citosólica, la cual produce GMPc como segundo mensajero, el cual es responsable de la activación amplificada de una serie de quinasas dependientes de GMPc (Ignarro, 2000; Jurado y col., 2005; Schlossmann y Hofmann, 2005). La segunda vía de acción es la inhibición competitiva con el

oxígeno de la citocromo oxidasa mitocondrial (Brown y Cooper, 1994; Cleeter y col., 1994; Poderoso y col., 1996; Poderoso y col., 1998; Antunes y col., 2004; Cooper y Giulivi, 2007) La tercera vía de acción del NO es la modificación proteica post-translacional (Trachootham y col., 2008; Winterbourn, 2008), fundamentalmente a través de S-nitrosilación de residuos de cisteína (Derakhshan y col., 2007; Martinez-Ruiz y Lamas, 2007), y nitración de residuos de tirosina (Radi y col., 2002; Peluffo y Radi, 2007).

Con respecto a la referida como segunda vía de acción, el NO ha sido reconocido como un inhibidor fisiológico de la actividad de la citocromo oxidasa en mitocondrias, células y tejidos. La fosforilación oxidativa estaría regulada por tres pequeñas moléculas: ADP, O₂ y NO. La disponibilidad de ADP para la F1-ATPasa es el paso limitante que conduce a las mitocondrias del estado de reposo (estado 4) al estado activo (estado 3), con un marcado aumento en la velocidad de consumo de O₂. A su vez, el O₂ y el NO compiten por el centro activo de la citocromo oxidasa y regulan así el consumo de O₂ por las mitocondrias (Boveris y col., 2000).

Niveles algo más elevados de NO inhiben la transferencia de electrones a nivel del complejo III, con un aumento en la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Estos niveles de NO que promueven la producción de anión superóxido establecen un mecanismo de retroalimentación por el cual, mediante la formación de peroxinitrito y remoción de NO, se desbloquea la inhibición de la citocromo oxidasa (Poderoso y col., 1996).

1.3.2. Oxido nítrico sintasas (NOS)

El NO es sintetizado durante una reacción enzimática catalizada por la NOS que convierte L-arginina en L-citrulina en presencia de O₂ y NADPH. Varios cofactores de reducción como flavin adenin dinucleótido (FAD), flavin adenin mononucleótido (FMN), (6R)-5,6,7,8,-tetrahidrobiopterina (BH₄), ferroprotoporfirina IX (hemo) y la proteína regulatoria calmodulina son requeridos para la síntesis de NO (Knowles y Moncada, 1994; Ignarro, 2000; Alderton y col., 2001). El dominio reductasa de la NOS transfiere equivalentes de reducción desde el NADPH al dominio del grupo hemo, donde se oxida la L-arginina en una reacción de dos etapas (Fig. 1.13): primero la flavina de la NOS acepta electrones desde el NADPH y los transfiere al hierro del grupo hemo,

transformándose de NOSFe^{3+} a NOSFe^{2+} . En esta etapa la L-arginina es hidroxilada formando un intermediario enzimático, la N^{W} -hidroxil-L-arginina. Luego el hierro del grupo hemo se une al O_2 y la enzima consume NADPH para oxidar al intermediario a L-citrulina y NO (Singh y Evans, 1997; Stuehr y col., 2001).

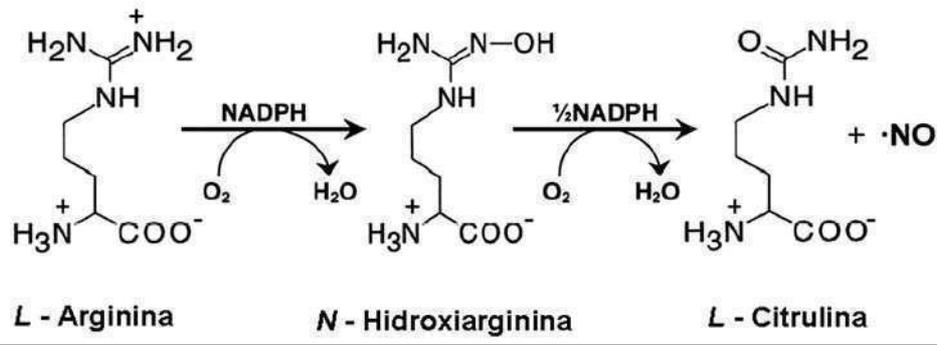


Fig. 1.13. Biosíntesis del óxido nítrico a partir de L-arginina. Reacción catalizada por la oxido nítrico sintasa.

Tres NOS genómicas han sido localizadas en ADN humano: NOS neuronal (nNOS o NOS I) en el cromosoma 12 (Kishimoto y col., 1992), NOS inducible (iNOS o NOS II) en el cromosoma 17 (Chartrain y col., 1994) y NOS endotelial (eNOS o NOS III) en el cromosoma 7 (Robinson y col., 1994). Estas proteínas son expresadas por mecanismos de transcripción con modificaciones post-translacionales. Se ha descrito la expresión de las tres NOS genómicas en una amplia gama de tejidos de mamíferos, lo cual induce a pensar que las NOS se expresan en todas las células aeróbicas de mamíferos.

La identificación mas común de estas tres isoformas se ha realizado por inmuno reacción con anticuerpos anti-NOS genómicas, aunque los anticuerpos comerciales suelen presentar cierto grado de reacción cruzada.

Otras formas de distinción entre las NOS se han hecho sobre la base de su nivel de expresión en los tejidos, de sus requerimientos de calcio, y de su localización subcelular (Ignarro, 2000).

De acuerdo a su nivel de expresión en los tejidos, las NOS se pueden clasificar en constitutivas e inducible; las enzimas constitutivas clásicas son la nNOS de sistema nervioso y la eNOS de endotelio vascular, mientras que la enzima inducible clásica es la iNOS de macrófago, la cual puede aumentar 5-

10 veces por estimulación (Ignarro, 2000). Sin embargo, la nNOS y la eNOS también han mostrado cambios en su nivel de actividad, generalmente entre un 50 y un 200%, como respuesta a efectores de importante impacto fisiológico.

Sobre la base de sus requerimientos de calcio, las NOS se pueden clasificar en calcio y calmodulina dependientes (nNOS y eNOS) o calcio y calmodulina independiente (iNOS), dada su alta afinidad por el calcio (Ignarro, 2000).

La clasificación que parecería tener mayor relevancia fisiológica sería la que tiene en cuenta su localización subcelular: citosólicas y mitocondrial (Carreras y col., 2001; Lores-Arnaiz y col., 2007). Los tipos citosólicos constituyen una familia de NOS en si mismas, considerando incluidas dentro de este grupo las de sarcolema y retículo sarcoplásmico en corazón (Alvarez y Boveris, 2004), la de retículo endoplásmico en hígado (Carreras y col., 2001), timo (Bustamante y col., 2004) y sinaptosomas de cerebro y sistema nervioso central (Lores-Arnaiz y col., 2007). Las NOS mitocondrial y citosólicas comparten la propiedad de estar asociadas, a través de una unión covalente, a las membranas lipídicas celulares (Elfering y col., 2002).

La presencia de NOS en mitocondrias fue originalmente descrita en cerebro e hígado de rata por estudios inmunohistoquímicos (Bates y col., 1995), seguidos por la determinación de la producción de NO y su caracterización bioquímica en mitocondrias de hígado de rata (Ghafourifar y Richter, 1997; Giulivi y col., 1998). La observación de la producción mitocondrial de NO se extendió luego a otros tejidos, tales como riñón (Boveris y col., 2003b), cerebro (Lores-Arnaiz y col., 1999; Riobo y col., 2002; Navarro y Boveris, 2004) timo (Bustamante y col., 2000), diafragma (Boveris y col., 2002a) y corazón (Kanai y col., 2001; Boveris y col., 2002b; Costa y col., 2002; Boveris y col., 2003a; Zanella y col., 2004). La mtNOS de hígado ha sido identificada como la isoforma α de la nNOS, una proteína codificada por un gen de 29 exones, el cual se puede expresar de diferentes formas como resultado de splicing alternativo (Wang y col., 1999a; Wang y col., 1999b). La mtNOS sería la consecuencia de modificaciones postranscripcionales de metilación y fosforilación de la nNOS α (Elfering y col., 2002; Franco y col., 2006).

Se ha descrito la modulación de la mtNOS por diferentes efectores fisiológicos; la angiotensina II disminuye su actividad (Costa y col., 2002;

Boveris y col., 2003b), al igual que las hormonas tiroideas (Carreras y col., 2001), mientras que la aclimatación al frío la aumenta (Peralta y col., 2003). La mtNOS de timo se ha hallado incrementada durante la etapa inicial de la apoptosis (Bustamante y col., 2000).

La co-inmunoprecipitación y la evidencia basada en la cinética de los procesos bioquímicos sugieren que la mtNOS estaría estructuralmente unida a los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Persichini y col., 2005; Franco y col., 2006; Parihar y col., 2008). La presencia de mtNOS en la membrana mitocondrial interna sugiere su función fisiológica en el ajuste de la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa a las demandas energéticas de la célula. De esta manera, tres componentes proteicos de la membrana mitocondrial, F₁-ATPasa, mtNOS y citocromo oxidasa, modularían la función mitocondrial (Boveris y Boveris, 2007).

1.3.3. Oxido nítrico y sistema cardiovascular

En el sistema cardiovascular, el NO juega un rol en la regulación de canales iónicos, la contractilidad de los miocitos, el consumo de oxígeno, la utilización de sustratos, la apoptosis y la hipertrofia (Massion y Balligand, 2003; Massion y col., 2003; Belge y col., 2005; Davidson y Duchon, 2006; Dedkova y Blatter, 2009).

Actualmente está bien establecido que el NO es generado en forma constitutiva en el corazón, no solamente por las células endoteliales sino también por los cardiomiocitos mismos (Kaye y col., 1996; Kelly y col., 1996; Kanai y col., 1997; Dedkova y col., 2002; Wang y col., 2002; Dedkova y col., 2003; Wang y col., 2005; Dedkova y col., 2007; Rastaldo y col., 2007; Dedkova y Blatter, 2008).

La eNOS o NOS3 (localizada en la caveola) era considerada hasta hace poco tiempo la única isoforma que se expresaba constitutivamente en los miocitos ventriculares, y por ende la fuente del NO involucrado en la regulación autócrina de la contracción miocárdica y la homeostasis del calcio (de Belder y col., 1993; Balligand y col., 1994; Dedkova y Blatter, 2008). Sin embargo, en los últimos años, la nNOS o NOS1 ha sido identificada también en cardiomiocitos (Sears y col., 2004), específicamente en sarcolema (Xu y col., 2003), en retículo sarcoplásmico (Xu y col., 1999) y en la membrana interna mitocondrial

(Kanai y col., 2001; Elfering y col., 2002). La iNOS o NOS2 también se halla presente en miocitos, pero solamente bajo condiciones de estrés específicas como ser el Soc. séptico o ciertas cardiopatías produce grandes cantidades de NO en relación a la actividad de las isoformas constitutivas (Balligand y col., 1994; Rastaldo y col., 2007).

Como se mencionara en 1.3.2, en los últimos años se han acumulado evidencias a partir de ensayos inmunohistoquímicos (Bates y col., 1995), bioquímicos (Costa y col., 2002; Elfering y col., 2002; Boveris y col., 2003a; Zanella y col., 2004; Gonzales y col., 2005), y electroquímicos (Kanai y col., 2001; Kanai y col., 2004) sobre la presencia de una mtNOS en corazón. Sin embargo, su existencia, origen y relevancia fisiológica son aceptadas aún con escepticismo, fundamentalmente debido a la posibilidad de contaminación de las preparaciones mitocondriales con NOS proveniente de otras organelas y membranas (Brookes, 2004; Tay y col., 2004; Lacza y col., 2006; Csordas y col., 2007).

La evidencia más firme involucra a la nNOS como la isoforma presente en mitocondrias de corazón (Kanai y col., 2001; Elfering y col., 2002; Kanai y col., 2004; Dedkova y Blatter, 2006). A pesar de ello, diferentes laboratorios han brindado evidencias a favor de la eNOS (Bates y col., 1996; Hotta y col., 1999; Zanella y col., 2004) y otros involucran también a la iNOS (French y col., 2001; Zanella y col., 2004; Gonzales y col., 2005; Dedkova y Blatter, 2009).

1.3.3.1. Efecto del óxido nítrico sobre la contractilidad cardíaca

La contracción cardíaca se inicia por la despolarización de la membrana del miocito o sarcolema, la cual permite la entrada de Ca^{2+} trans-sarcolemal a través de los canales L de Ca^{2+} . Esta entrada de Ca^{2+} estimula a su vez la liberación de mayores cantidades de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico a través de los receptores de rianodina (RyR), el cual activa la contracción de los mío filamentos (sístole), en un proceso denominado liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (Bers, 2002). La relajación del miocito (diástole) requiere la remoción del Ca^{2+} del citoplasma, la cual esta mediada por la SR Ca^{2+} ATPasa (SERCA2a) y por el intercambiador Na^+ - Ca^{2+} (NCX) sarcolemal (Hobai y O'Rourke, 2000; Hobai y O'Rourke, 2001). La Ca^{2+} ATPasa calmodulina-dependiente de la membrana plasmática (PMCA), aunque menos relevante,

también contribuye a remover el Ca^{2+} citoplasmático (Schuh y col., 2001). A pesar de las controversias sobre los detalles, hay una gran acumulación de evidencias en la literatura sobre la participación del NO en la regulación de varios canales iónicos involucrados directamente en el acoplamiento excitación-contracción (Hare, 2003).

Los efectos del NO sobre los canales de Ca^{2+} fueron descritos inicialmente en experimentos realizados utilizando dadores exógenos de NO o inhibidores de la NOS (Hare, 2003). La medición directa de la producción de NO tanto en el corazón funcional (Pinsky y col., 1997) como en cardiomiocitos aislados (Kanai y col., 1997), demostró que la concentración de NO fluctúa, en el rango submicromolar, durante el ciclo de contracción-relajación. El hecho de que el NO varíe su concentración en sentido opuesto a la del Ca^{2+} durante el ciclo cardíaco y que sea optimizada por la carga (Pinsky y col., 1997) y la estimulación adrenérgica (Kanai y col., 1997) otorga fuerte sustento a la hipótesis del rol fisiológico del NO en el acoplamiento excitación-contracción.

En los últimos años se ha acumulado evidencia experimental, tanto en corazones aislados como en animales intactos, de que mecanismos GMPc dependientes e independientes (Chesnais y col., 1999; Paolucci y col., 2000) contribuyen a la influencia del NO sobre la contractilidad miocárdica.

La nNOS identificada en mitocondrias cardíacas (Kanai y col., 2001; Elfering y col., 2002), modularía asimismo la fosforilación oxidativa y, a su vez, la contractilidad.

1.3.3.2. Rol del óxido nítrico en la protección del miocardio.

Aunque se han propuesto numerosos factores que potencialmente juegan un rol en el efecto cardioprotector de la hipoxia crónica, el detalle del mecanismo molecular permanece desconocido. Existen evidencias limitadas sobre la participación de los canales de K sensibles a ATP (K_{ATP}), las especies reactivas del oxígeno, varias proteína quinasas y el NO (Baker, 2004; Kolar y Ostadal, 2004).

Los mecanismos postulados por los cuales el NO aumentaría la resistencia de los miocitos a la isquemia aguda involucran la inhibición de la sobrecarga de calcio, el antagonismo de la estimulación β -adrenérgica, la

reducción en la demanda de O_2 , la apertura de canales de potasio ATP dependientes sarcolemales y/o mitocondriales, la activación de ciclooxigenasas y una posible acción antioxidante directa, como ser la inhibición de los efectos del O_2^- y del $ONOO^-$ (Bolli, 2007).

Está generalmente aceptado que la segunda ventana temporal de protección en la isquemia preconditionante, la cual presenta cierta similitud con los modelos de cardioprotección por hipoxia prolongada, es desencadenada por la eNOS y activada por la iNOS (Rastaldo y col., 2007). El NO producido se combina con el O_2^- para generar $ONOO^-$ activando una cascada de quinasas, proceso que culmina en la activación de genes cardioprotectores y la síntesis de proteínas que median la protección tardía conferida por la isquemia PC (Bolli, 2007).

Un aumento en la producción de NO en miocardio también ha sido hallado en la hipoxia crónica y asociado a su efecto cardioprotector. Sin embargo, no hay consenso sobre la isoforma involucrada; tanto la eNOS como la iNOS han sido implicadas en los diferentes modelos experimentales (Baker, 2004; Kolar y Ostadal, 2004).

Como se mencionara anteriormente, la presencia de mtNOS ha sido demostrada en corazón (Kanai y col., 2001; Costa y col., 2002; Boveris y col., 2003a), donde el NO juega un rol en la contractilidad (Shah y MacCarthy, 2000; Hare, 2003). En estudios previos encontramos que el tratamiento de ratas con la droga enalapril, de efecto terapéutico sobre el sistema cardiovascular, aumentó la actividad de la mtNOS (Costa y col., 2002) y la concentración intramitocondrial de NO en estado estacionario en corazón (Boveris y col., 2003a), sugiriendo que vías de señalización dependientes de la mtNOS podrían dar cuenta del efecto beneficioso de esta droga. Resulta asimismo de interés que, como ya en 1972 se publicara, el desarrollo de un estado hipotiroideo durante la exposición crónica a la altura juega un rol crucial en el desarrollo de resistencia del miocardio a la anoxia (Martin y col., 1972), mientras que una aumentada actividad de mtNOS en varios tejidos ha sido recientemente asociada con el hipotiroidismo (Carreras y col., 2001; Franco y col., 2006). Por último, la mtNOS hepática se encontró incrementada (Lacza y col., 2001) en ratones sometidos a hipoxia aguda (8% O_2 , 25 min). Por lo tanto, la investigación sobre un posible aumento de la mtNOS en corazón de ratas

aclimatizadas a la hipoxia y su participación en el sugerido efecto cardioprotector de la vida en la altura resulta de fundamental interés.

1.4. Finalidades de esta investigación

El objetivo de la presente tesis fue: 1) evaluar la función miocárdica en la respuesta fisiológica a la hipoxia hipobárica con exposición sostenida durante la maduración y el envejecimiento; 2) establecer la duración de los efectos de la aclimatización una vez suprimido el estímulo hipóxico y 3) contribuir a esclarecer los mecanismos celulares implicados.

Con la finalidad de comprobar si el sugerido efecto cardioprotector de la vida en la altura puede atribuirse a la baja pO_2 , se estudió la actividad mecánica del ventrículo izquierdo de ratas sometidas a altura simulada durante varios períodos durante esencialmente la totalidad de su ciclo vital. Se emuló así las condiciones de hipoxia de la altura, pero manteniendo los demás factores ambientales similares a los del grupo control, el cual permaneció a presión atmosférica de nivel del mar. Una vez establecido el tiempo necesario para el desarrollo óptimo de los efectos estudiados, se investigó el curso de regresión de los mismos con el tiempo durante la desaclimatización.

En todos los animales se controlaron respuestas fisiológicas clásicas de la aclimatización a la altura: el valor globular o hematocrito como índice de respuesta hemática a la hipoxia, la variación de la masa corporal y de la masa ventricular derecha.

Los estudios de actividad mecánica se realizaron en ventrículo izquierdo, a fin de descartar que los efectos hallados fueran secundarios a la hipertrofia que sufre el ventrículo derecho como consecuencia de la hipertensión pulmonar que se desarrolla en la altura. Los principales parámetros basales de contractilidad y relajación y su respuesta a la hipoxia/reoxigenación se determinaron en los músculos papilares, lo que permitió descartar la influencia que la acción endócrina y hemodinámica de los componentes vasculares ejerce sobre los miocitos. La tensión de reposo (TR), la máxima tensión desarrollada (TD) y las velocidades máximas de contracción (+T) y de relajación (-T) se determinaron antes y durante un ciclo de hipoxia/reoxigenación, con el fin de evaluar la capacidad funcional del miocardio y su capacidad de respuesta

frente a un episodio de privación de O₂.

El NO modula la actividad mecánica del miocardio, por un lado, afectando la apertura de los canales de Ca²⁺ sarcolemales y sarcoplasmáticos, y por otro, inhibiendo la actividad respiratoria mitocondrial. El NO generado ya sea por la eNOS o por la iNOS ha sido asimismo involucrado en el efecto cardioprotector conferido por otros modelos de hipoxia. Uno de los objetivos más importantes del presente estudio fue analizar el comportamiento de la mtNOS en nuestro modelo experimental de aclimatización y su participación en el mecanismo de los efectos observados. Acompañando la evaluación de la actividad de la mtNOS, se determinó la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales I-III y IV, marcadores del proceso de envejecimiento, y los contenidos de los diferentes citocromos de la cadena respiratoria. Las determinaciones bioquímicas se realizaron en preparaciones mitocondriales obtenidas del ventrículo izquierdo una vez aislados ambos músculos papilares.

Con el objeto de estimar la participación de la mtNOS en los cambios producidos durante la aclimatización en la contractilidad basal y en respuesta a la hipoxia/reoxigenación, se correlacionaron los parámetros de actividad mecánica durante la maduración y el envejecimiento con la producción de NO mitocondrial. Con los datos obtenidos posteriormente durante el estudio de desaclimatización se completó y refinó la evaluación de la relación existente entre la contractilidad y la actividad de mtNOS, lo cual permitió definir una actividad óptima para esta enzima.

Con el fin de investigar si el aumento en la producción de NO en las preparaciones mitocondriales de las ratas sometidas a hipoxia se debía a un incremento en la expresión de mtNOS, así como la isoforma involucrada, se realizaron, análisis de Western blot con anticuerpos contra eNOS, iNOS y nNOS.

Con el objeto de evaluar la duración de la cardioprotección conferida por nuestro modelo experimental de hipoxia hipobárica crónica sostenida y la participación del NO generado por las mitocondrias en el mecanismo involucrado, se estudiaron los animales durante varios períodos de desaclimatización. Se determinaron los parámetros de contractilidad basal del músculo papilar, su respuesta al Ca²⁺, su sensibilidad a la hipoxia/reoxigenación y la actividad y expresión de la mtNOS de ventrículo

izquierdo, además de los efectos clásicos de la hipoxia crónica, en ratas previamente aclimatizadas transferidas a presión atmosférica ambiental.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Hipoxia hipobárica crónica

Los estudios se realizaron en ratas Wistar macho de la cepa albino CHbbTHOM, las cuales fueron sometidas a 5000 m de altura simulada (53.8 kPa = 404 mmHg) en una cámara de hipopresión durante varios períodos, y en sus respectivos controles a presión atmosférica ambiental (101.3 kPa = 760 mmHg). Teniendo en cuenta que el porcentaje de O₂ en el aire se mantiene constante en 20.93%, la presión parcial de O₂ en el aire inspirado (PIO₂) fue 11.3 kPa = 85 mmHg para las ratas hipóxicas y 21.2 kPa = 159 mmHg para las controles.



Fig. 2.1. Vista externa de la cámara hipobárica con puerta exterior de antecámara abierta. Sobre el costado izquierdo se pueden observar manómetro y flotómetro con filtro de aire correspondiente a la antecámara.

La edad de los animales al iniciar el período experimental fue de 7 semanas. Los períodos de aclimatización (Fig. 2.3) a los que se realizaron los



Fig. 2.2. A: vista de la antecámara y la cámara a través de sus dos compuertas abiertas. B: vista de la cámara, donde se pueden observar tres jaulas con animales.

estudios fueron de 1, 10, 26, 45, 74 y 92 semanas, al cabo de los cuales la edad de los animales fue, por consiguiente, 2, 4, 8, 12, 18 y 23 meses, respectivamente. La desaclimatización se estudió en ratas sometidas a las mismas condiciones de hipoxia hipobárica (53.8 kPa) durante 5 meses, y luego mantenidas a 101.3 kPa durante 0.4, 2 y 5 meses (edad aproximada: 7, 9 y 12 meses, respectivamente) y en sus controles mantenidos a 101.3 kPa durante todo el período experimental.

Se utilizó una cámara de hipopresión (Figs 2.1 y 2.2) de 2 m de largo, 2 m de ancho y 2 m de alto, provista de una antecámara de igual ancho y alto, pero de 1 m de largo. La extracción del aire se realiza por medio de bombas de vacío; la renovación del mismo se efectúa a través de medidores de caudal provistos de filtros y de válvulas que permiten regular el flujo de aire, lo que a su vez regula la presión, que se registra en vacuómetros. La renovación del aire en la cámara fue suficiente para asegurar a los animales la misma composición, humedad y temperatura que a los controles. La hipopresión se interrumpió tres veces por semana durante 20-30 min para limpiar, reemplazar el alimento y el agua, y controlar periódicamente el peso corporal de los animales. Los cambios en la presión al abrir y cerrar la cámara se realizaron lentamente.

Los animales controles se mantuvieron fuera de la cámara pero en el mismo ambiente, acondicionado a una temperatura de 22°C. Los ciclos de luz se mantuvieron automáticamente en 12 h diarias de luz y 12 h de oscuridad.

Las ratas, tanto hipóxicas como controles, fueron colocadas en grupos de a 5 en jaulas de 80 cm de largo, 40 cm de ancho y 40 cm de alto para evitar stress por hacinamiento y tuvieron libre acceso al agua y al alimento balanceado "Rata Ratón Común Extrusado" de Alimentos Balanceados Cooperación .

2.2. Determinación del peso corporal

El peso corporal de las ratas se determinó periódicamente durante todo el período experimental y antes de sacrificarlas con una balanza para animales de laboratorio con un error de ± 1 g.

Animales: Ratas macho Wistar Chbb THOM de 7 semanas de edad																																				
Condiciones experimentales:	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura 22°C. - Composición de aire atmosférico (20,95% O₂, 79,02 N₂, 0,03% CO₂). - Ciclos de luz / oscuridad 12 h. - Libre acceso a alimento y agua. 																																			
53.8 kPa = 404 mmHg 5000m altura simulada PIO ₂ : 11.3 kPa = 85 mmHg	101.3 kPa=760mmHg Nivel del mar PIO ₂ : 21.2 kPa = 159 mmHg																																			
<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">Aclimatación</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">Controles</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">10</td> <td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">26</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">45</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">74</td> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> </table> </td> <td style="text-align: center;"> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">23</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;"> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Desaclimatación</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> </table> </td> </tr> </table> </td> </tr> </table>		Aclimatación	Controles	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">10</td> <td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">26</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">45</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">74</td> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> </table>	Tiempo (Semanas)	Edad (Meses)	1	2	10	4	26	8	45	12	74	18	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">23</td> </tr> </table>	Edad (Meses)	2	4	8	12	18	23	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Desaclimatación</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>		Desaclimatación	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> </table>	Tiempo (Semanas)	Edad (Meses)	1	7	9	9	21	12
Aclimatación	Controles																																			
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">10</td> <td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">26</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">45</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">74</td> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> </table>	Tiempo (Semanas)	Edad (Meses)	1	2	10	4	26	8	45	12	74	18	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">23</td> </tr> </table>	Edad (Meses)	2	4	8	12	18	23																
Tiempo (Semanas)	Edad (Meses)																																			
1	2																																			
10	4																																			
26	8																																			
45	12																																			
74	18																																			
Edad (Meses)																																				
2																																				
4																																				
8																																				
12																																				
18																																				
23																																				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Desaclimatación</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>		Desaclimatación	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> </table>	Tiempo (Semanas)	Edad (Meses)	1	7	9	9	21	12																									
Desaclimatación																																				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Tiempo (Semanas)</td> <td style="text-align: center;">Edad (Meses)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">12</td> </tr> </table>	Tiempo (Semanas)	Edad (Meses)	1	7	9	9	21	12																												
Tiempo (Semanas)	Edad (Meses)																																			
1	7																																			
9	9																																			
21	12																																			

Fig. 2.3. Distribución de las ratas utilizadas en el estudio. Se usaron de 5 a 7 animales en cada grupo experimental e igual número de controles, que se estudiaron paralelamente.

2.3. Determinación del hematocrito

El valor globular se determinó por triplicado mediante la técnica del microhematocrito. Se utilizaron tubos para microhematocrito heparinizados, los cuales fueron cargados con sangre extraída por sección del extremo de la cola de la rata, bajo anestesia con éter. Los tubos capilares fueron sellados con calor en uno de sus extremos y centrifugados a 1200 rpm durante 10 min en una centrífuga de mesa para determinación de microhematocritos Presvac CM 28 serie G. El valor globular se calculó midiendo con una regla con precisión de 1mm la longitud de los tubos ocupada con glóbulos rojos y la ocupada por el total de sangre.

2.4. Extracción del corazón funcional

La extracción del corazón biológicamente activo se realizó bajo anestesia. Mediante dos cortes sobre las costillas a nivel del esternón se expuso el corazón, el cual fue separado por sección de la aorta, sin dañar las cavidades ventriculares. El corazón aislado fue rápidamente sumergido en solución de Ringer (pH 7.4, a 30°C) de la siguiente composición (en mM): 128.3 NaCl, 4.7 KCl, 1.35 CaCl₂, 20.23 NaHCO₃, 0.35 NaH₂PO₄, 1.05 MgSO₄, y 5.5 glucosa, burbujeada con carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂). El órgano funcionalmente activo se pasó sucesivamente por tres recipientes con el mismo buffer, de forma tal de eliminar todo resto de sangre que pudiese quedar contenido en el interior de sus cavidades (Fig. 2.5).

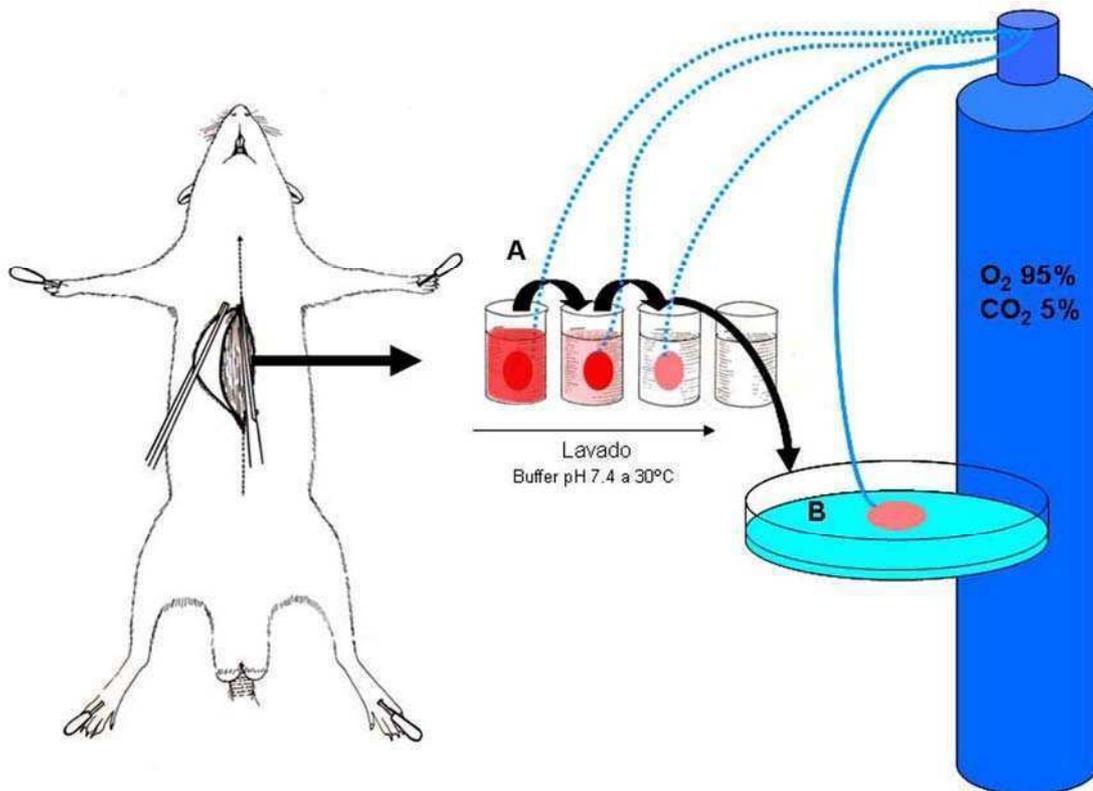


Fig.2.5. Esquema de extracción del corazón funcional. A- los lavados del corazón se realizaron en buffer fosfato burbujeado con carbógeno, pH 7.4 a 30°C. B- se muestra el corazón dispuesto en una caja de Petri para proceder a la disección de los músculos papilares

2.5. Disección de los músculos papilares del ventrículo izquierdo

Los músculos papilares son pequeños músculos columnares que se hallan en el interior de las cavidades ventriculares (dos en cada una de ellas) y

actúan a través de tendones sobre las valvas de las válvulas mitral y tricúspide (Fig. 2.6). Las fibras de estos músculos, esencialmente idénticas a las de los músculos que conforman las paredes ventriculares, corren paralelamente al eje del preparado. Esta disposición es la más adecuada para cualquier tipo de experimento mecánico y por este motivo se utilizan como modelo experimental.

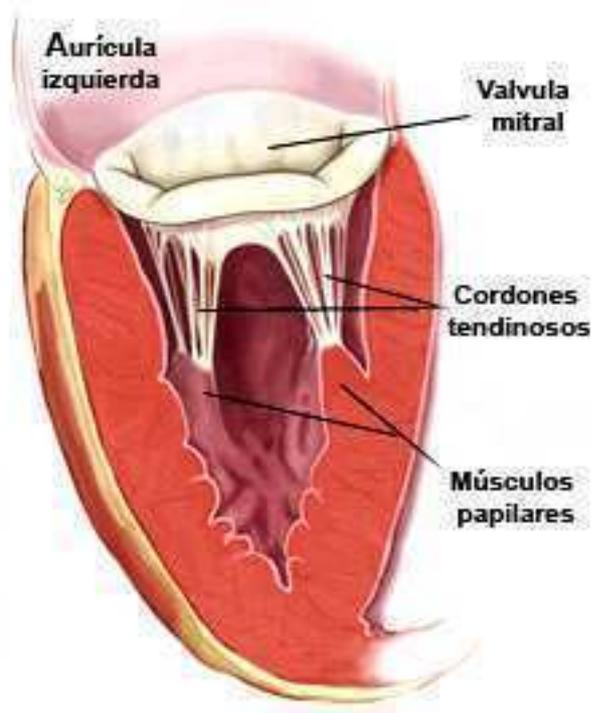


Fig. 2.6. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo con ambos músculos papilares y cordones tendinosos.

Para diseccionar los músculos papilares (Fig. 2.7) se realizó un corte longitudinal en la pared ventricular izquierda, paralelo al septum cardíaco. Expuestos así ambos músculos columnares, se procedió a diseccionar cada uno de ellos paralelamente a su eje longitudinal, a partir de su extremo superior, separándolo cuidadosamente de la pared hasta llegar a su extremo inferior. Para poder fijar el músculo al soporte experimental sin dañarlo, se dejó en su extremo una porción muy pequeña de pared ventricular. La longitud del músculo papilar se determinó al final de cada experimento con una regla milimétrica; el músculo fue luego secado y pesado con una balanza Mettler H54AR con una precisión de 0.01mg. Con estos parámetros se calculó el área de la sección transversal como el cociente entre su peso y su longitud,

asumiendo que el músculo es un cilindro con una densidad de 1.0.

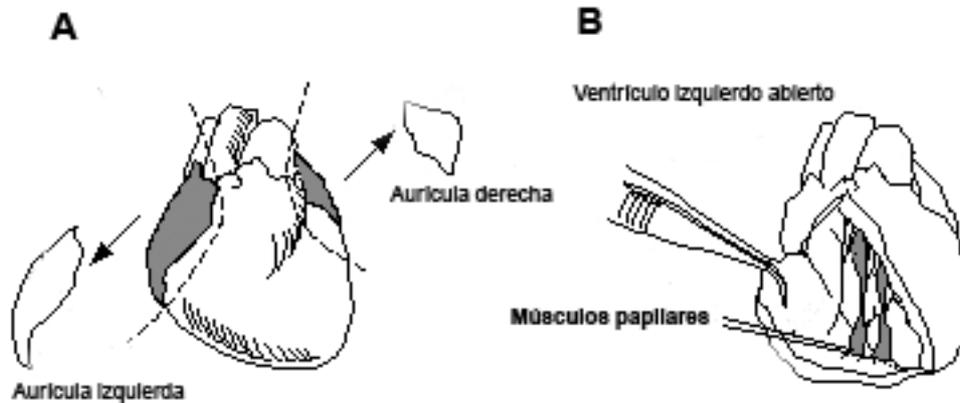


Fig. 2.7. Disección de músculo papilar de ventrículo izquierdo. A. Esquema frontal del corazón sin aurículas. B. En el interior del ventrículo izquierdo, se observan los dos músculos papilares.

2.6. Disección de los ventrículos

Para separar el ventrículo izquierdo del derecho, el corazón se fijó a través de las aurículas con unas finas agujas de acero inoxidable a una superficie de parafina contenida en el interior de una caja de Petri. Se realizó un corte longitudinal a través del tabique ventricular de forma tal que el septum quedara del lado del ventrículo izquierdo. Seguidamente se diseccionaron las aurículas y los restos de aorta, para obtener los ventrículos limpios de cualquier otro tipo de tejido. Los ventrículos separados fueron pesados en una balanza Mettler H54AR con una precisión de 0.01mg, congelados en nitrógeno líquido y guardados a -70° C.

2.7. Contracción isométrica del músculo papilar aislado.

Cuando los músculos se contraen naturalmente en el cuerpo, experimentan frecuentemente cambios simultáneos de longitud y tensión. Clásicamente, para determinar la actividad mecánica del músculo aislado, se mantiene constante uno de estos dos parámetros. Contracción isométrica significa a igual medida o longitud. En este tipo de contracción, que es la que se evaluó en el presente estudio, el músculo desarrolla fuerza a longitud constante, es decir, sin acortarse.

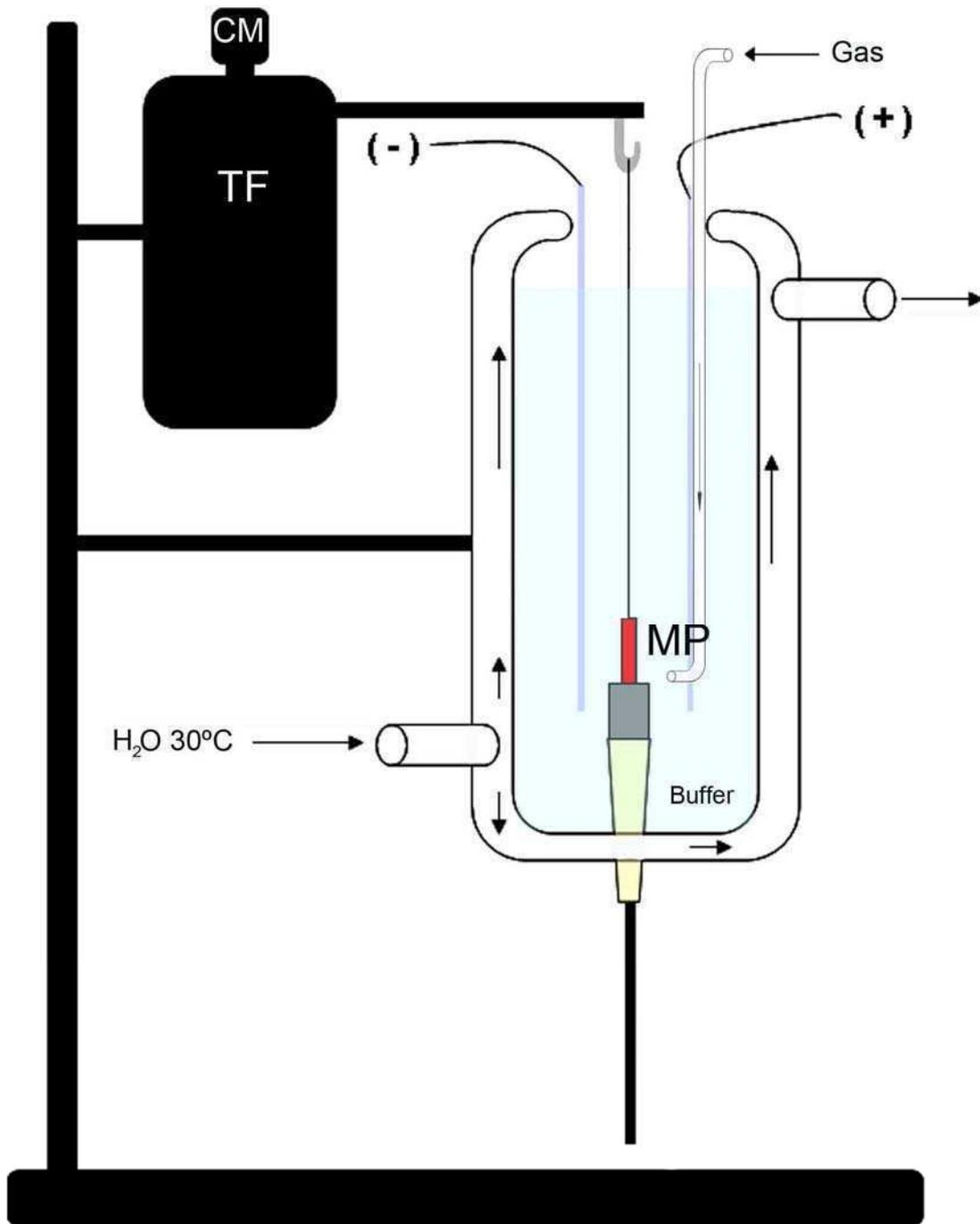


Fig. 2.8. Esquema de cámara con músculo papilar (MP) montado verticalmente en su interior, sumergido en solución Ringer a 30°C, burbujeada con la mezcla gaseosa correspondiente. El músculo se halla fijado por su base a un soporte y por su extremo apical a un transductor de fuerza (TF) provisto de un calibre micrométrico (CM). Dos electrodos de platino estimulan eléctricamente al preparado. La termostatación se realiza mediante la circulación de agua.

2.7.1. Montaje de los músculos papilares aislados

Los músculos papilares aislados fueron fijados por su base a un clip de plata y anudados con hilo de sutura de nylon 10-0 a través de su extremo superior. De esta forma fueron colocados verticalmente en el interior de sendas cámaras de vidrio conteniendo 30 ml de la solución de Ringer burbujeada con 95% de O₂ y 5% de CO₂ y termostatzada a 30°C mediante una bomba de doble circulación Haake (Figs. 2.8 y 2.9). Una vez sumergidos en las cámaras de vidrio, los extremos apicales anudados de los papilares fueron fijados al balancín de un transductor de fuerza Statham conectado a un polígrafo Beckman R511A a través de una cupla 9853 (Gende y col., 1985; Gomez Llambí y col., 1996).

2.7.2. Estimulación eléctrica del preparado

Los músculos papilares fijados en el interior de las cámaras fueron estimulados eléctricamente mediante dos electrodos de platino sumergidos en la solución buffer, paralelos al músculo papilar de forma tal de generar un campo eléctrico adecuado y constante. Pulsos rectangulares de 10 milisegundos, con una amplitud 20% mayor que el umbral eléctrico de cada preparación (aproximadamente 10 milivoltios), fueron emitidos digitalmente, a una frecuencia de 0.2 Hz (12 contracciones por minuto), mediante un estimulador controlado desde el software "Sistema de Captura y Procesamiento de Datos" (FPE). Este sistema, diseñado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA especialmente para este modelo experimental, actúa a modo de interfase de transducción de la señal analógica del polígrafo Beckman a señal digital entregada por una computadora que posee la placa del FPE, donde se registran y archivan los datos experimentales para su posterior análisis y procesamiento.

2.7.3. Longitud máxima de estiramiento del músculo

La capacidad de contracción está directamente relacionada con el grado de estiramiento de la fibra muscular. El estiramiento origina *per se* en el músculo una tensión pasiva denominada tensión de reposo (TR), determinada por el grado de estiramiento y la rigidez de los componentes elásticos del preparado. Estos influyen directamente sobre la longitud del sarcómero, que

depende del grado de superposición que presentan las bandas de actina con las de miosina.

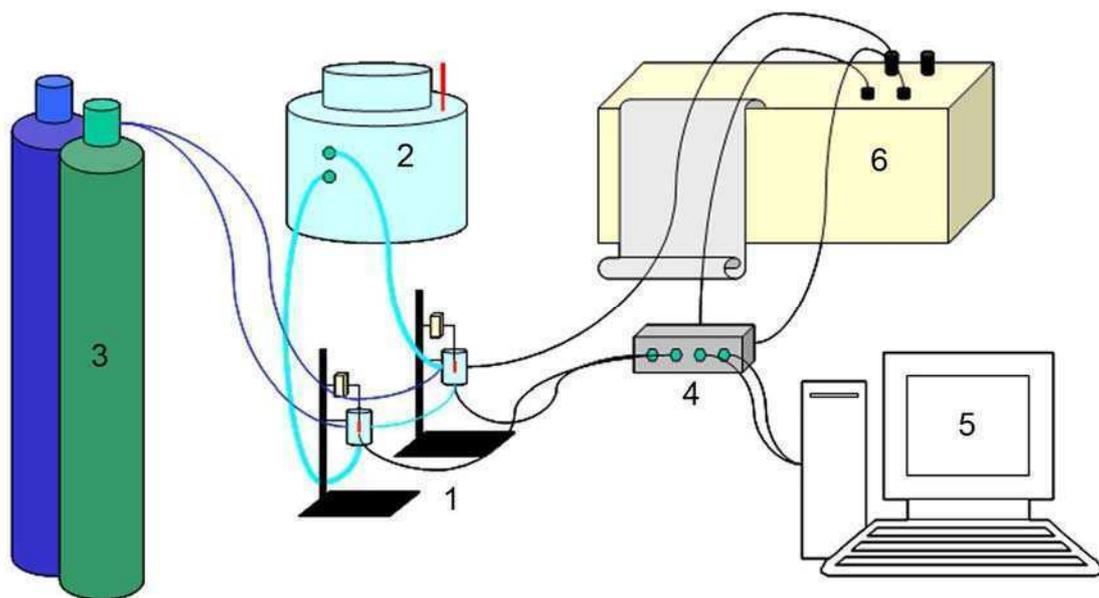
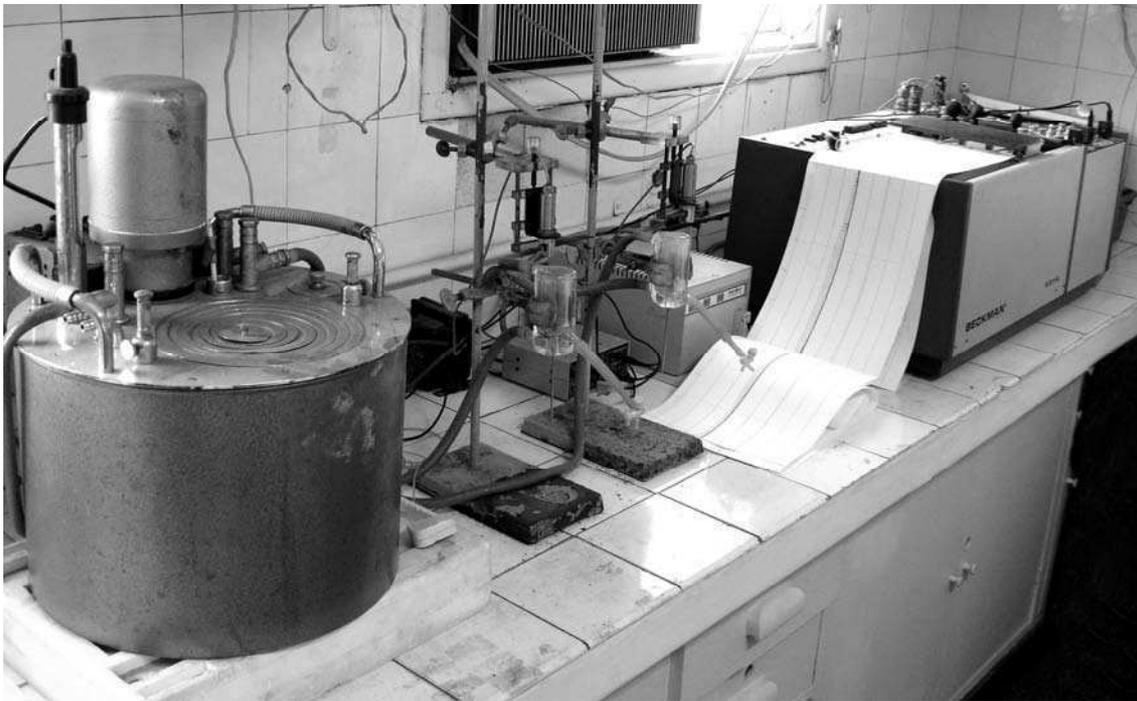


Fig. 2.9. Equipo utilizado para el estudio de la actividad mecánica de músculo papilar. En el esquema inferior se indican: 1. Cámaras termostáticas conteniendo sendos músculos papilares (ver detalle en Fig. 2.8). 2. Bomba termostática de doble circulación. 3. Tubos con mezclas gaseosas. 4. Estimulador eléctrico. 5. PC con software FPE. 6. Polígrafo.

Es este grado de superposición el que determinará en último término la magnitud de la tensión activa que la fibra es capaz de desarrollar ante un estímulo. La magnitud de esta tensión activa o tensión desarrollada (TD) está entonces directamente relacionada con la magnitud de la TR. La TR es la tensión que presenta el músculo en su estado de relajación y puede ser extrapolada a la función diastólica, en tanto que la TD es la tensión que se desarrolla activamente durante una contracción consecutiva a un estímulo despolarizante y representa la función sistólica. La función diastólica determina la función sistólica.

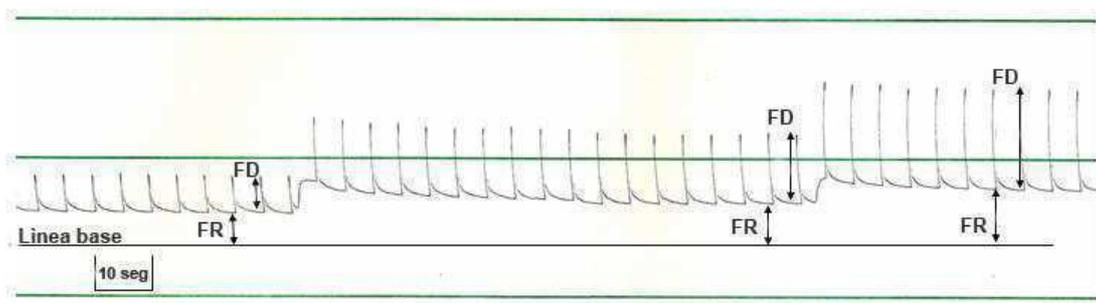


Fig. 2.10. Registro de contracciones isométricas obtenido a distintas longitudes musculares iniciales. Con cada estiramiento se produce un aumento en la fuerza de reposo (FR), con su consecuente aumento en la fuerza desarrollada (FD).

Antes de comenzar el experimento se estira el músculo, fijándose así la longitud a la que va a trabajar. La Fig. 2.10 muestra contracciones isométricas a distintas longitudes musculares iniciales. Al estirar el músculo aumenta su TR y, consecuentemente, su TD. Al acercarnos a la máxima capacidad de estiramiento de la fibra muscular fisiológicamente activa ($L. max.$), pequeños cambios en la longitud ocasionan grandes aumentos de la TR con pequeñas modificaciones en la TD. El estiramiento se detiene cuando al aumentar la longitud del músculo no hay un aumento significativo de la TD, indicando que hemos llegado a la máxima capacidad de estiramiento de la fibra muscular activa; en esta situación, la superficie de superposición de las bandas de actina y miosina es máxima y la fibra desarrolla entonces su máxima capacidad contráctil. A partir de este punto, cualquier estiramiento ocasionará un desacoplamiento de las fibras musculares, aumentando la TR, con una caída de la TD. En el presente estudio se trabajó a un 98 % de $L. max.$ a fin de

minimizar el posible desacoplamiento de las fibras musculares y obtener siempre la máxima capacidad funcional del músculo. El estiramiento se efectuó mediante un calibre micrométrico situado en el extremo superior del balancín de fuerza, permitiendo un ajuste preciso de la longitud del músculo (Gende y col., 1985).

2.7.4. Registro de la actividad mecánica muscular.

Los ciclos de contracción/relajación se registraron gráficamente en papel en forma continua con un polígrafo Beckman R511A, y simultáneamente en forma digital con el sistema FPE, guardando la señal de fuerza y tiempo para su análisis posterior. Cada registro digital obtenido consistió en un promedio de

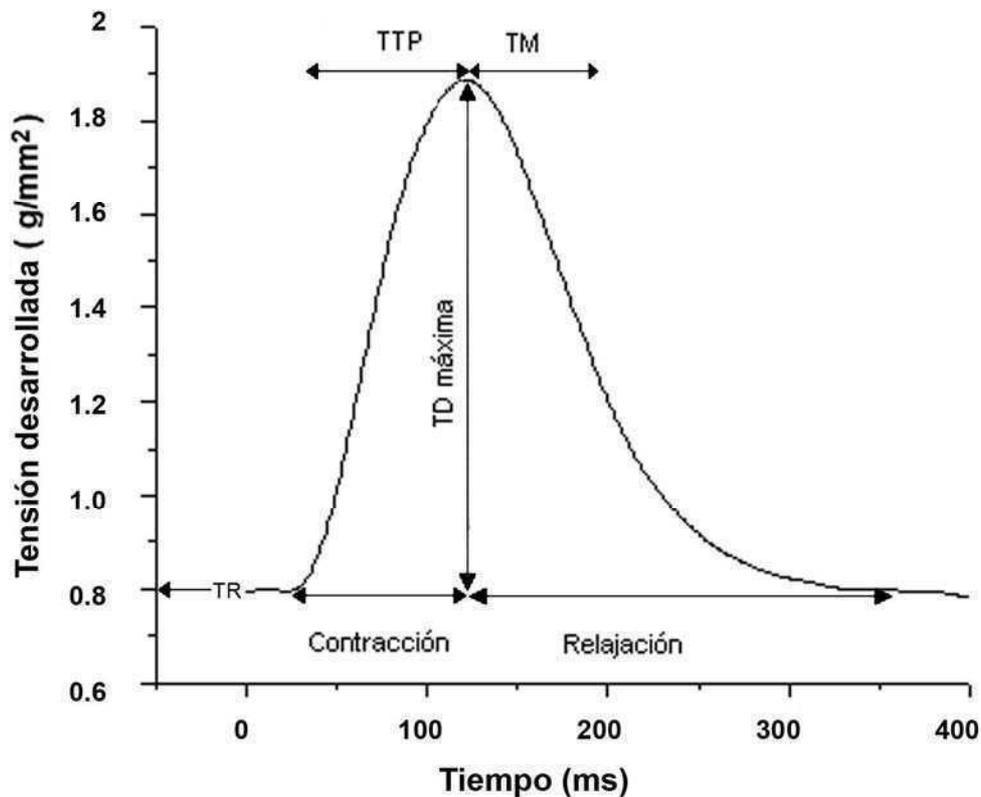


Fig. 2.11. Curva de tensión isométrica de músculo papilar indicando los parámetros de contracción/relajación: tensión desarrollada (TD), tiempo hasta la tensión pico (TTP), y tiempo medio de relajación (TM). La tensión basal corresponde a la tensión de reposo (TR).

tres ciclos de contracción/relajación consecutivos, con el objeto de minimizar el

error experimental. Los datos de fuerza (F) fueron normalizados por el área de la sección transversal del músculo papilar (A), transformándolos en tensión (T), que es la fuerza que hace el músculo por unidad de superficie ($T = F/A$), a fin de poder realizar comparaciones entre ellos.

Se determinaron los siguientes parámetros, que definen a un ciclo de contracción/relajación (Figs. 2.11 y 2.12): (1) la máxima tensión desarrollada (TD), expresada en g/mm^2 ; (2) la pendiente máxima de la curva de contracción (la primera derivada), que indica la máxima velocidad de contracción ($+T$ ó $dT/dt_{máx}$); (3) la pendiente máxima de la curva de relajación, que indica la máxima velocidad de relajación ($-T$ ó $-dT/dt_{máx}$); (4) el lapso que transcurre desde el comienzo de la contracción hasta el pico de ésta, que se denomina tiempo a la tensión pico (TTP); y (5) el tiempo que tarda TD en declinar al 50% de su valor máximo, tiempo medio de relajación (TM). Los parámetros temporales se expresaron en milisegundos y los de velocidad en $g/mm^2.ms$.

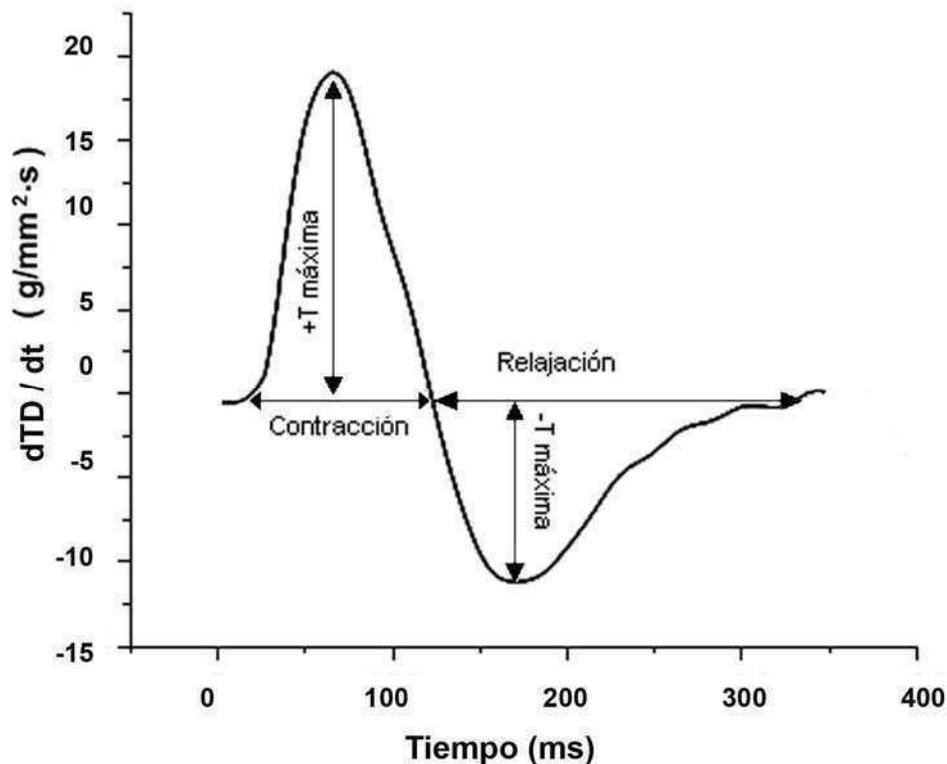


Fig. 2.12. Primera derivada de la curva de tensión isométrica de músculo papilar indicando los parámetros de velocidad de contracción/relajación medidos: máxima velocidad de contracción ($dT/dt_{máx}$, $+T$), y máxima velocidad de relajación ($dT/dt_{máx}$, $-T$).

2.8. Determinación de la actividad mecánica basal.

La actividad mecánica registrada una vez estabilizados los músculos después de 45 min de funcionamiento constante en un medio nutritivo adecuado (ver 2.5) equilibrado con una mezcla de O₂ 95% y CO₂ 5%, sin ningún tipo de intervención o de agregado de fármacos, es lo que denominamos actividad basal. La actividad basal se considera entonces representativa de la capacidad contráctil del corazón despojada de toda influencia de los procesos reguladores (nerviosos y hormonales) del organismo.

2.9. Respuesta a la hipoxia / reoxigenación.

Una vez determinada la actividad basal de los músculos, se estableció un período de 60 min de hipoxia, desplazando el O₂ del medio con una mezcla gaseosa de 95% N₂ y 5% CO₂, seguido por un período de 30 min de reoxigenación con la mezcla original de gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂), durante el cual se recuperó en diverso grado la capacidad contráctil deprimida durante la deprivación de O₂. Durante todo el período experimental, el registro y adquisición de los eventos mecánicos se realizó cada 10 min (Fig. 2.13).

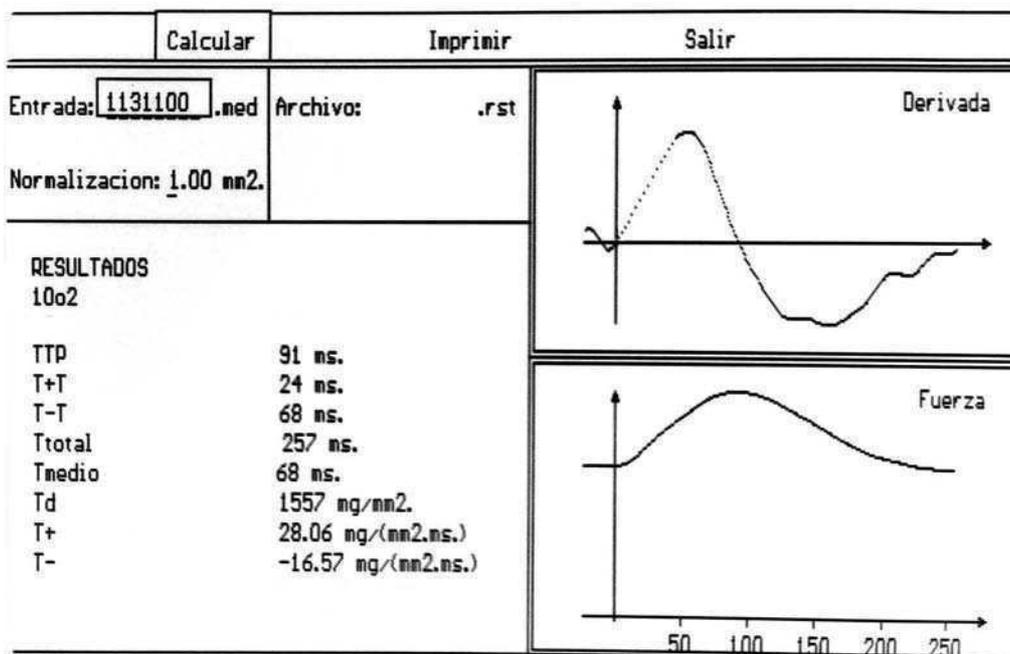


Fig. 2.13. Pantalla de cálculo de los diferentes parámetros de actividad mecánica medidos, conformado por el promedio de tres ciclos de contracción/relajación consecutivos.

2.10. Respuesta al calcio.

Se determinaron los parámetros de actividad mecánica a 0.6, 0.8, 1.3, 1.8, 2.3 y 2.8 mM Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} en el medio de incubación se incrementó cada 10 min, utilizando una solución de Cl_2Ca 54 mM. Se determinó la máxima TD en respuesta al calcio y la concentración de calcio a la cual el músculo desarrolla el 50% de la fuerza máxima (Ca^{2+}_{50}). Los mismos índices se calcularon para +T y -T.

2.11. Aislamiento de mitocondrias

El aislamiento de mitocondrias de ventrículo izquierdo se llevó a cabo por centrifugación diferencial. El tejido fue cortado y homogeneizado en nueve volúmenes (1:10) de un medio enfriado en hielo compuesto por manitol 0.23 M, sacarosa 0.07 M, EDTA 1mM y Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) durante 30 segundos con un homogeneizador de cuchillas (Kendro-Sorvall-Du Pont Institute, Asheville, NC), y luego presionado cinco veces en un homogeneizador de vidrio Teflon. Todas estas operaciones fueron llevadas a cabo entre 2 y 4°C (Costa y col., 2002; Boveris y col., 2003).

El homogeneizado fue centrifugado en una ultracentrífuga Sorvall Instruments RCSC, con un rotor 0.5 de ángulo fijo 55-34 a 800 g (2600 rpm) durante 10 minutos a 4°C, para descartar núcleos y detritos celulares, que sedimentan; el sobrenadante obtenido se centrifugó a 8000 g (8200 rpm) durante 10 minutos. El pellet obtenido, que corresponde a la fracción mitocondrial, fue lavado y resuspendido en el medio de homogeneización.

Para obtener las membranas submitocondriales (MSM), la fracción mitocondrial aislada (Fig. 2.14) fue congelada y descongelada tres veces sucesivas y homogeneizada mediante el pasaje a través de una aguja hipodérmica (jeringa de tuberculina) de calibre 29 (Boveris y col., 2003).

La concentración proteica fue determinada con reactivo de Folin-Cicalteau, utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

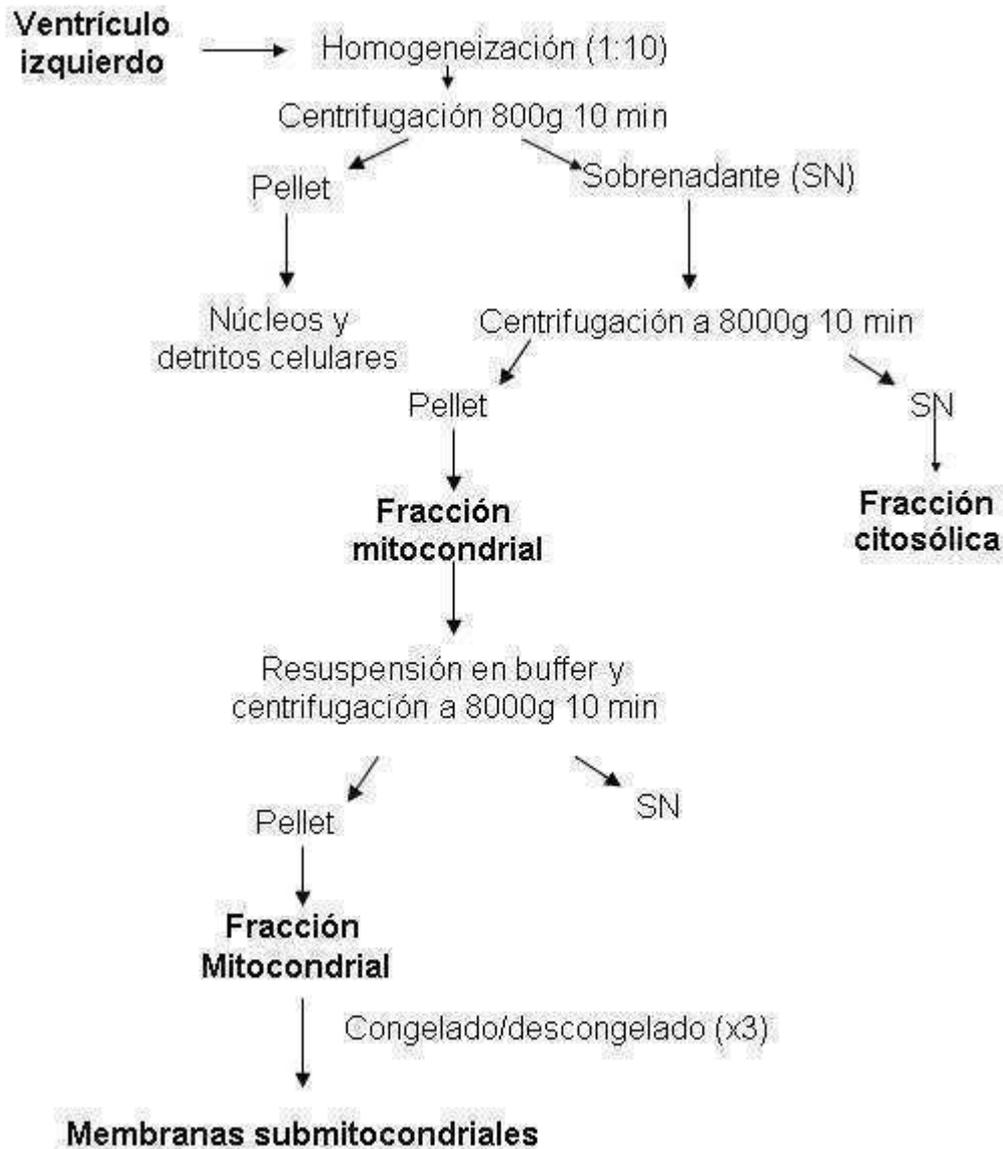
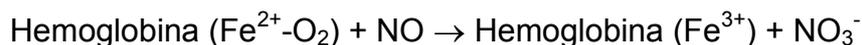


Fig. 2.14. Esquema de aislamiento de las fracciones mitocondriales y citosólicas de ventrículo izquierdo y obtención de membranas submitocondriales.

2.12. Determinación de la producción de NO

La producción mitocondrial de NO se determinó espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina (Murphy y Noack, 1994; Costa y col., 2002; Boveris y col., 2003). La técnica se basa en la reacción directa entre el NO y la forma oxigenada (forma ferrosa) de la hemoglobina, dando lugar a la formación de metahemoglobina (forma férrica) y nitrato:



La hemoglobina es una molécula tetramérica de peso molecular 68 kD, que contiene un grupo hemo por monómero. Para conocer la concentración de oxihemoglobina real, una vez preparada la solución madre, se debe titular. La concentración de hemoglobina, expresada en μM , se calcula en base a los grupos hemo, considerando el peso molecular del monómero (17 kD), y a la determinación espectrofotométrica a 577nm y a 630 nm. Debido a que la oxihemoglobina tiene su pico máximo de absorción a 577 nm, y la metahemoglobina lo tiene a 630 nm, la ecuación utilizada para calcular la concentración de oxihemoglobina es:

$$[\text{HbO}_2] = (66 \times \text{Abs}_{577}) - (80 \times \text{Abs}_{630})$$

La velocidad de producción de NO en mitocondrias intactas, membranas submitocondriales (SMM), y fracción postmitocondrial, se determinó a 37°C siguiendo la cinética de oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina a 577-591 nm ($\epsilon = 11.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos UV-visible Beckman Coulter-DU 7400 de doble longitud de onda. Las mediciones (Fig. 2.15) se realizaron cada 5 segundos durante dos minutos. Debido a la turbidez de la muestra se realizó una corrección automática de la absorbancia medida a 577 nm con la medida a 591 nm (punto isosbético). Se realizaron experimentos control, agregando N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA) 2mM como inhibidor específico de la NOS y la oxidación de la hemoglobina sensible al L-NMMA fue considerada debida a la formación de NO y expresada en nanomoles de NO por minuto por miligramo de proteína.

$$\text{Producción de NO} = \frac{[\Delta \text{ Absorbancia / min}] \times V_{\text{final}} (\mu\text{l}) \times 10^3}{(11.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times \text{prot (mg/ml)} \times V_{\text{muestra}} (\mu\text{l})}$$

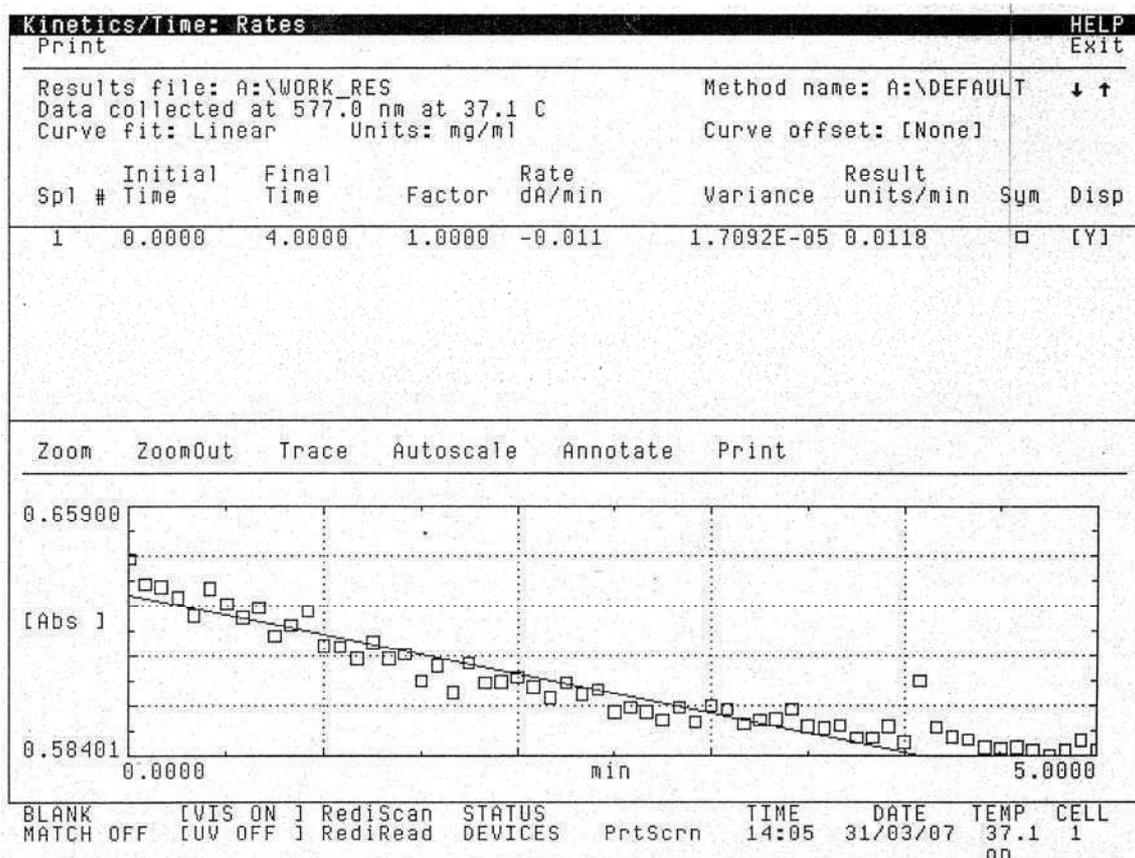


Fig. 2.15. Determinación espectrofotométrica de la producción mitocondrial de NO por el método de la oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina. Se registra la disminución de la absorbancia de la oxihemoglobina a 577 nm.

El medio de reacción utilizado para la determinación de la liberación de NO de mitocondrias intactas (0.5 mg proteína/ml) consistió en manitol 0.23 M, sacarosa 0.07 M, EDTA 1 mM, buffer fosfato 5 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, succinato 8 mM, y oxihemoglobina 20 μ M, en ausencia (estado 4) o en presencia (estado 3) de ADP 0.5 mM. El medio de reacción utilizado para la determinación de la producción de NO en SMM y fracción postmitocondrial (0.5-0.8 mg proteína/ml) consistió en buffer fosfato 50 mM, pH 7.0-7.4, L-arginina 1mM, CaCl₂ 1mM, NADPH 100 μ M, ditioneitol 10 μ M, CuZn-superóxido dismutasa (SOD) 4 μ M, catalasa (CAT) 0.1 μ M, oxihemoglobina 20 μ M (expresada por grupo hemo). El agregado de SOD tuvo como objetivo eliminar la interferencia del anion superóxido, el cual reaccionaría con el NO para producir peroxinitrito, y el de CAT, evitar la oxidación de la oxihemoglobina por el peróxido de hidrógeno.

2.13. Determinación de la actividad de NADH-citocromo c reductasa.

La actividad de NADH-citocromo c reductasa (complejos de transferencia de electrones I-III de la cadena respiratoria mitocondrial) se determinó espectrofotométricamente a 37°C en membranas submitocondriales suspendidas en buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.4. A las membranas submitocondriales (0.25 mg de proteína/ml) se añadieron 0.2 mM NADH, 25 µM citocromo c^{3+} , y 0.5 mM KCN (Navarro y Boveris, 2004). La actividad enzimática se determinó a 550 nm ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), siguiendo la variación de absorción dada por la transferencia de electrones desde el NADH (agente reductor) al citocromo c^{3+} (agente oxidante). La actividad de NADH-citocromo c reductasa se expresó como nanomoles de citocromo c reducido por minuto por miligramo de proteína.

2.14. Determinación de la actividad de citocromo oxidasa.

Para determinar la actividad de la citocromo oxidasa (complejo IV), se midió la velocidad de oxidación aeróbica del citocromo c reducido catalizada por esta enzima (Costa y col., 1988). Se utilizó buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.4, con el agregado de citocromo c^{+2} 60 µM. El citocromo c reducido fue preparado previamente por reducción del citocromo c^{3+} con ditionito de sodio, seguido por cromatografía en Sephadex G-25. La disminución de la absorbancia del citocromo c reducido a 550 nm en función del tiempo se registró con un espectrofotómetro Beckman DU 7400. La velocidad de oxidación del citocromo c se calculó como la constante de reacción de primer orden (k' , min^{-1}) por miligramo de proteína (Fig. 2.16).

2.15. Determinación del contenido de citocromos.

Los citocromos aa_3 y c se determinaron simultáneamente a partir del espectro diferencial (reducido menos oxidado) de las membranas submitocondriales (Costa y col., 1993). Se utilizó una concentración de aproximadamente 1 mg/ml de MSM suspendidas en buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.2, y se registró el espectro de extinción entre 500 y 650 nm. La reducción total de los citocromos se obtuvo por adición de una pequeña cantidad de ditionito de sodio. Los contenidos de citocromos aa_3 y c se calcularon a los pares de longitudes de onda 605-630 nm ($\epsilon = 16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 550-540 nm ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

respectivamente, y se expresaron en nanomoles por miligramo de proteína (Fig. 2.17).

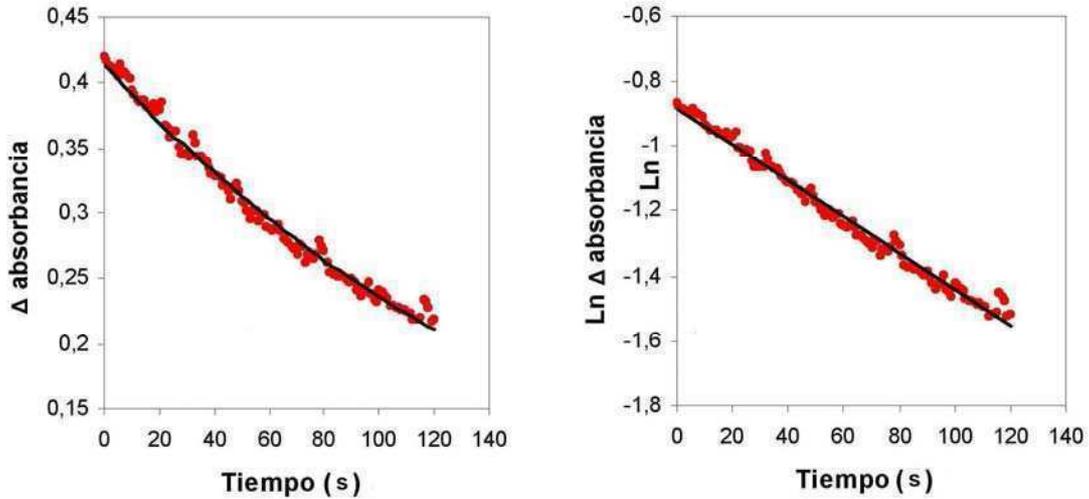


Fig. 2.16. Determinación espectrofotométrica de la actividad de la citocromo oxidasa. A. Variación de la absorbancia a 550 nm de la oxidación del ferrocitocromo c en función del tiempo. B. Rectificación de la curva para la obtención de la constante de reacción de primer orden K' (min^{-1}).

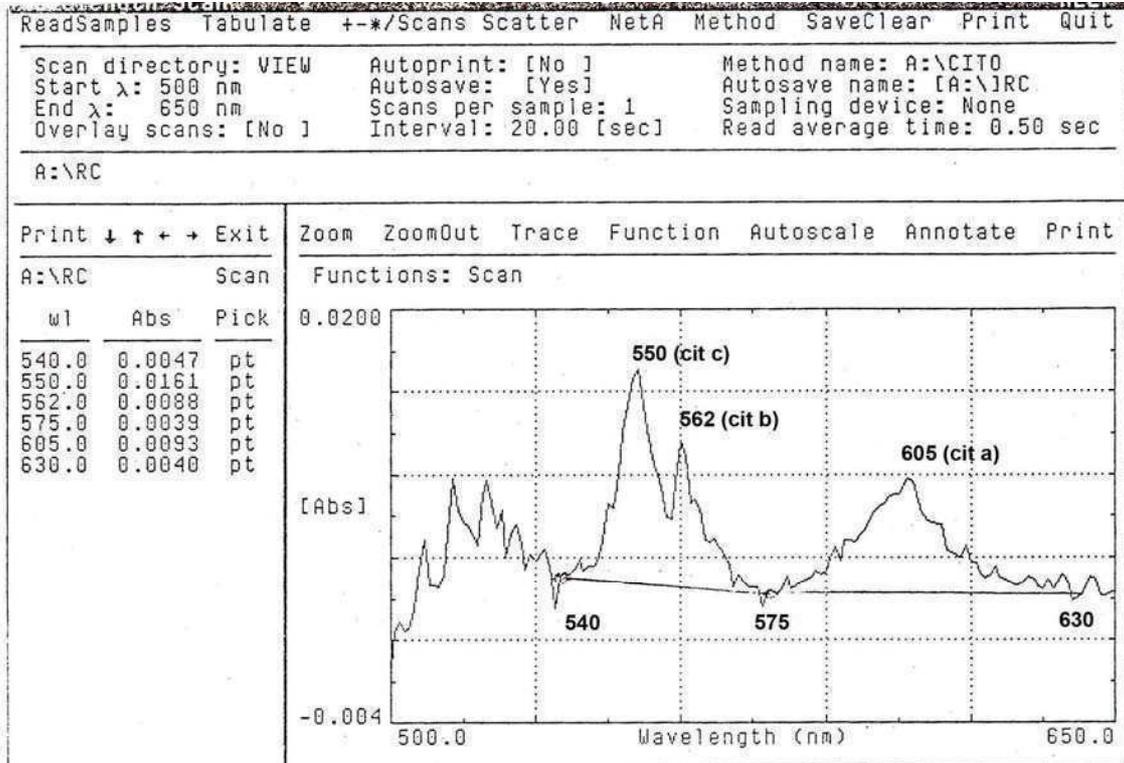


Fig. 2.17. Determinación de citocromos. Espectro diferencial (reducido menos oxidado) de membranas submitocondrias aisladas de ventrículo izquierdo

2.16. Expresión de proteínas por Western Blot

La detección electroforética de NOS se llevó a cabo en las MSM aisladas del ventrículo izquierdo de los animales en proceso de desaclimatización y en sus controles. Las muestras a ser sembradas en el gel se prepararon mezclando una parte de la muestra y dos partes de una solución conteniendo glicerol 20% (v/v), SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0.1% (p/v), Tris-HCl 125 mM (pH 6.8) y β -mercapto etanol 5% (v/v) y se las incubó durante 1 minuto a 100°C.

La electroforesis constó de una etapa de concentración proteica, seguida de una etapa de separación. Cantidades equivalentes de proteína (80 μ g) de las distintas muestras se concentraron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% (Tris 125 mM, pH 6.8), a 100V durante 10 min, hasta que el frente de corrida, indicado por el azul de bromofenol, llegó al límite inferior del gel concentrador. La separación se realizó en un gel de poliacrilamida al 7.5% (p/v) en condiciones desnaturalizantes durante 1.5 horas a 130V en una solución conteniendo glicina 190 mM, SDS 0.1% (p/v) y Tris-HCl 25 mM pH 8.3.

Los geles utilizados se armaron agregando primero el gel separador y luego el concentrador en un cassette de preparación de geles Casting Frame, Mini-PROTEAN, 3 Cell Assembly. Una vez gelificados fueron transferidos al Mini- PROTEAN 3 Electrophoresis Module Assembly, al cual se conectaron los electrodos provenientes de la fuente de poder Consort 600V-1000mA E861, para realizar la estimulación eléctrica.

Luego de la electroforesis las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una solución conteniendo glicina 190 mM, metanol 20% (p/v) y Tris-HCl 25 mM pH 8.3 durante 2 horas a 100V (Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell, BioRad, CA). Debido al voltaje utilizado, a la resistencia del sistema, y al tiempo de transferencia, se debió refrigerar el sistema para evitar el sobrecalentamiento del equipo. Finalizada la transferencia, se tiñó la membrana de nitrocelulosa colocándola en Rojo Ponceau durante 5 min, a fin de corroborar la eficacia de la operación. El colorante se lavó repetidas veces con AcH 1% y luego con agua. Para impedir la unión inespecífica de los anticuerpos se bloquearon las membranas de nitrocelulosa con leche descremada al 5% (p/v) en PBS durante 1 hora con

agitación continua. A continuación, se lavó durante 10 min con PBS 1X. Luego las membranas se incubaron durante toda la noche y con agitación continua con los anticuerpos primarios policlonales de conejo (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) anti nNOS, iNOS y eNOS, dilución 1:500 en PBS + BSA 1% (p/v) y NaN_3 0.15% (v/v). Finalizada la incubación, se realizaron 2 lavados con PBS y 1 lavado con PBS + Tween 0.15% (v/v) cada uno de 10 minutos. Finalmente, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano, dilución 1:1000 en PBS + leche descremada al 2.5% (p/v)) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación continua. Se repitieron los lavados descritos anteriormente. En todos los casos, el revelado se realizó por quimioluminiscencia con ECL (Bustamante y col., 2002). El análisis densitométrico se realizó utilizando el software SCION Image. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.17. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como los valores de la media \pm error estándar (ES). Los parámetros analizados presentaron una distribución normal y homogeneidad de varianzas. Los efectos de la hipoxia crónica y de la edad sobre los parámetros determinados se examinaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (excluyendo al grupo de 23 meses, el cual por carecer de su contraparte hipóxico se comparó con su grupo etario anterior), mientras que en los estudios de desaclimatización se utilizó ANOVA de un factor. Para las comparaciones múltiples se emplearon los tests de Student-Newman-Keuls y Bonferroni. Análisis de regresión lineal y no lineal se utilizaron para determinar las relaciones entre las variables. Los tests fueron realizados empleando el programa Microcal Origin 6.0 statistical software. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1. Efectos de la hipoxia hipobárica crónica durante la maduración y el envejecimiento. Actividad mecánica del miocardio.

3.1.1. Parámetros biológicos.

Después de 45, 68 y 74 semanas de exposición de las ratas a hipoxia hipobárica, la supervivencia fue de 95, 50 y 25%, respectivamente, mientras que a esos mismos tiempos la supervivencia de los animales controles fue de 100, 100 y 95%, respectivamente.

El hematocrito, determinado como índice de adaptación a la hipoxia, se vio incrementado ya a la primera semana de exposición y alcanzó su máximo valor a las diez semanas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Parámetros biológicos de ratas sometidas a 53.8 kPa (H) y de sus respectivos controles a 101.3 kPa (C).

Edad (meses)		2	4	8	12	18	23
Hipoxia (semanas)		1	10	26	45	74	92
Hematocrito (%)	C	46.6 ± 0.2	46.6 ± 0.2	46.5 ± 0.2	46.3 ± 1.2	41.7 ± 1.4	38.9 ± 1.3
	H	54.9 ± 1.7*	70.9 ± 1.1*†	68.2 ± 1.2*	65.1 ± 3.1*	66.6 ± 3.1*	
Peso corporal (g)	C	288 ± 22	500 ± 8†	658 ± 3†	681 ± 51	680 ± 19	700 ± 11
	H	205 ± 12*	450 ± 3*†	530 ± 34*†	562 ± 26*	595 ± 77	
Ventrículo derecho (g)	C	0.26 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.06	0.29 ± 0.02	0.32 ± 0.03
	H	0.29 ± 0.02	0.49 ± 0.01*†	0.59 ± 0.03*†	0.55 ± 0.02*	0.56 ± 0.02*	
Ventrículo izquierdo (g)	C	0.68 ± 0.05	0.99 ± 0.06†	1.07 ± 0.04	1.18 ± 0.07	1.62 ± 0.07†	1.29 ± 0.10†
	H	0.59 ± 0.03	1.11 ± 0.06†	1.15 ± 0.06	1.28 ± 0.06	1.29 ± 0.02*	
Longitud músculo papilar (mm)	C	10,5 ± 0,7	10,6 ± 0,3	11,3 ± 0,2	11,0 ± 0,3	11,1 ± 0,5	9,3 ± 0,4
	H	9,7 ± 0,4	10,4 ± 0,2	10,6 ± 0,5	10,4 ± 0,5	11,0 ± 0,3	
Músculo papilar area (mm ²)	C	0.76 ± 0.06	0.96 ± 0.05	1.36 ± 0.13†	1.66 ± 0.12	2.10 ± 0.22†	1.54 ± 0.16†
	H	0.60 ± 0.07	0.87 ± 0.04	1.26 ± 0.25†	1.47 ± 0.09	1.02 ± 0.15*†	

Los valores corresponden a la media ± ES; n = 5 ratas en cada grupo (10 músculos papilares) *p < 0.05 vs control, †p < 0.05 vs el grupo etario previo.

El aumento del peso corporal asociado a la edad fue menor en las ratas hipoxicas ya a la primera semana de exposición y el peso permaneció retrasado en relación con las ratas controles durante toda la vida (Tabla 3.1).

El peso del ventrículo derecho aumentó significativamente a partir de la décima semana de hipoxia, alcanzando un incremento del 100% con respecto al grupo control a las 26 semanas de tratamiento, mientras que en los animales controles se mantuvo esencialmente constante durante la maduración y el envejecimiento (Tabla 3.1).

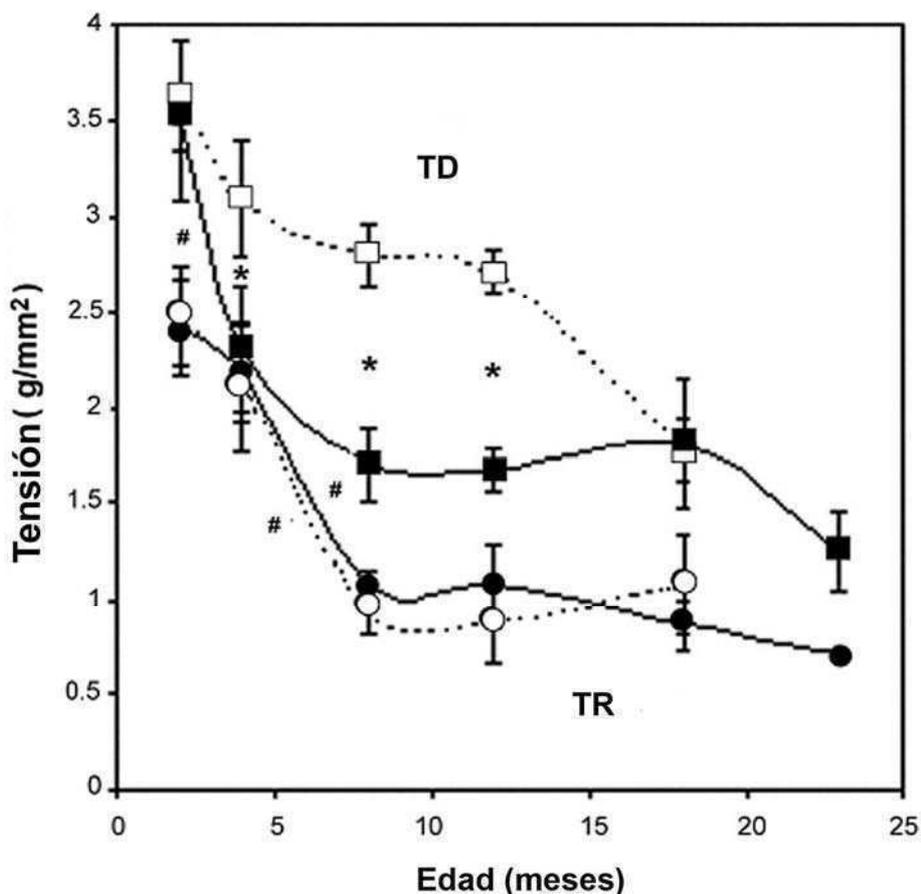


Fig. 3.1 Tensión de reposo (TR; ●C, ○H) y tensión desarrollada (TD; ■C, □H) en músculos papilares de ratas sometidas a hipoxia hipobárica (H) y sus controles a nivel del mar (C). Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ hipoxia vs. control; # $P < 0.05$ entre grupos etarios.

3.1.2. Parámetros de contractilidad basal

En ambos grupos control e hipóxico, la tensión de reposo (TR) declinó con la edad estabilizándose a los 8 meses (Fig. 3.1). La tensión desarrollada (TD) también disminuyó durante la maduración, pero esta declinación fue mucho más lenta bajo condiciones de hipoxia crónica, de tal forma que los animales hipóxicos presentaron una TD significativamente mayor que sus controles a los 4 (34%), 8 (64%) y 12 meses (62%). Durante el envejecimiento,

la TD disminuyó en la hipoxia, de forma tal que a los 18 meses de edad ambos grupos alcanzaron valores similares (Fig.3.1).

Las modificaciones ocasionadas por la edad en la TD, que representa la función sistólica, fueron acompañadas por modificaciones del mismo grado en la TR, que representa la función diastólica, de modo tal que la relación establecida entre la TD y la TR se mantuvo esencialmente constante. Por el

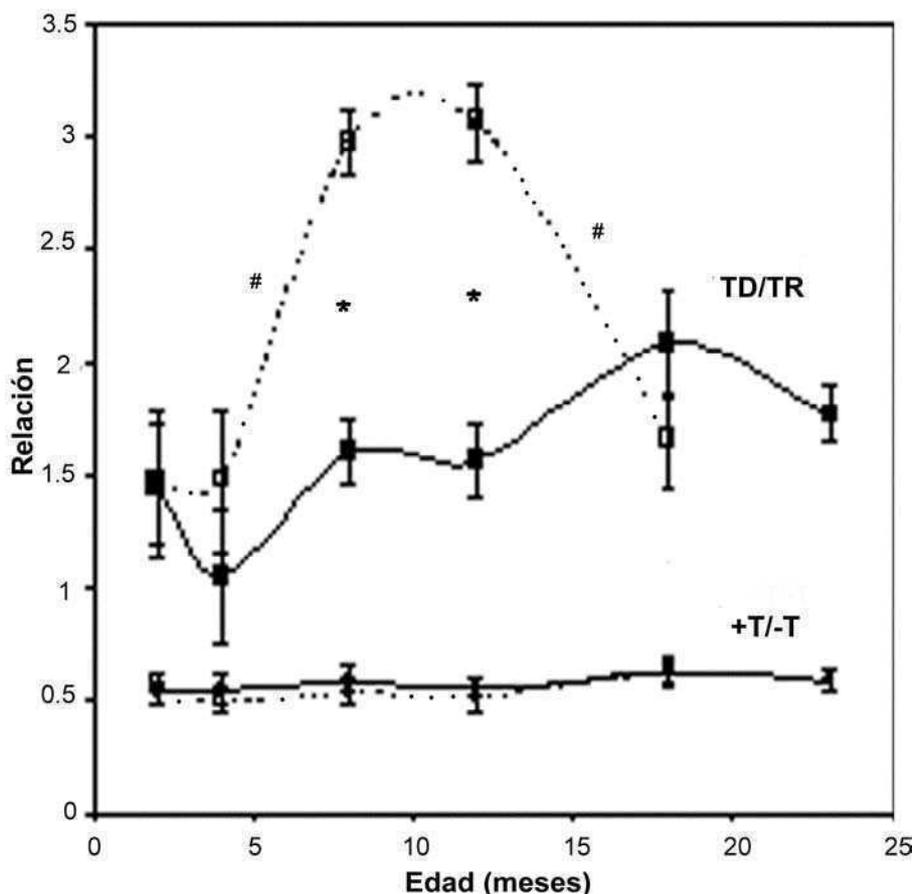


Fig.3.2. Relación tensión desarrollada/tensión de reposo (TD/TR) (■ C, □ H), y velocidad máxima de contracción/relajación (+T/-T) (◆ C, ◇ H) en ratas hipóxicas (H) y controles (C). Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ hipoxia vs. control; # $P < 0.05$ entre grupos etarios.

contrario, los grupos de animales de 8 y 12 meses sometidos a hipoxia crónica mostraron un aumento significativo de la TD, sin modificaciones en la TR, ocasionando así un desplazamiento hacia arriba de la curva TD/TR (Fig. 3.2).

Las velocidades máximas de contracción (+T) y de relajación (-T) siguieron un patrón similar al descrito para la TD (Fig. 3.3); la +T fue 67% y 61% superior en los grupos hipóxicos de 8 y 12 meses de edad,

respectivamente, con respecto a sus controles etarios, mientras que el incremento en la -T por hipoxia crónica fue estadísticamente significativo en los animales de 8 meses de edad (52%). La relación +T/-T permaneció constante durante la maduración y el envejecimiento y no se modificó por hipoxia crónica (Fig 3.2).

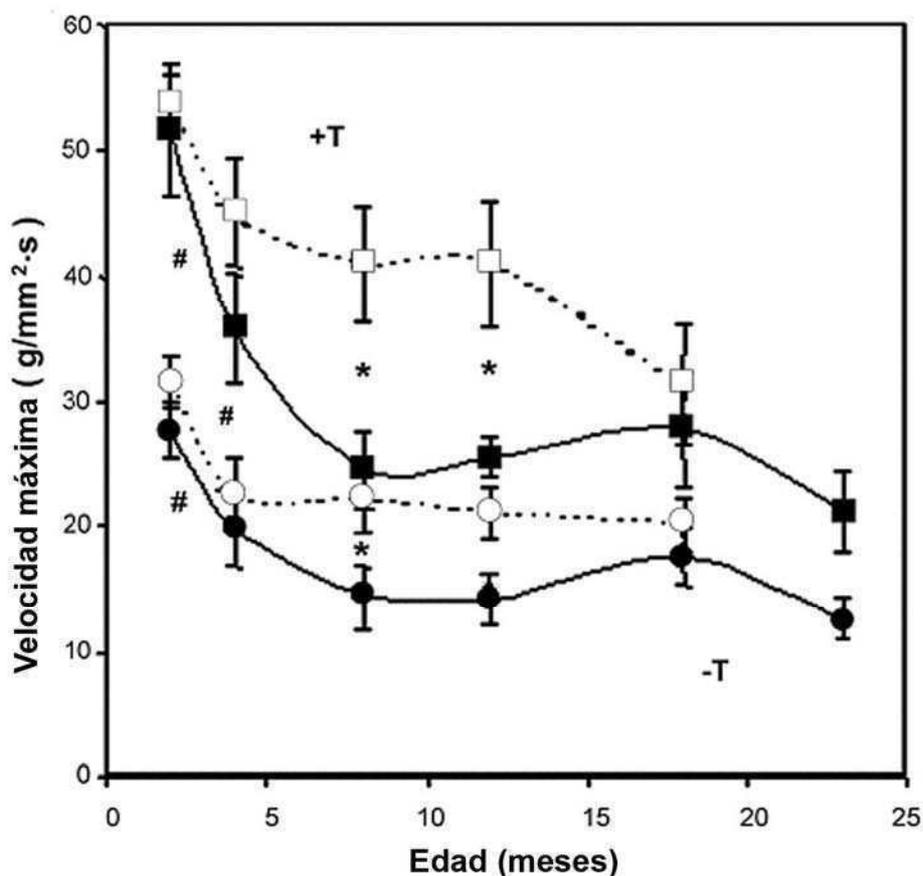


Fig.3.3. Velocidad máxima de contracción (+T, ■C, □H) y relajación (-T; ●C, ○H). Ratas hipóxicas (H) y controles (C). Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ H vs.C; # $P < 0.05$ entre grupos etarios.

En cuanto a los parámetros temporales (Fig. 3.4), el tiempo a la tensión pico (TTP) no sufrió modificaciones por la edad ni por la hipoxia crónica. El tiempo medio de relajación (TM) disminuyó en los animales controles a los 23 meses, mientras que en los hipóxicos la disminución ocurrió ya a los 18 meses. En consecuencia, se pudo observar un acortamiento en el tiempo total de contracción/relajación (TOT) con respecto a su grupo etario anterior, que resultó estadísticamente significativo en las ratas hipóxicas. Los animales hipóxicos presentaron una TD significativamente mayor que sus controles a los

4 (34%), 8 (64%) y 12 meses (62%). Durante el envejecimiento, la TD disminuyó en la hipoxia, de forma tal que a los 18 meses de edad ambos grupos alcanzaron valores similares (Fig.3.1).

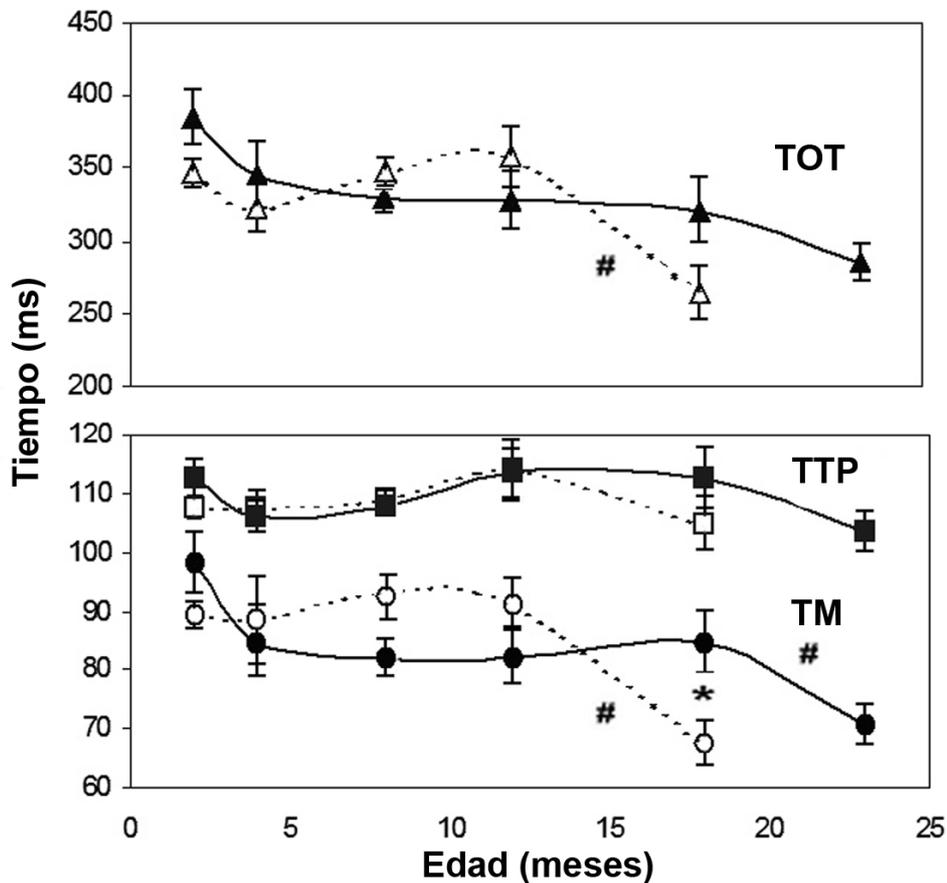


Fig. 3.4. Tiempo total de contracción/relajación (TOT, ▲ C, △ H), tiempo a la tensión pico (TTP, ■ C, □ H), y tiempo medio de relajación (TM, ● C, ○ H) en músculo papilar de ratas sometidas a hipoxia hipobárica (H) y sus controles a nivel del mar (C). Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ H vs. C; # $P < 0.05$ entre los grupos etarios.

3.1.3. Hipoxia y reoxigenación

La tolerancia a 60 min de hipoxia y la capacidad de recuperación durante un período subsiguiente de 30 min de reoxigenación fue evaluada en los músculos papilares de ratas sometidas a hipoxia hipobárica por 1 semana (2 meses de edad, “jóvenes”), 26 semanas (8 meses de edad, “adultas”) y 74 semanas (18 meses de edad, “viejas”), de sus respectivos controles etarios, y del grupo de animales normóxicos de 23 meses (“senescentes”).

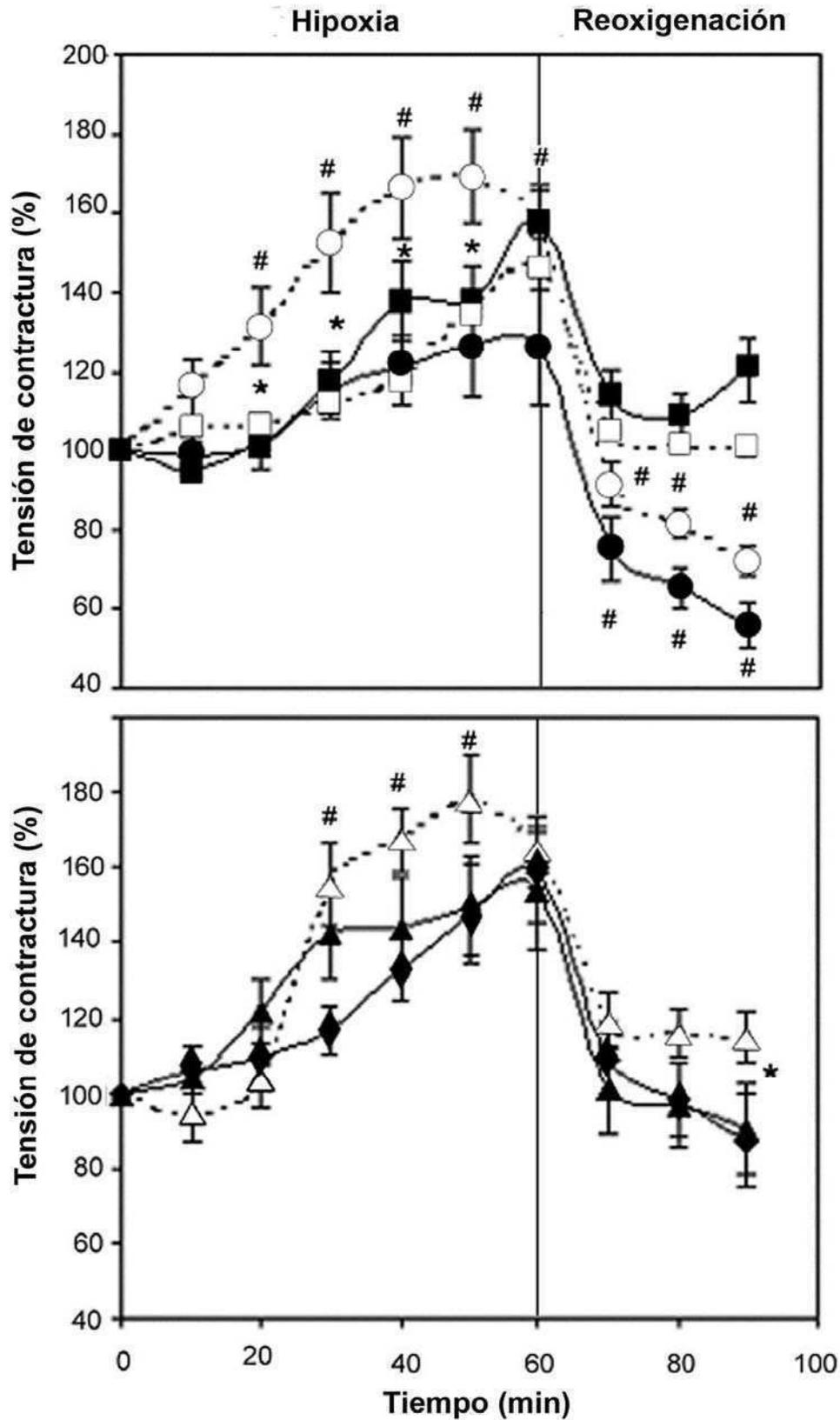


Fig. 3.5. Tensión de reposo (TR), expresada como % de los valores basales, en músculo papilar de ratas hipóxicas (H) y controles (C) de 2 (●C,○H), 8 (■C,□H), 18 (▲C,△H) y 23 (◆C) meses de edad, durante un periodo de hipoxia y reoxigenación. Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ H vs. C; # $P < 0.05$ vs. el grupo etario más cercano.

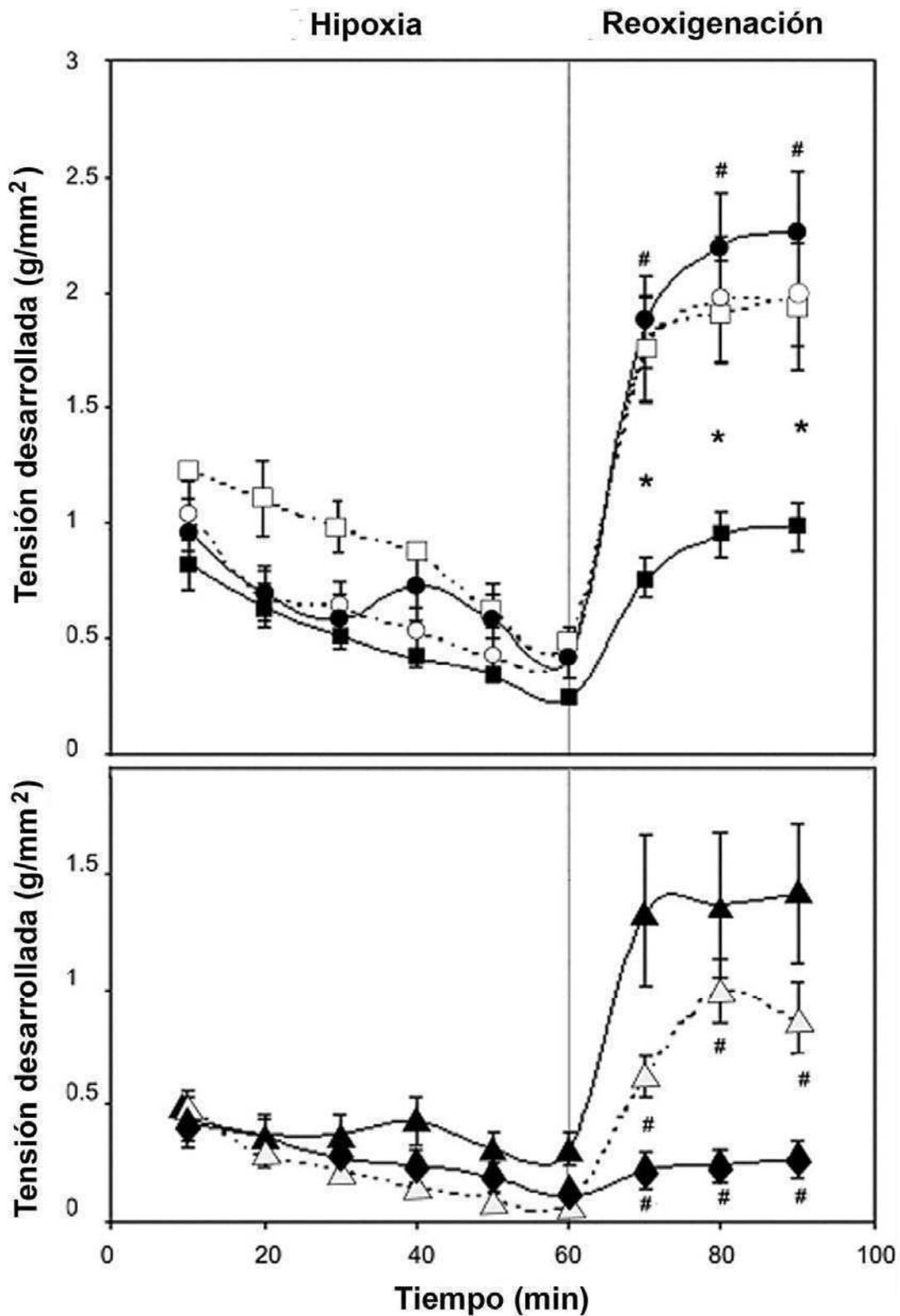


Fig. 3.6. Tensión desarrollada (TD) por músculo papilar de ratas hipóxicas (H) y controles (C) de 2 (●C,○H), 8 (■C,□H), 18 (▲C,△H) y 23 (◆C) meses de edad, durante un periodo de hipoxia y reoxigenación. Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ H vs. C; # $P < 0.05$ vs. el grupo etario más cercano.

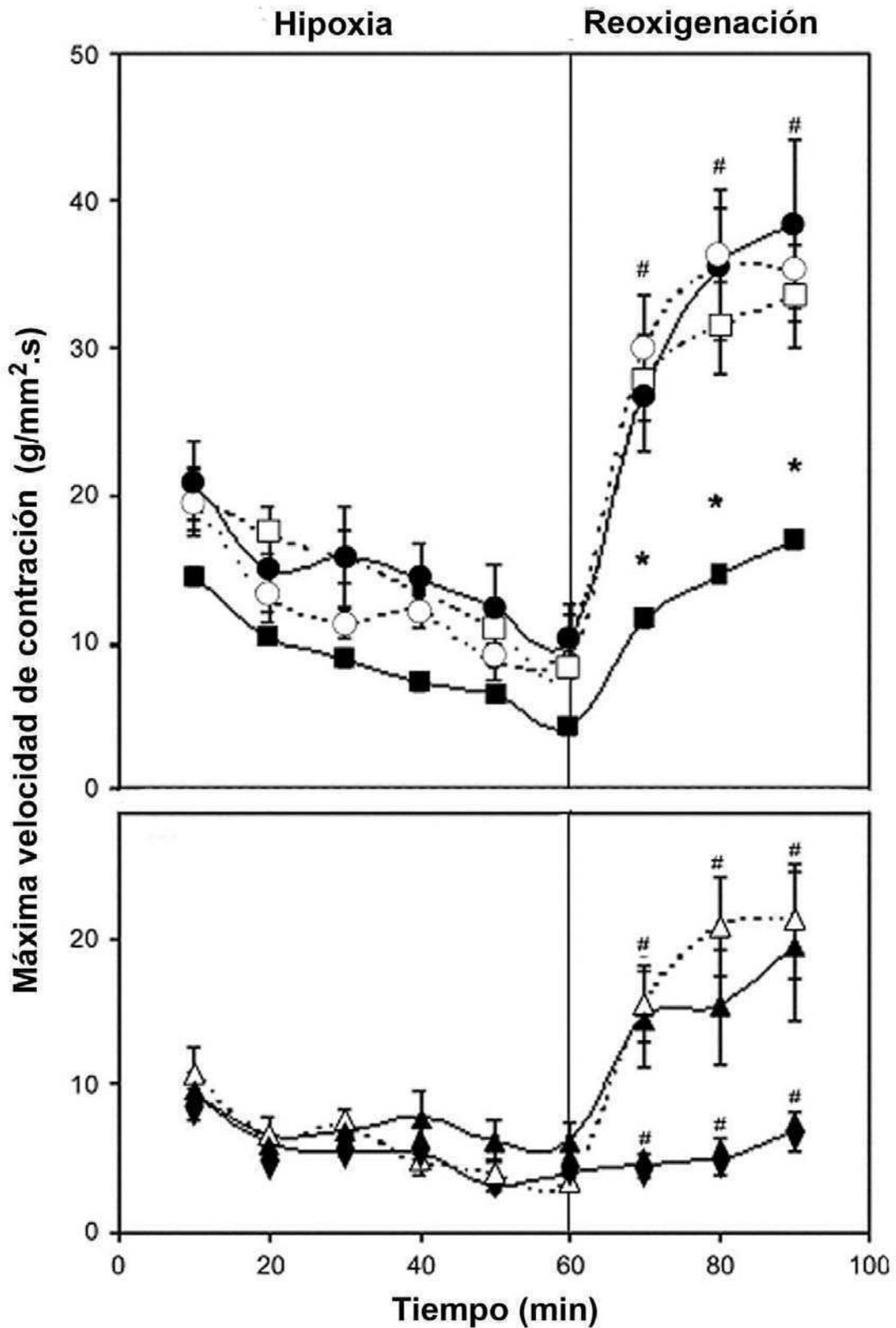


Fig. 3.7. Máxima velocidad de contracción (+T) en músculo papilar de ratas hipóxicas (H) y controles (C) de 2 (●C,○H), 8 (■C,□H), 18 (▲C,△H) y 23 (◆C) meses de edad, durante un periodo de hipoxia y reoxigenación. Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ H vs. C # $P < 0.05$ vs. el grupo etario más cercano.

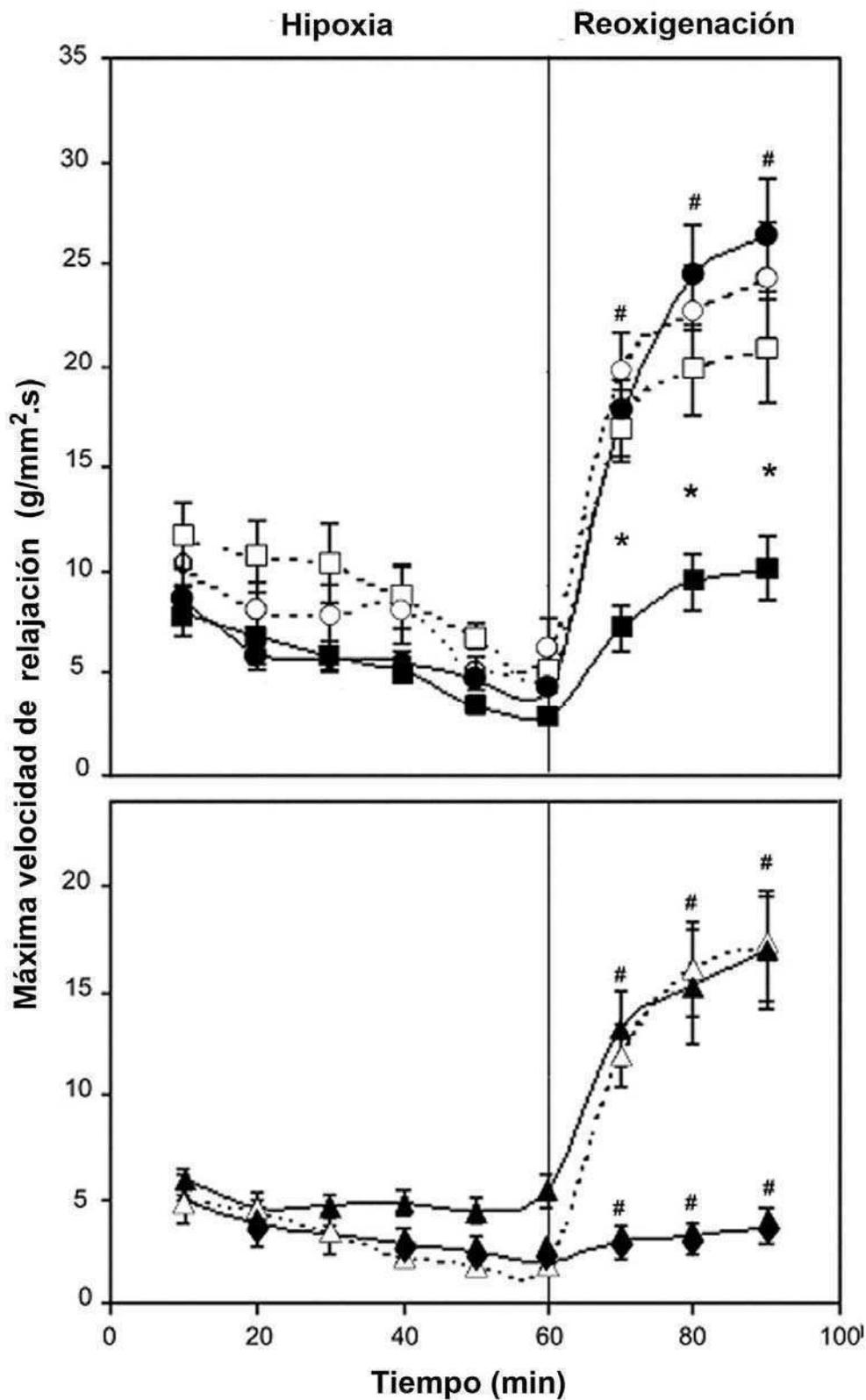


Fig. 3.8. Máxima velocidad de relajación (-T) en músculo papilar de ratas hipóxicas (H) y controles (C) de 2 (●C,○H), 8 (■C,□H), 18 (▲C,△H) y 23 (◆C) meses de edad, durante un periodo de hipoxia y reoxigenación. Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ H vs. C; # $P < 0.05$ vs. el grupo etario más cercano.

La tensión de contractura, expresada como el porcentaje del valor prehipóxico de la TR (Fig.3.5.), no mostró diferencias entre los grupos etarios controles durante la hipoxia aguda. Los animales expuestos a hipoxia hipobárica por 26 semanas se comportaron como los controles, mientras que los animales sometidos por 1 ó 74 semanas a hipoxia hipobárica desarrollaron tensión de contractura más rápidamente que los controles, indicando la ausencia de una adaptación efectiva en estos dos extremos temporales del tratamiento. Durante la reoxigenación, la TR recuperó sus valores prehipóxicos en todos los grupos, mientras que en las ratas jóvenes disminuyó aún más, alcanzando 60-70% de su valor basal prehipóxico.

Durante la hipoxia aguda, la TD no mostró diferencias significativas entre los grupos y después de los 60 min de hipoxia todos los grupos presentaron una TD funcionalmente mínima, en el rango de 0.1-0.5 g/mm² (Fig 3.6), lo que representa 8-15% de sus valores prehipóxicos. La recuperación de la TD durante la reoxigenación fue significativamente superior en los adultos hipóxicos (71%) que en sus controles (57%). Los animales senescentes recobraron tan solo 32% de su valor basal. Durante la hipoxia y la reoxigenación, +T (Fig 3.7) y -T (Fig 3.8) mostraron un comportamiento similar a TD. Al finalizar el periodo de reoxigenación la recuperación de la máxima velocidad de contracción fue del 82% en los animales adultos hipóxicos y del 69% en sus respectivos controles y solamente del 32% en los animales senescentes. La recuperación de la máxima velocidad de relajación fue del 93% en ratas hipóxicas adultas y del 69% en sus controles, mientras que los animales senescentes recuperaron tan solo 30% de su valor basal.

3.2. Desaclimatización. Duración de la protección conferida al miocardio por la hipoxia hipobárica crónica.

3.2.1. Parámetros biológicos.

El peso corporal, disminuido durante la aclimatización con respecto a los controles, se encontró normalizado a los dos meses de suspendida la hipoxia (Fig. 3.9).

Los valores del hematocrito, marcadamente aumentado en las ratas sometidas a hipoxia (tabla 3.1) y usualmente un sensible indicador de la adaptación a la altura, fueron representados individualmente durante la

desaclimatización (Fig. 3.10), mostrando una declinación con $t_{1/2}$ de 27 días y normalización a 2 meses.

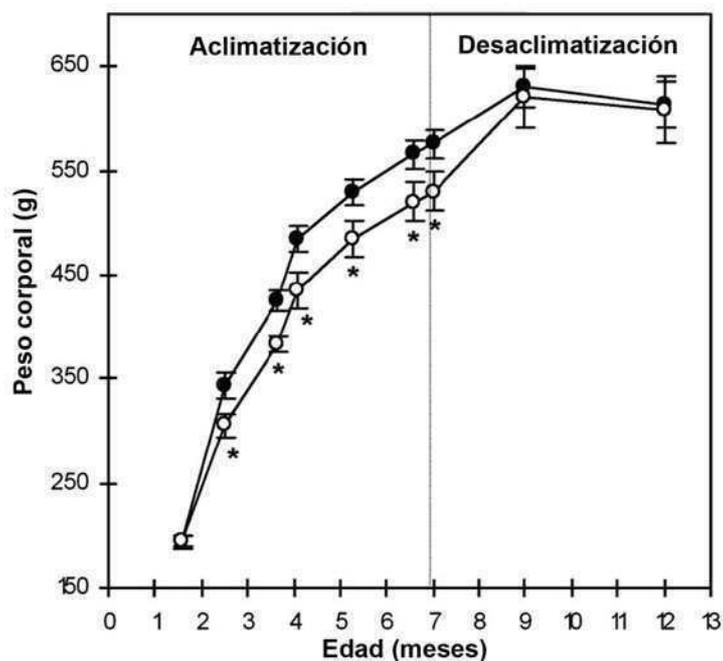


Fig. 3.9. Peso corporal de ratas sometidas a 53.8 kPa y subsecuentemente restituídas a 101.3 kPa (○) y sus controles mantenidos a 101.3 kPa (●). Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ vs. control.

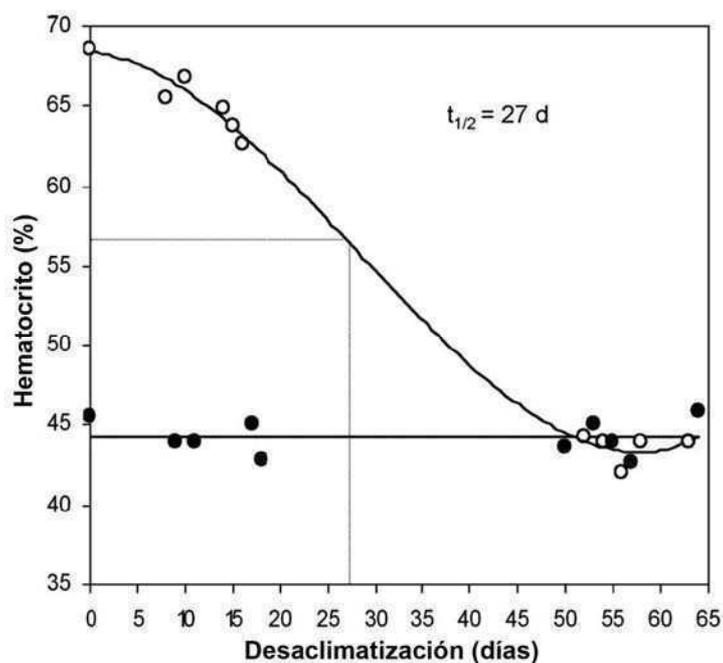


Fig. 3.10. Valor globular durante la desaclimatización de ratas previamente sometidas a hipoxia hipobárica (53.8 kPa) durante 5 meses (○) y de sus controles mantenidos a 101.3 kPa (●). $t_{1/2}$, tiempo medio.

El peso del ventrículo derecho, aumentado en más de un 100% por efecto de la altura, declinó durante la desaclimatización con un $t_{1/2}$ de 3.7 meses. A los 5 meses de normoxia, el VD estaba aún hipertrofiado, mientras que el peso del VI, que no había sido afectado por la hipoxia, tampoco sufrió modificaciones durante la desaclimatización (Fig. 3 .11).

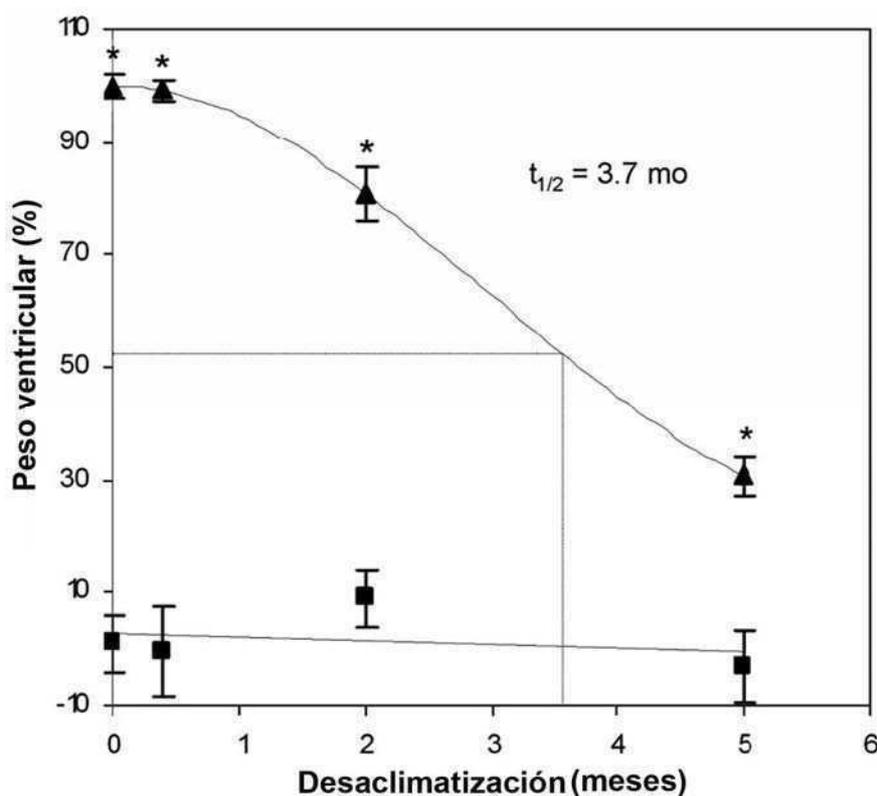


Fig. 3.11. Peso del ventrículo derecho (▲) e izquierdo (■) durante la desaclimatización de ratas previamente sometidas a hipoxia hipobárica (H) durante 5 meses, expresado como porcentaje de incremento sobre los valores de las ratas controles (C). Los valores son la media \pm ES. * $P < 0.05$ H vs. C.

3.2.2. Parámetros de contractilidad basal. Respuesta al calcio.

Como se describe en 3.1.2, la actividad mecánica del músculo papilar, medida como TD, +T y -T a 1,35 mM de Ca^{2+} , fue dependiente de la edad y resultó marcadamente incrementada en los animales aclimatizados. Confirmando que durante el periodo en el cual se realizó el estudio de desaclimatización (ratas de 7 a 12 meses de edad) la actividad mecánica no fue influenciada por la edad de los animales (ver Fig.3.1 y 3.3), los parámetros contráctiles obtenidos en los diferentes grupos etarios de ratas controles no

resultaron significativamente diferentes entre ellos y fueron tratados estadísticamente como un sólo y homogéneo grupo control.

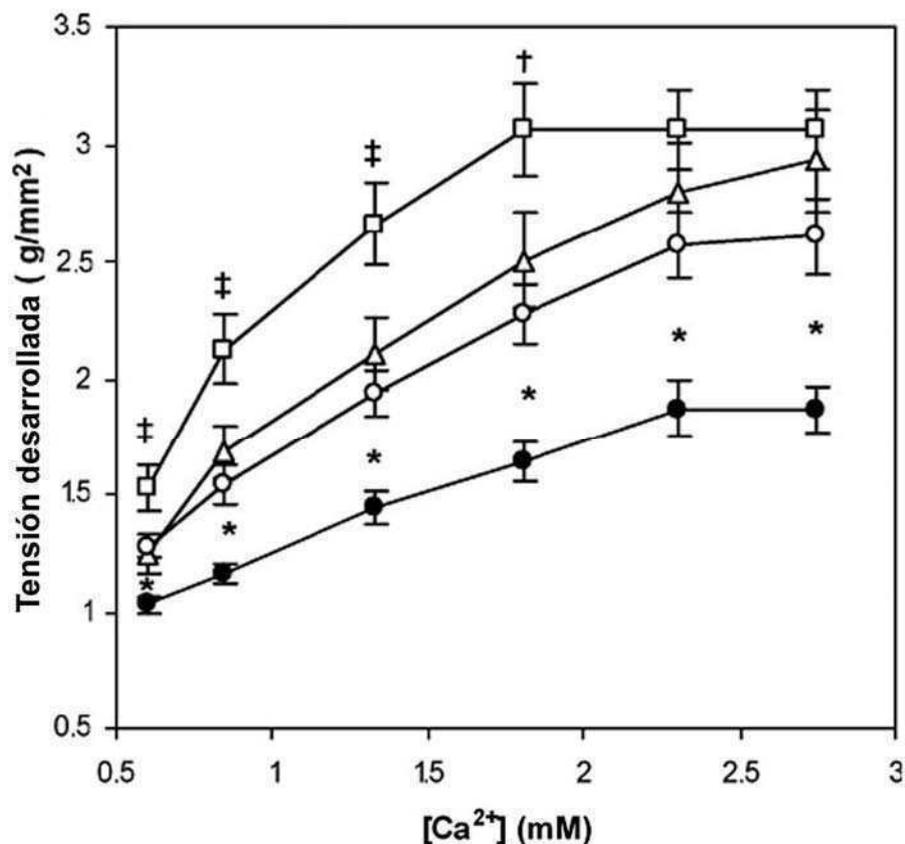


Fig. 3.12. Respuesta al calcio de la tensión desarrollada (TD) por músculos papilares aislados de ratas desaclimatizadas durante 0.4 (□), 2 (Δ) y 5 (○) meses después de la exposición a hipoxia hipobárica crónica, y de sus controles mantenidos a nivel del mar (●). Los valores son la media \pm ES. * $P < 0.05$ control vs. desaclimatizados; † $P < 0.05$ vs. grupo 5 meses; ‡ $P < 0.05$ vs. grupos 2 y 5 meses.

La Fig. 3.12 muestra la respuesta al Ca^{2+} de la TD en animales controles y desaclimatizados. En todo el rango de concentración de Ca^{2+} utilizado, la TD fue significativamente superior en todos los grupos prehipóxicos con respecto al grupo control. A Ca^{2+} máximo, la TD fue un 65, 58 y 40% mayor que en los controles a 0.4, 2 y 5 meses, respectivamente. Aunque a Ca^{2+} máximo las diferencias entre los grupos desaclimatizados no resultaron estadísticamente significativas, se pudo observar una clara tendencia a la disminución en la TD con el tiempo de normoxia. La +T y la -T siguieron un patrón similar al descrito para la TD (Tabla 3.2). El porcentaje promedio de incremento de estos tres parámetros (Fig. 3.18) mostró una declinación lineal durante la

desaclimatización con un $t_{1/2}$ de 5.9 meses. A bajas concentraciones de Ca^{2+} (hasta 1.81 mM), la TD fue significativamente mayor en el grupo de ratas más recientemente hipóxicas que en los otros grupos experimentales, sugiriendo una mayor sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos cardíacos durante la fase temprana de desaclimatización.

Tabla 3.2. Respuesta al Ca^{2+} y recuperación posthipoxia durante la desaclimatización.

	Desacl. (meses)	Ca^{2+} (mM)							
		0.60	0.84	1.35	1.81	2.30	2.75	Pre H/R	Post H/R
<i>Parámetro, g/mm²·s</i>									
+T	0.4	22 ± 4*	31 ± 2*	44 ± 3*†	53 ± 3*†	54 ± 2*	54 ± 3*	32 ± 2*†	
	2	20 ± 1	29 ± 2*	40 ± 2*	48 ± 3*	52 ± 3*	52 ± 4*	29 ± 3*	
	5	20 ± 1	25 ± 1	33 ± 1*	39 ± 2*	43 ± 2*	45 ± 3*	23 ± 2*	
	Control	15 ± 1	19 ± 1	24 ± 1	28 ± 2	31 ± 2	32 ± 2	14 ± 1	
-T	0.4	10 ± 2	18 ± 1*	25 ± 2*	30 ± 2*	33 ± 2*	33 ± 2*	22 ± 2*	
	2	10 ± 1	17 ± 1*	22 ± 1*	27 ± 2*	30 ± 2*	31 ± 2*	21 ± 2*	
	5	12 ± 1	15 ± 1	20 ± 1	24 ± 1*	26 ± 1*	27 ± 2*	17 ± 2*	
	Control	9 ± 1	11 ± 1	15 ± 1	18 ± 1	19 ± 1	20 ± 1	11 ± 1	

Los valores corresponden a la media ± ES; +T, máxima velocidad de contracción; -T, máxima velocidad de relajación; Desacl, desaclimatización; H/R, hipoxia-reoxigenación. * $P < 0.05$ vs. control; † $P < 0.05$ vs. grupo desaclimatizado 5 meses.

3.2.3. Hipoxia y reoxigenación.

Como se describe en 3.1.3, la recuperación de la TD, +T y -T del músculo papilar después de 60 min de hipoxia y 30 min de reoxigenación mejoró notablemente en los animales adultos sometidos a hipoxia en comparación con sus respectivos controles normóxicos.

A los 5 meses de suspendido el estímulo hipóxico la cardioprotección conferida por la altura simulada era todavía significativa (Fig. 3.13 y tabla 3.2). La TD fue 129, 107 y 71% superior en las ratas desaclimatizadas por 0.4, 2 y 5 meses, respectivamente, que en las ratas controles. La +T y la -T mostraron incrementos similares. Los tres parámetros analizados mostraron una declinación lineal durante la desaclimatización, con un $t_{1/2}$ promedio de 5.3 meses (Fig. 3.18).

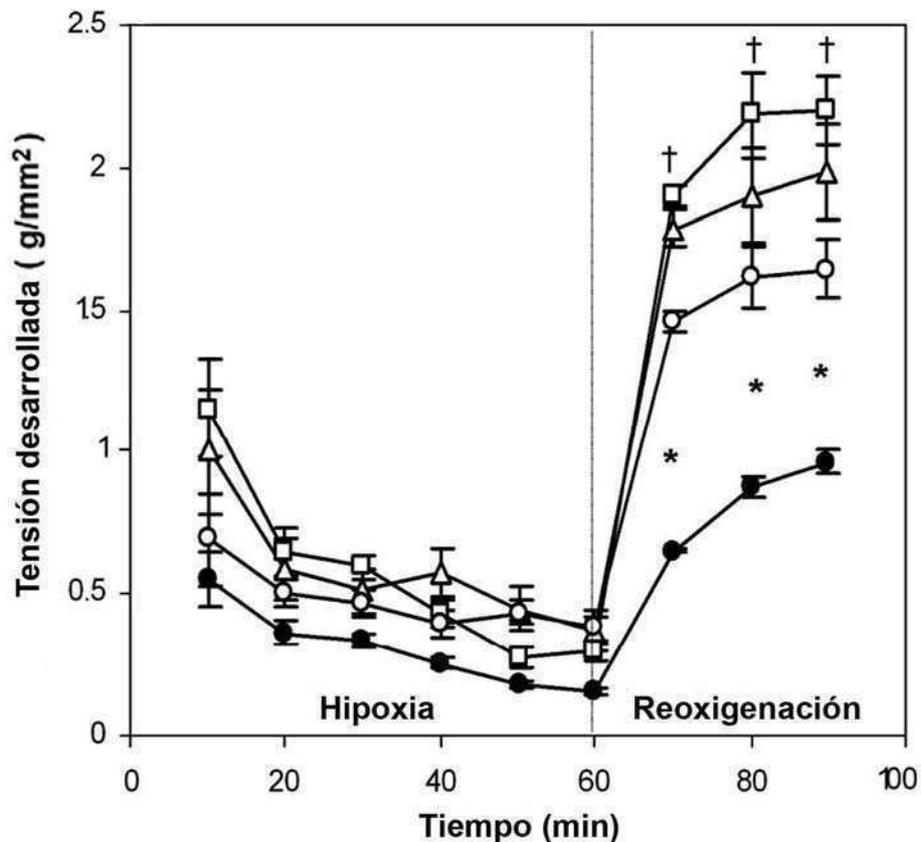


Fig. 3.13. TD en músculo papilar de ratas desaclimatizadas durante 0.4 (□), 2 (Δ) y 5 (○) meses después de la exposición a la hipoxia hipobárica crónica, y de sus controles mantenidos a presión atmosférica ambiental (●), durante un periodo de hipoxia y reoxigenación. Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ control vs. desaclimatizados; † $P < 0.05$ vs. grupo 5 meses.

3.3. Mecanismos celulares. Participación de la mtNOS en la protección conferida al miocardio por la hipoxia hipobárica crónica.

3.3.1. Producción de NO por mitocondrias cardíacas.

Los principales requerimientos bioquímicos para la actividad de la mtNOS cardíaca fueron determinados en fragmentos de membranas submitocondriales aisladas de ratas jóvenes (2 meses de edad). La actividad, medida al pH óptimo de 7.4, fue de $0.69 \text{ nmol NO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ (Tabla 3.3). La oxidación de la oxihemoglobina fue dependiente de la presencia de los sustratos NADPH y L-arginina y del cofactor Ca^{2+} y fue inhibida en un 92% por la presencia de L-NMMA. Este patrón general de actividad bioquímica hace a la mtNOS similar a la eNOS y a la nNOS.

Las mitocondrias acopladas, aisladas asimismo de corazón de ratas macho adultas jóvenes, mostraron una liberación de NO al medio que fue mayor durante la respiración en el estado 4 o de reposo (con sustrato y sin ADP; $0.62 \text{ nmol NO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) que en el estado 3 o activo (con sustrato y ADP; $0.37 \text{ nmol NO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) (Tabla 3.4).

Tabla 3.3. Producción de óxido nítrico en membranas submitocondriales de corazón de rata determinada por el método de la oxihemoglobina a pH 7.4

Condiciones experimentales	Oxidación de HbO ₂ , nmol hemo·min ⁻¹ ·mg proteína ⁻¹
Mezcla de reacción completa	0.75 ± 0.02
Adicionado 3mM L-NMMA	0.06 ± 0.01
Omitido 0.3 mM L-arginina	0.06 ± 0.01
Omitido 0.1 mM NADPH	0.09 ± 0.01
Omitido 1 mM Cl ₂ Ca	0.18 ± 0.02

Los valores corresponden a la media \pm ES. La mezcla de reacción completa se describe en 2.1.2. La producción de óxido nítrico (NO) fue calculada como la diferencia entre la reacción con mezcla completa y con el agregado de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA). HbO₂, oxihemoglobina.

El NO liberado al medio por las mitocondrias es una fracción del total de la producción mitocondrial de NO, ya que parte del NO reacciona con el anión superóxido (O₂⁻) para formar peroxinitrito (ONOO⁻) en la matriz mitocondrial (Valdez y col., 2000). La tasa de liberación mitocondrial de NO al citosol se estima en $29 \text{ nmol NO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g corazón}^{-1}$, considerando que un corazón de rata funcional posee una población mitocondrial de la cual un 72% se halla en estado 4 y un 28% en estado 3 (Boveris y col., 1999) y un contenido de 53 mg de proteína por g de tejido (Costa y col., 1988) [$(0.72 \times 0.62 \text{ nmol NO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}) + (0.28 \times 0.37 \text{ nmol NO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}) \times (53 \text{ mg proteína/g corazón})$]. Dado que la producción de NO por la fracción posmitocondrial (citosólica) fue de $24 \text{ nmol NO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g corazón}^{-1}$ (Tabla 3.4), ésta correspondería al 45% del NO total citosólico, mientras que la producción mitocondrial daría cuenta del 55%.

Tabla 3.4. Actividad de NO sintasa mitocondrial cardíaca y liberación de NO mitocondrial

	pH	Producción de NO	
		nmol NO·min ⁻¹ · mg proteína ⁻¹	nmol NO·min ⁻¹ ·g tejido ⁻¹
Membranas submitocondriales	7.4	0.69 ± 0.05	37 ± 3
Membranas submitocondriales	7.0	0.60 ± 0.03	32 ± 2
Fracción posmitocondrial (citósol)	7.0	0.24 ± 0.02	24 ± 2
Mitocondrias en estado 4	7.4	0.62 ± 0.03	33 ± 2
Mitocondrias en estado 3	7.4	0.37 ± 0.02	20 ± 1

Los valores corresponden a la media ± ES. La producción de óxido nítrico (NO) por mitocondrias cardíacas de rata, fue medida en presencia de 8 mM succinato (estado 4) y 8 mM succinato + 0.5 mM ADP (estado 3). En corazón de rata perfundido, el 72% de la población mitocondrial se halla en estado 4, y el 28% en estado 3 (Boveris y col., 1999). Contenidos de proteínas de 100 y 53 mg/g corazón fueron considerados para el citósol y las mitocondrias, respectivamente.

3.3.2. Efecto de la hipoxia hipobárica y del envejecimiento sobre la producción mitocondrial de NO.

La actividad de la mtNOS de ventrículo izquierdo de corazón de rata fue significativamente superior (20-60%) en ratas sometidas a hipoxia hipobárica que en sus respectivos controles etarios mantenidos a presión atmosférica a nivel del mar (Fig. 3.14).

El efecto cuantitativo fue dependiente de la edad de los animales, ya que la actividad de la mtNOS decreció linealmente (20%) en los animales controles entre los 2 y los 18 meses. El efecto de la hipoxia hipobárica fue suficientemente marcado como para contrarrestar este efecto asociado a la edad y permitir que las ratas hipóxicas alcanzaran valores superiores a los correspondientes a ratas jóvenes (2-4 meses de edad).

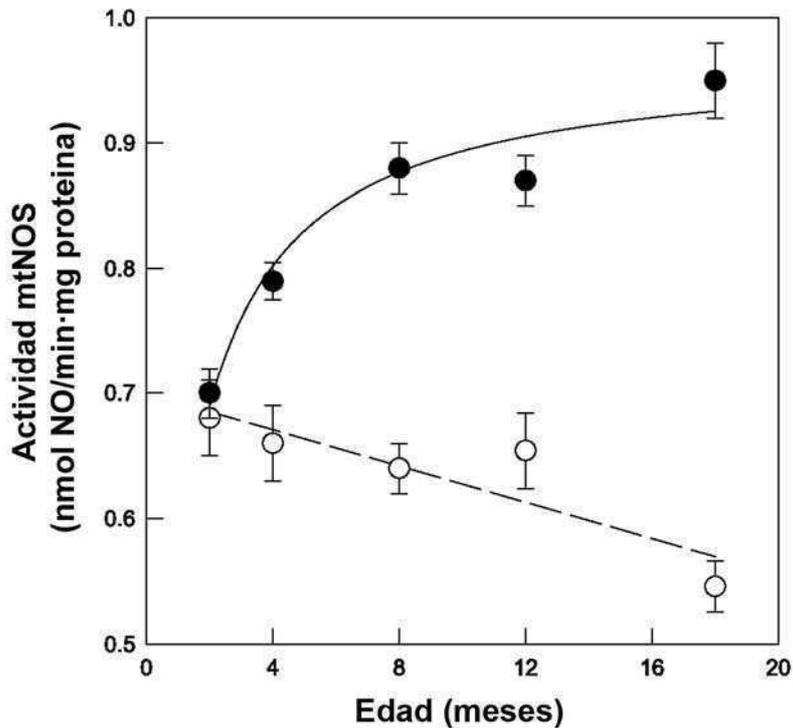


Fig. 3.14. Actividad de óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) en ventrículo izquierdo de ratas sometidas a 53.8 kPa (●) y en sus controles mantenidos a 101.3 kPa (○) durante la maduración y el envejecimiento. Los valores corresponden a la media \pm ES.

3.3.3. Efecto de la hipoxia hipobárica y del envejecimiento sobre la cadena respiratoria mitocondrial.

En contraste con la mtNOS, las actividades de otras dos enzimas mitocondriales, la NADH-citocromo *c* reductasa y la citocromo oxidasa (Fig.3.15), no se vieron afectadas por la hipoxia hipobárica, indicando una especificidad del efecto de la hipoxia sobre la actividad de mtNOS. Las actividades de NADH-citocromo *c* reductasa y citocromo oxidasa decrecieron en ambos grupos en un 36 y 12%, respectivamente, entre los 2 y 18 meses de edad. La declinación en la actividad de estas enzimas con la edad fue comparable a la de la mtNOS (Fig. 3.14). Estas tres enzimas mitocondriales se consideran marcadores del proceso de envejecimiento (Navarro y Boveris, 2004). En concordancia con la declinación en la actividad de la citocromo oxidasa, el contenido de citocromo *aa*₃ mostró una caída del 15% durante el envejecimiento que no fue observada en el citocromo *c*. El contenido de ambos citocromos fue similar en los ventrículos izquierdos de animales hipóxicos y

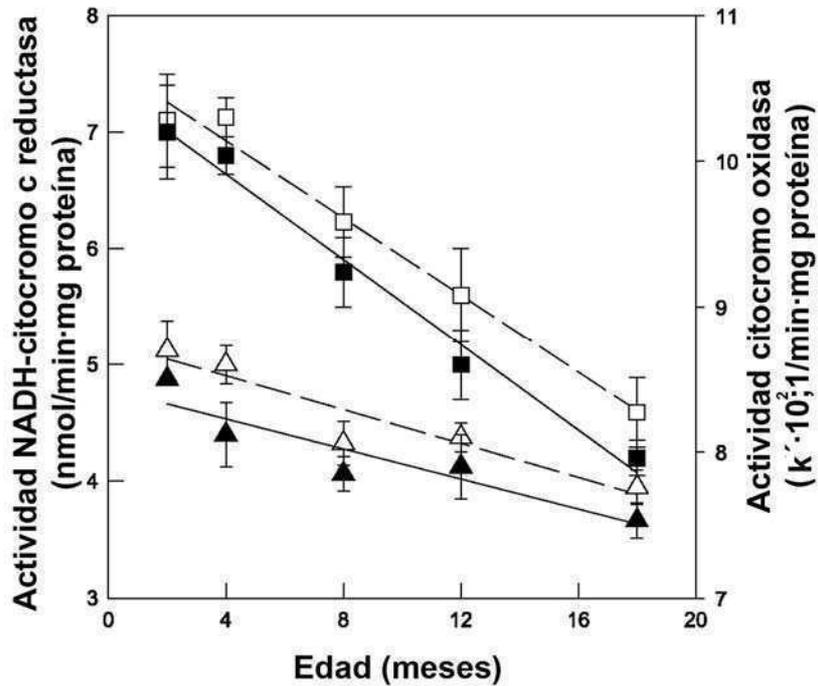


Fig. 3.15. Actividad de NADH-citocromo c reductasa (■C, □H), y citocromo oxidasa (▲C, ΔH) en mitocondrias de ventrículo izquierdo de ratas hipóxicas (H) y controles (C). k' , constante de reacción de pseudo-primer orden. Los valores corresponden a la media \pm ES.

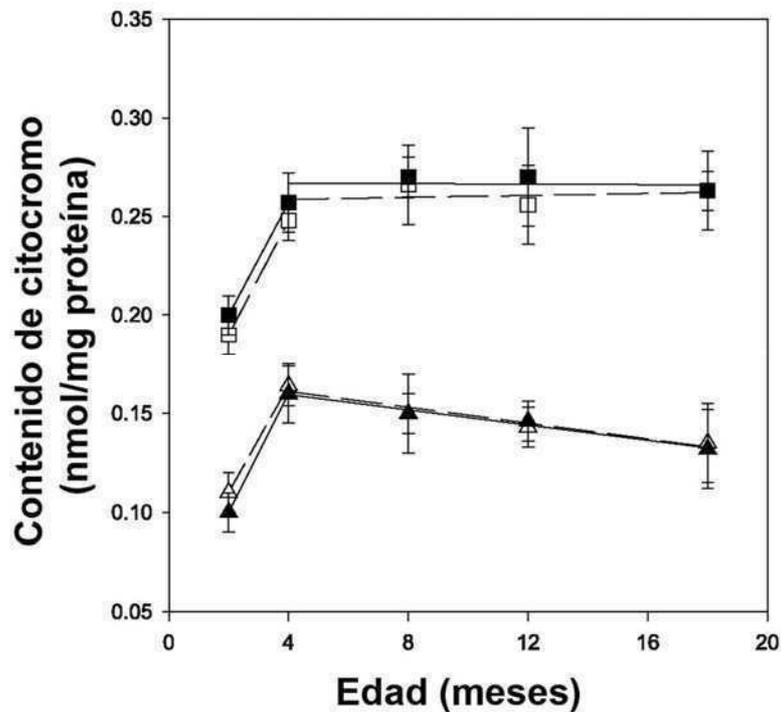


Fig. 3.16. Contenido de citocromo c (■C, □H), y citocromo aa₃ (▲C, ΔH) en mitocondrias de ventrículo izquierdo de ratas hipóxicas (H) y controles (C). Los valores corresponden a la media \pm ES.

controles (Fig. 3.16). Ambos grupos de ratas alcanzaron contenidos máximos de citocromo aa_3 y citocromo c a los 4 meses de edad, sugiriendo que la maduración entre los 2 y 4 meses de edad es necesaria para alcanzar el contenido máximo de dichos componentes mitocondriales.

3.3.4. Producción de NO por mitocondrias cardíacas durante la desaclimatización.

Como se describe en 3.3.2, la actividad de mtNOS en membranas submitocondriales de ventrículo izquierdo fue significativamente mayor en ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica que en sus respectivos controles mantenidos a presión atmosférica ambiental. Después de 0.4, 2 y 5 meses de desaclimatización, la producción de NO continuó aumentada en un 42, 27 y 20%, respectivamente (Fig. 3.17). De manera similar a la actividad contráctil del ventrículo izquierdo evaluada en músculo papilar antes y después de una hipoxia aguda *in vitro* (3.2.2 y 3.2.3), la actividad de la mtNOS mostró una

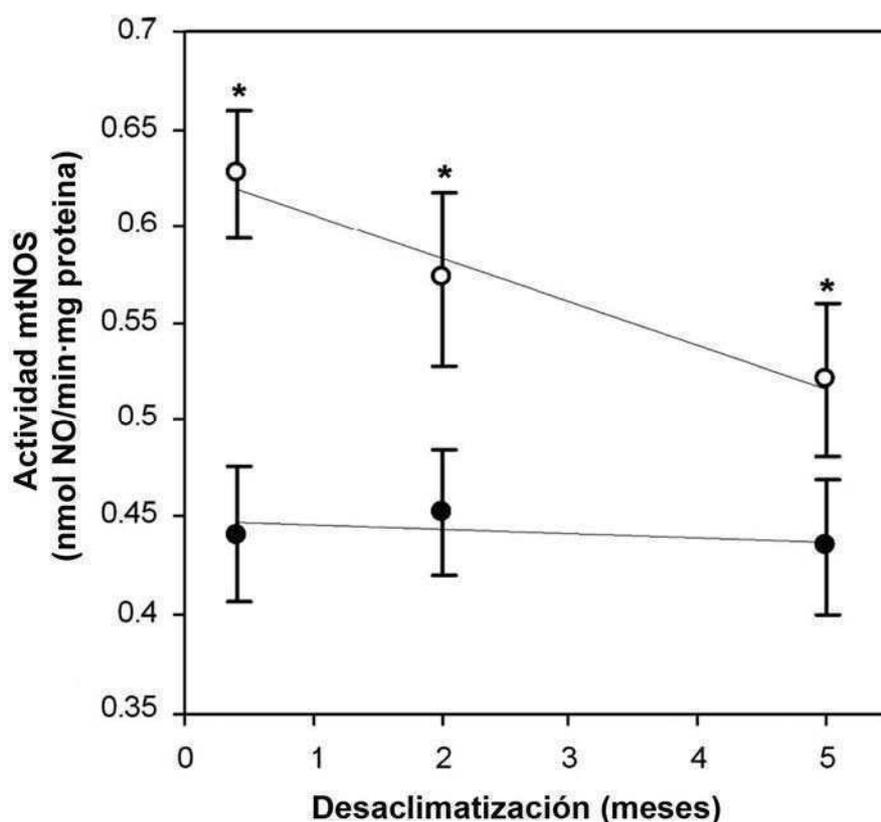


Fig. 3.17. Actividad de mtNOS en ventrículo izquierdo durante la desaclimatización de ratas previamente sometidas a hipoxia (○) y en sus controles normóxicas (●). Los valores corresponden a la media \pm ES. * $P < 0.05$ vs. control.

declinación lineal una vez suspendido el estímulo hipóxico, con un tiempo medio de 5.0 meses (Fig. 3.18).

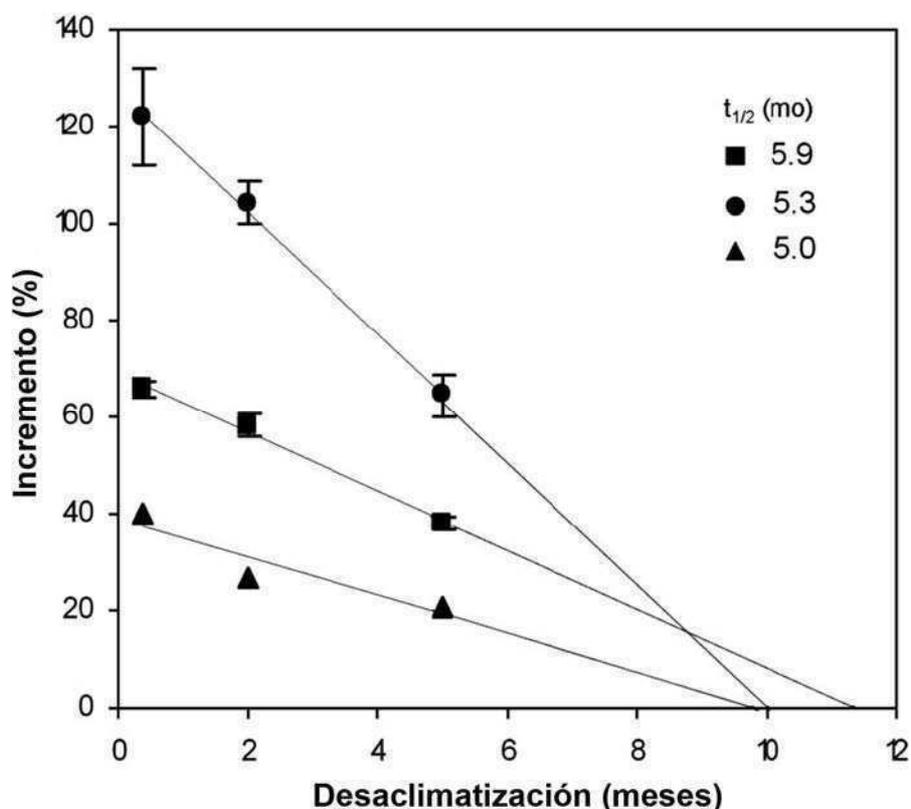


Fig. 3.18. Regresión del incremento de actividad mecánica en músculo papilar antes (■) y después (●) de un periodo de hipoxia y reoxigenación y actividad de mtNOS de ventrículo izquierdo (▲) durante la desaclimatización de ratas previamente expuestas a hipoxia hipobárica crónica. Los valores están expresados como porcentaje de aumento sobre el grupo control. Las actividades mecánicas son la media \pm ES de TD, +T y -T.

3.3.5. Expresión de NOS en mitocondrias cardíacas.

La expresión de las diferentes isoformas de la NOS se analizó en membranas submitocondriales de ventrículo izquierdo de ratas hipóxicas después de 0.4, 2, y 5 meses de interrumpida la hipopresión y en sus controles normóxicas. En las condiciones experimentales del presente estudio, la NOS reaccionó con anticuerpos anti-iNOS y anti-nNOS (Fig 3.19), mientras que no se obtuvo reacción con anticuerpos anti-eNOS. La cuantificación densitométrica de las bandas de los Western blot indicó un aumento en la expresión de la mtNOS en los animales prehipóxicos versus sus respectivos controles normóxicos, con un incremento y un comportamiento similar al

observado para la actividad de la mtNOS determinada por el método espectrofotométrico. El tiempo requerido para la disminución de la respuesta al 50% ($t_{1/2}$) fue de 5.3 y 4.7 meses para la iNOS y la nNOS, respectivamente. Estos valores fueron consistentes con los obtenidos para la producción de NO, la actividad contráctil cardíaca basal y la tolerancia a la hipoxia/reoxigenación.

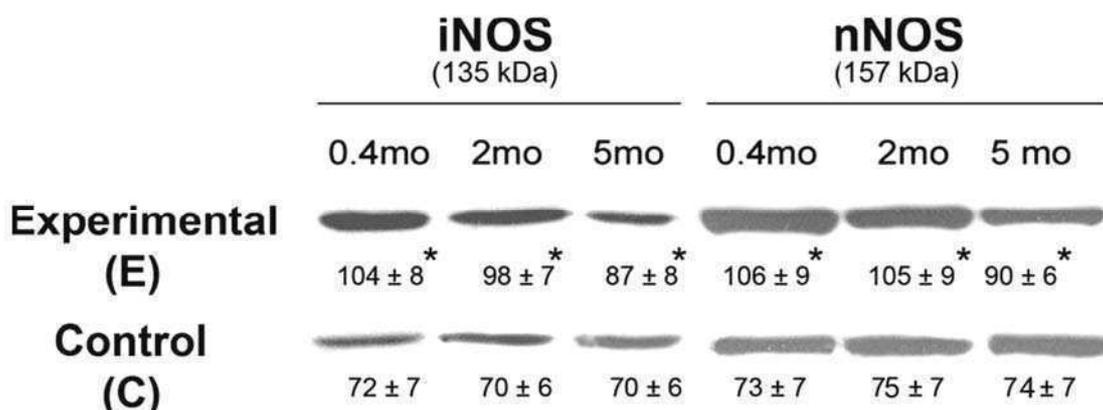


Fig. 3.19. Análisis por western blot de la reactividad de mitocondrias de ventrículo izquierdo de ratas desaclimatizadas y controles con anticuerpos anti-iNOS y anti-nNOS. No se obtuvo reacción con anticuerpos anti-eNOS. Los resultados se expresan en unidades densitométricas (media ± ES). * $P < 0.05$ vs control).

3.3.6. Producción mitocondrial de NO y actividad mecánica del ventrículo izquierdo durante la maduración y el envejecimiento bajo condiciones de hipoxia y de normoxia.

La Fig. 3.20 muestra, en un gráfico tridimensional, la dependencia de la actividad de la mtNOS del ventrículo izquierdo y de la tensión desarrollada por el músculo papilar en función de la edad en las ratas hipóxicas y normóxicas. Los datos de las ratas normóxicas están representados por las cinco columnas grises a la izquierda, y los datos de las ratas hipóxicas están representados por las cinco columnas negras a la derecha. La máxima TD correspondió a una actividad óptima de mtNOS de $0.69 \text{ nmol NO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. Esta máxima TD fue observada en los animales jóvenes (2 meses de edad) tanto en los normóxicos como en los sometidos a una semana de hipoxia hipobárica. A los 4, 8 y 12 meses de edad, las ratas hipóxicas mostraron un incremento en la actividad de la mtNOS de 20, 35 y 45%, respectivamente, comparadas con sus respectivos controles. Este incremento

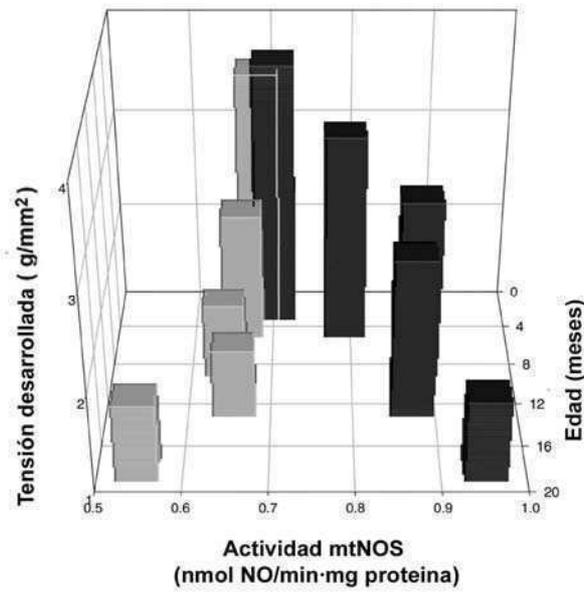


Fig. 3.20. Relación entre la máxima tensión desarrollada por músculo papilar, actividad de mtNOS en ventrículo izquierdo y edad, en animales sometidos a hipoxia hipobárica (columnas negras) y en sus controles normóxicos (columnas grises).

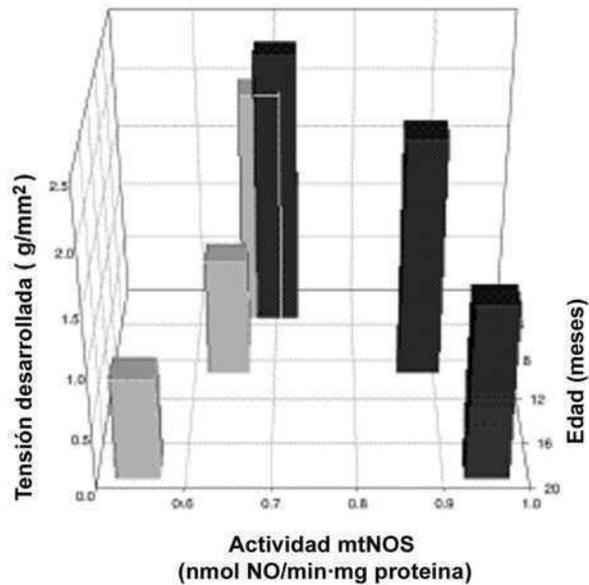


Fig. 3.21. Relación entre la máxima tensión desarrollada por músculo papilar después de una secuencia de hipoxia y reoxigenación *in vitro*, actividad de mtNOS en ventrículo izquierdo y edad, en animales sometidos a hipoxia hipobárica (columnas negras) y en sus controles normóxicos (columnas grises).

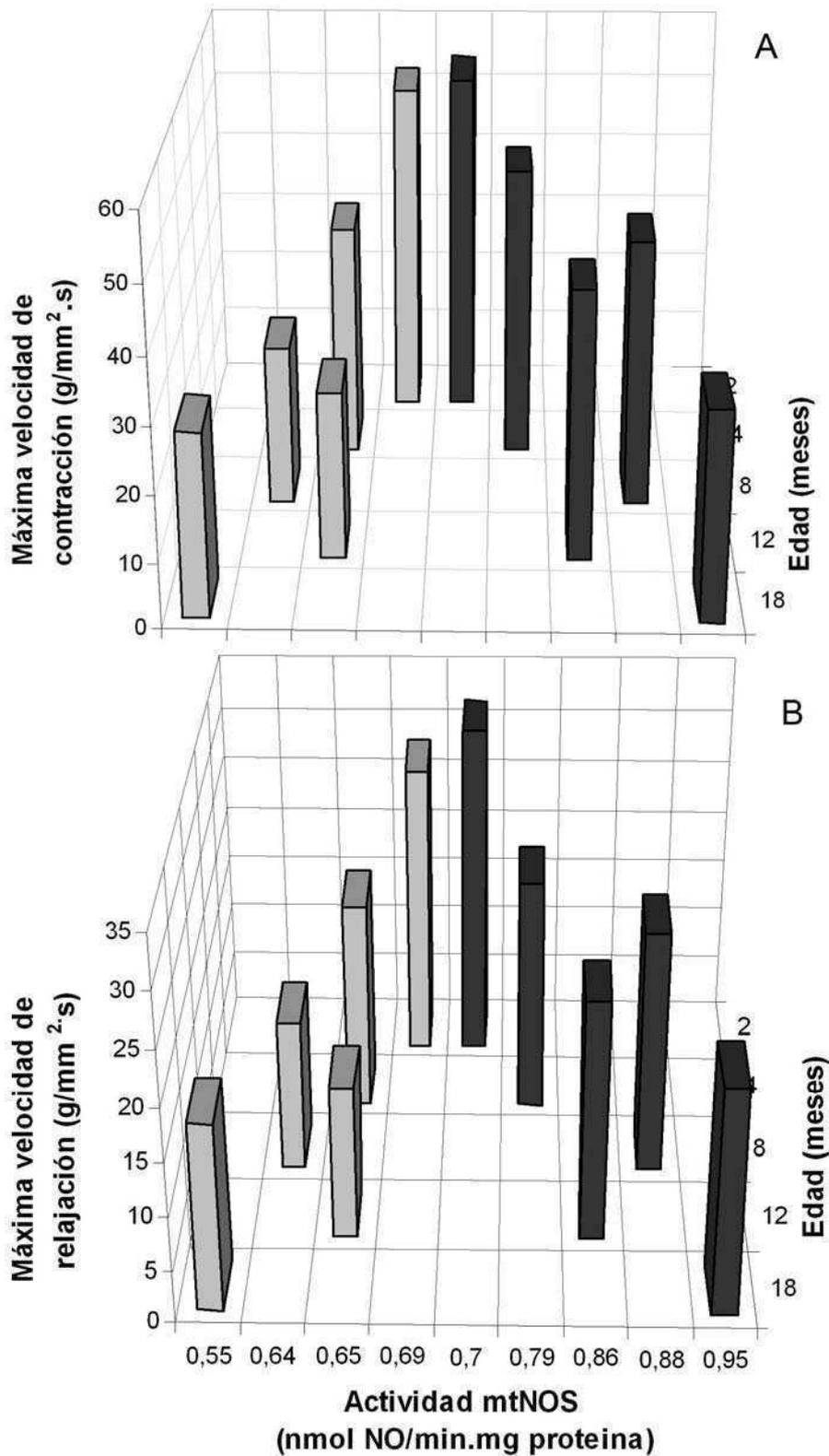


Fig. 3.22. Relación entre la máxima velocidad de contracción (+T, **A**) y de relajación (-T, **B**) en músculo papilar, actividad de mtNOS en ventrículo izquierdo y edad, en animales sometidos a hipoxia hipobárica (columnas negras) y en sus controles normóxicos (columnas grises).

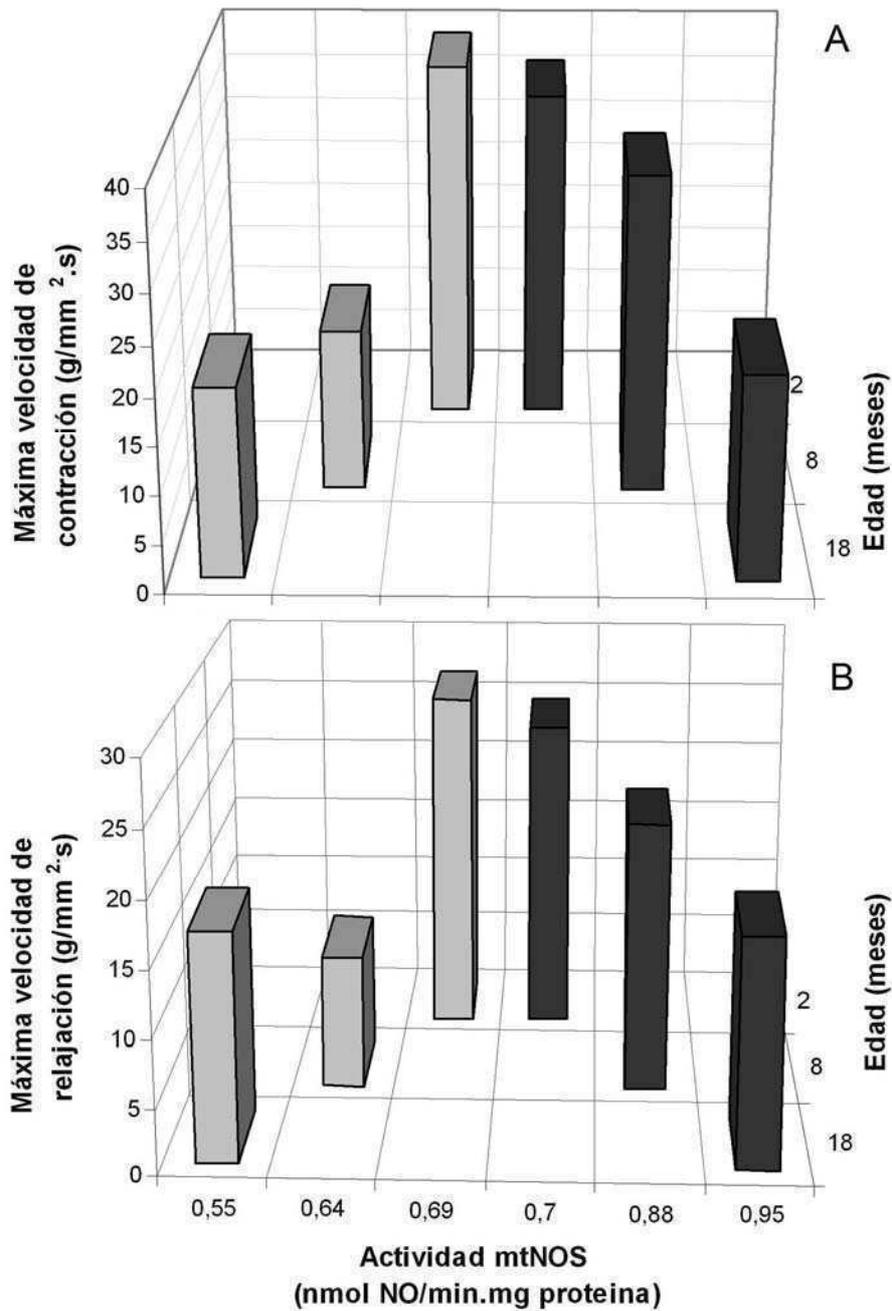


Fig. 3.23. Relación entre la máxima velocidad de contracción (+T, **A**) y de relajación (-T, **B**) en músculo papilar después de una secuencia de hipoxia y reoxigenación *in vitro*, actividad de mtNOS en ventrículo izquierdo y edad, en animales sometidos a hipoxia hipobárica (columnas negras) y en sus controles normóxicos (columnas grises).

en la actividad de la mtNOS se relacionó con un incremento de la TD (34, 64 y 62%), como puede observarse por la altura de las columnas correspondientes a los animales hipóxicos comparadas con las de sus respectivos controles normóxicos. A los 18 meses de edad, las ratas hipóxicas mostraron un

incremento de 60% en la actividad de la mtNOS pero no hubo diferencias en la TD en comparación con sus controles normóxicos de igual edad. La tensión desarrollada por los músculos papilares después de una secuencia de 60 min de hipoxia seguida de 30 min de reoxigenación y la actividad de la mtNOS, en animales hipóxicos y normóxicos, se representan en función de la edad en la Fig. 3.21. Los animales hipóxicos de 8 meses de edad mostraron una capacidad de recuperación de su TD 100% mayor y una producción de NO mitocondrial 35% mayor que sus respectivos controles normóxicos. La

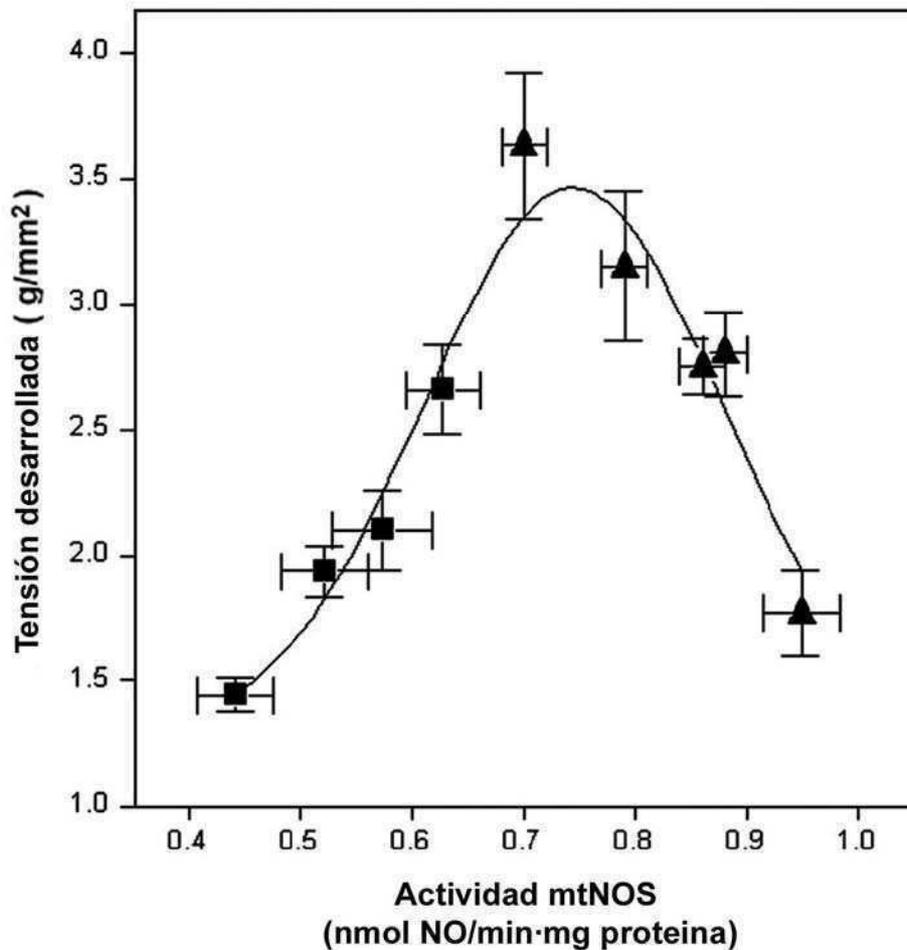


Fig. 3.24. Relación Gaussiana entre la actividad de mtNOS en ventrículo izquierdo y la tensión desarrollada por músculo papilar de rata a 1.35 mM Ca^{2+} durante la aclimatización (▲) y la desaclimatización (■). Los valores (media \pm ES) correspondientes al período de aclimatización son los representados en las Figs. 3.1 y 3.14 y los de desaclimatización, en las Figs. 3.12 y 3.17.

actividad enzimática óptima para la máxima TD fue otra vez de 0.69 nmol $NO \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$. Tanto los valores basales de los parámetros contráctiles +T y -T de los músculos papilares (Fig. 3.22) como los recuperados luego de la hipoxia y reoxigenación in Vitro (Fig. 3.23) siguieron un

comportamiento similar al descrito para la TD y mostraron una actividad óptima de mtNOS similar.

3.3.7. Correlación entre la producción mitocondrial de NO y la actividad mecánica del ventrículo izquierdo durante la aclimatación y la desaclimatización.

En la Fig. 3.24 se representaron los valores promedio de la TD basal de los músculos papilares obtenidos después de varios períodos de aclimatación (1, 10, 26, 45, y 74 semanas) y de desaclimatización (1-2, 9, y 21 semanas) en función de la actividad de la mtNOS del ventrículo izquierdo.

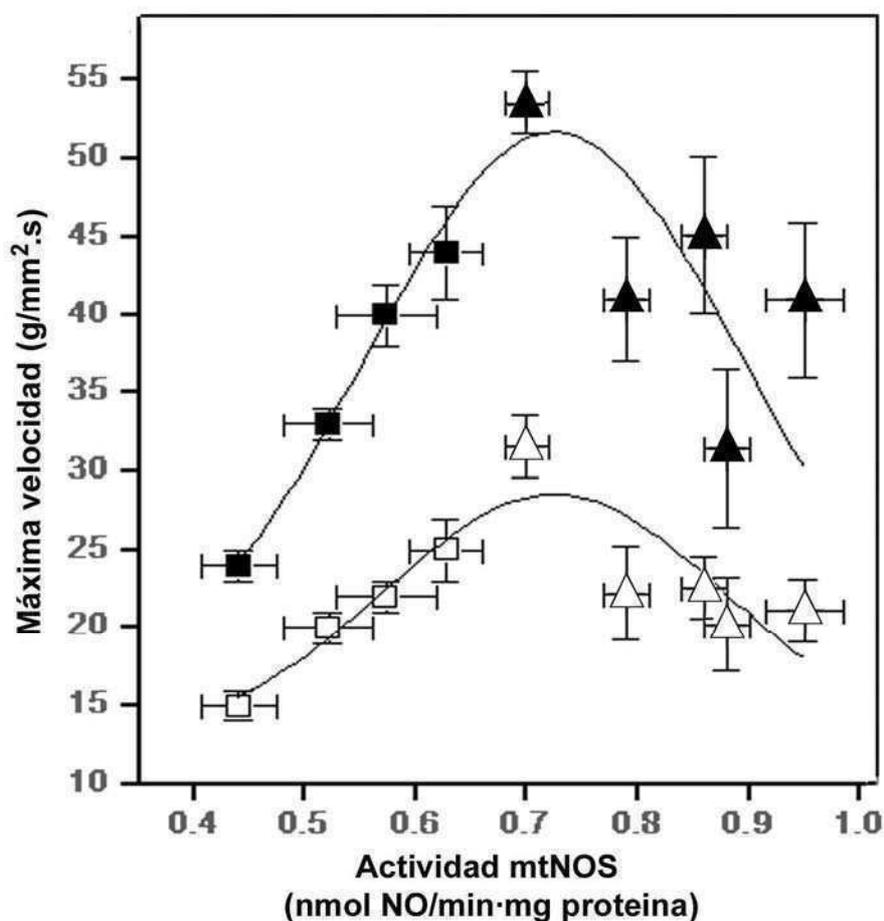


Fig. 3.25. Relación Gaussiana entre la actividad de mtNOS en ventrículo izquierdo y la máxima velocidad de contracción (■, ▲) y de relajación (□, Δ) en músculo papilar de rata durante la aclimatación (■, □) y la desaclimatización (▲, Δ). Los valores (media ± ES) correspondientes al período de aclimatación son los representados en las Figs. 3.3 y 3.14 y los de desaclimatización los que se muestran en la tabla 3.2 y Fig. 3.17.

Como se describiera previamente, durante el envejecimiento bajo condiciones de altura simulada la actividad de mtNOS aumentó (3.3.2), mientras que la declinación en la TD asociada con la edad se retardó (3.1.1). Dado que los parámetros de contractilidad basal durante la aclimatización fueron determinados sólo a 1.35 mM Ca^{2+} , los valores de TD utilizados para representar los datos de desaclimatización fueron los correspondientes a esta particular concentración de Ca^{2+} (ver Fig. 3.12). El mejor ajuste para la correlación entre TD y la actividad de mtNOS resultó una función gaussiana, con $R^2 = 0.94$, y definió la producción óptima de NO en 0.74 ± 0.01 nmol $\text{NO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, mientras que +T y -T (Fig. 3.25) se comportaron de manera similar, con $R^2 = 0.95$ y 0.80 y máximos a 0.73 ± 0.01 y 0.70 ± 0.02 nmol $\text{NO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, respectivamente.

4. DISCUSION

4.1. Efectos de la hipoxia hipobárica crónica durante la maduración y el envejecimiento. Actividad mecánica del miocardio.

4.1.1. Parámetros biológicos

Es conocido que la disminución en el peso corporal experimentada tempranamente durante la aclimatización (Tabla 3.1 y Fig. 3.9) va acompañada de una marcada pérdida en el contenido de grasa corporal y de un retardo en el crecimiento, evaluado por la longitud de la cola, en ratas macho, en tanto que las hembras sufrirían una menor pérdida de peso corporal asociada sólo a una reducción en el contenido de grasa (Costa, 2007). Estudios recientes han mostrado que el estímulo hipóxico produce en el hipotálamo una temprana y transitoria disminución en la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y de la acetil-CoA carboxilasa, concomitantemente con una profunda anorexia. Rápidamente ocurre entonces una poderosa respuesta regulatoria mediada por el neuropéptido Y (NPY) para contrarrestar este efecto y evitar un estado anoréxico prolongado (Simler y col., 2007). El factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1), reconocido actualmente como el principal regulador de la homeostasis del oxígeno en el organismo (Semenza, 2004), ha sido asociado con el disminuido peso corporal en la hipoxia crónica, a través de la inducción del promotor del gen de la leptina (Raguso y col., 2004).

El aumento del hematocrito observado durante la aclimatización (Tabla 3.1) es una consecuencia del aumento en la expresión de la eritropoyetina mediado por el HIF-1 (Semenza y Wang, 1992), el cual funciona asimismo como regulador dependiente del oxígeno en la expresión de otros genes (Semenza y Wang, 1992; Bunn y Poyton, 1996; Kumar y Klein, 2004). Más de 40 genes inducibles por hipoxia son regulados por este factor de transcripción (Zagorska y Dulak, 2004).

El transporte de O₂ por la circulación se adapta durante la hipoxia crónica incrementando la capacidad de O₂ de la sangre a través del aumento del hematocrito y de la concentración de hemoglobina. Este aumento afecta los

tres pasos principales en la cascada de la PO_2 desde el aire inspirado hasta la mitocondria: carga de O_2 en los pulmones, transporte de O_2 por el corazón y el sistema circulatorio, y liberación de O_2 desde la microcirculación a las células (Weibel y Hoppeler, 1991).

Investigaciones de los últimos años implican a la hemoglobina y a los eritrocitos en la regulación de la biodisponibilidad del NO en el sistema vascular (Gladwin, 2005; 2006). En condiciones normóxicas la hemoglobina de los eritrocitos captura al NO, produciendo así un efecto vasopresor de forma tal que provee una regulación fisiológica de la vasodilatación dependiente de NO. Además, la hemoglobina y los eritrocitos liberarían NO a medida que la hemoglobina se desoxigena. Uno de los mecanismos que han sido propuestos para explicar este principio es una actividad nitrito reductasa de la hemoglobina desoxigenada que reduce nitrito a NO y así vasodilata la circulación a lo largo del gradiente fisiológico de O_2 . También se ha sugerido la existencia de un sensor de O_2 en el eritrocito mismo, el cual liberaría ATP cuando censa baja PO_2 y el ATP actuaría sobre el endotelio liberando NO (Dietrich y col., 2000; Pittman, 2010).

La hipertrofia cardíaca desarrollada durante la exposición a la altura se debió al aumento de masa ventricular derecha (Tabla 3.1), que es una consecuencia de la hipertensión pulmonar que acompaña a la aclimatización. La masa del ventrículo izquierdo no cambió significativamente por efecto de la hipoxia. Cuando el área del músculo papilar supera cierto límite puede experimentar hipoxia localmente en su porción central, ocasionando una disminución en su capacidad contráctil. El patrón similar de aumento en el área de los músculos papilares de ratas hipóxicas y controles hasta los 12 meses de edad parece excluir que la diferencia en la contractilidad observada se deba a este efecto. La disminución del área de los músculos papilares en los animales controles de 23 meses e hipóxicos de 18 meses con respecto a sus grupos etarios previos indicaría que la atrofia muscular ocurre más temprano durante el envejecimiento en condiciones de hipoxia.

En el presente estudio y por primera vez en un modelo experimental de hipoxia crónica, un grupo de animales fue sometido a hipoxia hipobárica durante toda la vida. A pesar de que el número de animales utilizados no fue suficiente para un riguroso estudio estadístico de longevidad, los porcentajes

de supervivencia muestran una clara tendencia a disminuir durante el envejecimiento bajo condiciones de hipoxia, lo cual concuerda con observaciones previas en nuestro laboratorio. Se ha sugerido que los pueblos más longevos se encuentran en la altura. Sin embargo, otros factores independientes de la baja PO_2 podrían influir en la longevidad de las poblaciones consideradas. También es posible que la altura a la que viven esos individuos, generalmente menor que la simulada en nuestros experimentos, sea más favorable para la supervivencia, que la adaptación sea mayor por el tiempo transcurrido en esas condiciones (usualmente a través de generaciones) y/o que influya la diferencia de especie. Este tema de gran interés, ha sido poco explorado debido a su complejidad experimental.

4.1.2. Parámetros de contractilidad basal.

Tanto la TR como la TD de los músculos papilares, las cuales pueden ser analogadas a la función diastólica y sistólica, respectivamente, en el corazón entero, decayeron con la edad hasta los 4-8 meses de vida, y luego no cambiaron significativamente hasta la senescencia (Fig.3.1). La disminución en la TR, que puede ser asimilada a la presión diastólica de fin de lleno del ventrículo izquierdo en el corazón entero, se traduciría en un mejoramiento adaptativo en la función diastólica a medida que la TD disminuye con la edad. La literatura presenta discrepancias con respecto a los cambios en las funciones diastólica y sistólica durante el envejecimiento (Besse y col., 1993; Headrick, 1998; Oxenham y Sharpe, 2003). Dado que la mayoría de los estudios comparan sólo dos o tres grupos etarios, las contradicciones podrían ser atribuidas a la particular selección de las edades en cada uno de ellos.

Uno de los hallazgos más importantes del presente estudio fue que la caída de la TD fue menos pronunciada en las ratas aclimatizadas de 4, 8 y 12 meses de edad que en las controles. Más aún, durante la maduración, la función sistólica en los animales hipóxicos permaneció similar a la de los animales jóvenes. A partir de los 8 meses de edad, los músculos papilares normóxicos no solo desarrollaron menos fuerza, sino que también se contrajeron y relajaron más lentamente (Fig. 3.3.). En los animales hipóxicos, la caída asociada a la edad en las velocidades máximas de contracción y de relajación fue también menor que en los controles; así, en los animales

hipóxicos de 12 meses de edad, +T y -T resultaron similares a las de las ratas de 4 meses. Se concluye entonces que la hipoxia crónica retardó la declinación en la función mecánica del ventrículo izquierdo asociada a la edad.

La función contráctil del ventrículo derecho, evaluada a través de la presión desarrollada, la máxima velocidad de desarrollo de presión y la máxima velocidad de caída de presión, parámetros análogos a la TD, +T y -T del presente estudio, se incrementó en ratas adultas sometidas a hipoxia hipobárica intermitente durante 5 semanas (Hrbasova y col., 2003). El incremento que hallamos en los mismos parámetros en el ventrículo izquierdo, el cual no sufrió aumento en su masa muscular, sugiere que el aumento en la función contractil es causado por la adaptación a la hipoxia y no es un efecto asociado a la hipertrofia del ventrículo derecho.

4.1.3. Hipoxia y reoxigenación.

Otro hallazgo fisiológicamente relevante del presente estudio fue la cardioprotección observada en los animales sometidos a altura simulada durante 26 semanas, evaluada por la capacidad de recuperación de la función contráctil del músculo papilar después de 30 min de reoxigenación consecutivos a una hipoxia aguda de 60 min. Este efecto cardioprotector no fue observado en animales jóvenes sometidos a una sola semana de hipoxia ni en ratas de edad avanzada (18 meses). La situación a las 26 semanas representa la aclimatización después de 10-45 semanas de hipoxia (ratas de 4-12 meses de edad), mientras que una semana de hipoxia no sería suficiente para la adaptación y el punto de 74 semanas corresponde a un estado final de envejecimiento. Más aún, la aparición de contractura durante la hipoxia aguda in vitro, la cual sería un indicador de la declinación de fosfatos de alta energía y de sobrecarga de calcio intracelular, fue mas temprana en los animales sometidos a hipoxia durante 1 y 74 semanas que en todos los animales normóxicos, indicando una disminuida resistencia a la isquemia, mientras que los animales de 26 semanas de hipoxia se comportaron como los controles, mostrando una adaptación efectiva.

Se observó que, a pesar de que los parámetros de contractilidad basal de las ratas controles senescentes (23 meses) no fueron estadísticamente diferentes de los de los animales viejos (18 meses), las ratas senescentes

mostraron una pérdida significativa de su capacidad de recuperación de la contractilidad post-hipoxia/reoxigenación. Una reducida tolerancia del miocardio envejecido a la isquemia ha sido informada en la literatura (Headrick, 1998; Bartling y col., 2003).

Se ha encontrado que la hipoxia crónica sistémica mejora la función sistólica post-isquemia en varios modelos experimentales. Ya en 1958, Kopecky y Daum demostraron una mejoría en la recuperación contráctil del ventrículo derecho después de un período de anoxia in vitro en ratas expuestas a hipoxia intermitente en una cámara de hipopresión. Este hallazgo fue más tarde repetidamente confirmado y extendido a otros modelos de hipoxia hipobárica intermitente, los cuales mostraron un incremento en la tolerancia cardíaca a las consecuencias deletéreas de una supresión aguda de oxígeno, como el infarto de miocardio, la disfunción contráctil y las arritmias ventriculares (Asemu y col., 1999; Ostadal y col., 1999; Neckar y col., 2002; Kolar y Ostadal, 2004). En otro modelo, desarrollado para reproducir la patología del corazón cianótico congénito, se demostró que la adaptación a la hipoxia normobárica crónica en conejos recién nacidos confería cardioprotección contra una isquemia subsiguiente (Baker y col., 1995; Baker y col., 1999; Eells y col., 2000; Shi y col., 2000; Kong y col., 2001; Shi y col., 2002; Baker, 2004). Estos efectos beneficiosos de la hipoxia crónica fueron hallados en ambos ventrículos (Kong y col., 2001). En cambio, 14 días de hipoxia sostenida en ratas adultas protegieron al ventrículo derecho de los daños ocasionados por la isquemia/reperfusión, pero no mejoraron la función ventricular izquierda post-isquémica (Forkel y col., 2004). En el presente estudio se demuestra una cardioprotección desarrollada en el músculo papilar del ventrículo izquierdo de ratas adultas durante la aclimatización a hipoxia hipobárica sostenida si la exposición se prolonga suficientemente.

La mayor capacidad de recuperación post-hipoxia /reoxigenación de los corazones hipóxicos se perdió a edad avanzada. Aunque no se han informado estudios previos sobre el efecto de la hipoxia crónica en corazones envejecidos, estudios en humanos y en animales sugieren que el envejecimiento es un factor limitante para la protección alcanzada con modelos de isquemia preconditionante (Fenton y col., 2000; Schulman y col., 2001; Bartling y col., 2003). Dado que la recuperación de los músculos de ratas

hipóxicas de 18 meses de edad fue similar a la de sus controles etarios, y mucho mejor que la de los animales controles senescentes (23 meses), la menor sobrevida de los animales hipóxicos podría deberse a otras influencias adversas de la hipoxia crónica como el desarrollo de hipertensión pulmonar, el cual podría resultar en una insuficiencia cardiaca congestiva (Ostadal y col., 1999). La pérdida de aclimatización, con un exagerado desarrollo de hipertensión pulmonar (mal de montaña crónico), es frecuente en personas de edad avanzada que viven en elevadas alturas en los Andes (Penaloza y Arias-Stella, 2007).

En conclusión, la adaptación a la hipoxia hipobárica crónica en ratas adultas, no sólo preservó la función contráctil del miocardio de la declinación ocasionada por la edad, sino que aumentó su capacidad de recuperación post hipoxia/reoxigenación. La aclimatización cardíaca se desarrolló durante varios meses (desde los 4 hasta los 12 meses de edad) de exposición a 5000 m de altura simulada y se perdió después de los 18 meses.

4.2. Desaclimatización. Duración de la protección conferida al miocardio por la hipoxia hipobárica crónica.

Una vez establecidas las condiciones experimentales en las cuales se desarrollan los efectos de la hipoxia hipobárica crónica sostenida sobre el miocardio, se evaluó la memoria de estos efectos una vez suspendido el estímulo hipóxico. Se pudo observar que, tanto la preservación de la actividad mecánica como el aumento en la capacidad de recuperación después de un episodio de hipoxia aguda, declinaron gradualmente al volver los animales a la presión atmosférica de nivel del mar pero, aún a los 5 meses, las diferencias con los controles eran significativas. Estos efectos persistieron mucho más que los cambios clásicos que ocurren durante la aclimatización, como la disminución en la ganancia de peso corporal y el incremento del hematocrito, los cuales se encontraron normalizados después de 2 meses de normoxia. En contraste, la completa regresión de los cambios adaptativos del ventrículo izquierdo requeriría más de 10 meses. Este sería el primer informe, en nuestro conocimiento, donde una mejoría en la contractilidad basal y en la capacidad de recuperación post hipoxia/reoxigenación del ventrículo izquierdo ha sido documentada meses después de terminada la exposición a hipoxia crónica.

La resistencia del ventrículo derecho al daño ocasionado por hipoxia aguda, conferida por la hipoxia hipobárica intermitente en ratas adultas, persistió por 4 meses una vez removidas del ambiente hipóxico (Ostadal y col., 1985). Como se mencionara en 4.1.1, el ventrículo derecho se hipertrofia durante la aclimatización como consecuencia de la vasoconstricción pulmonar en respuesta a la hipoxia, la cual aumenta la presión arterial pulmonar (Penaloza y Arias-Stella, 2007). Este efecto es usualmente considerado una influencia adversa de la hipoxia sobre el sistema cardiopulmonar (Ostadal y col., 1999; Hoit y col., 2005) y muchos individuos bien adaptados viven en la altura sin hipertensión pulmonar ni hipertrofia cardíaca. La reversibilidad de estos cambios una vez removido el ambiente hipóxico ha sido previamente descrita (Fitzpatrick y col., 2005). En nuestro modelo experimental de hipoxia hipobárica sostenida el peso del VD declinó con un tiempo medio de 3.7 meses una vez interrumpida la hipopresión y se encontró significativamente aumentado aún después de 5 meses de normoxia.

4.3. Mecanismos celulares. Participación de la mtNOS en la protección conferida al miocardio por la hipoxia hipobárica crónica.

4.3.1. Producción de NO por mitocondrias cardíacas.

Kanai y col. (2001) mostraron actividad de NOS en mitocondrias de corazón de ratón, midiendo la producción de NO con un microsensor porfirínico en una única mitocondria. La actividad de mtNOS cardíaca fue determinada en una serie de estudios posteriores (Costa y col., 2002; Boveris y col., 2003; Kanai y col., 2004; Zanella y col., 2004; Gonzales y col., 2005; Fellet y col., 2006; Zaobornyj y col., 2009). La distribución y contribución relativa de las diferentes isoformas de NOS en los distintos compartimentos celulares y la difusión del NO entre las mitocondrias y el citosol subyace al rol del NO en la regulación de la homeostasis celular y en el señalamiento bioquímico y genético.

En el presente estudio, la determinación cuantitativa de la liberación de NO por las mitocondrias cardíacas y la fracción postmitocondrial indicaron que la liberación de NO mitocondrial da cuenta del 55% del total de NO en citosol de ventrículo izquierdo de los animales normóxicos. Las mitocondrias

acopladas, con una barrera de permeabilidad intacta, produjeron NO con sustratos intramitocondriales adecuados en una situación muy cercana a la fisiológica. La fracción postmitocondrial o citosólica posee fundamentalmente eNOS proveniente de la caveola y de la membrana plasmática de los cardiomiocitos y las células endoteliales y, en menor proporción, nNOS del retículo sarcoplásmico, del sarcolema y de los nervios cardíacos (Baker y col., 1999; Alderton y col., 2001). La fracción postmitocondrial, suplementada con Ca^{2+} y sustratos de la NOS en exceso, produjo el restante 45% del NO citosólico (ver 3.3.1). Otros estudios han informado un porcentaje aún mayor del NO citosólico aportado por la mtNOS (Gonzales y col., 2005), lo cual resaltaría la relevancia de la fracción mitocondrial en la producción total del NO celular.

4.3.2. Efecto de la hipoxia hipobárica y del envejecimiento sobre la producción mitocondrial de NO.

El presente estudio permitió describir por primera vez el comportamiento de la actividad de la mtNOS cardíaca en ratas de 2 meses de edad hasta la senilidad. La actividad de la mtNOS disminuyó conforme al avance de la edad en animales normóxicos y, contrariamente, aumentó en las ratas hipóxicas. La hipoxia hipobárica crónica resultó así un efectivo regulador de la actividad de la mtNOS del ventrículo izquierdo, aumentando su actividad con un efecto que fue suficientemente marcado como para contrarrestar la pérdida de actividad asociada a la edad; más aún, las ratas crónicamente expuestas a la hipoxia alcanzaron una actividad mayor que la correspondiente a ratas jóvenes (2 meses).

La actividad de la mtNOS cardíaca aumentó asimismo en ratas aclimatadas a 4340 m durante 21 días, mientras que las NOS citosólica, determinada en el sobrenadante posmitocondrial, no se modificó (Gonzales y col., 2005). Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia crónica tanto la mtNOS como la eNOS de las caveolas y del sarcolema (Baker y col., 1999; Shi y col., 2002) parecen contribuir significativamente al aumento del NO celular como parte del mecanismo de adaptación del corazón a la hipoxia.

La disminución en la tensión de oxígeno en el aire inspirado se suma entonces ahora a otros reguladores fisiológicos de la actividad de la mtNOS

previamente descritos. La angiotensina II disminuye su actividad en corazón (Costa y col., 2002; Boveris y col., 2003a), hígado y riñón (Boveris y col., 2002b), mientras que en el hígado la aclimatación al frío la aumenta (Peralta y col., 2003) y las hormonas tiroideas la disminuyen (Carreras y col., 2001).

4.3.3. Efecto de la hipoxia hipobárica y del envejecimiento sobre la cadena respiratoria mitocondrial.

Las enzimas mitocondriales NADH-citocromo c reductasa y citocromo oxidasa se pueden considerar marcadores del proceso de envejecimiento (Navarro y Boveris, 2004). En el presente estudio, ambas enzimas declinaron su actividad con la edad conforme a lo esperado. Consecuentemente con la declinación en la actividad de la citocromo oxidasa, el contenido de citocromo aa_3 también disminuyó, mientras que el contenido de citocromo c se mantuvo estable. Por lo tanto, al no modificar el patrón de declinación de los complejos respiratorios ni el contenido de los citocromos determinados, la hipoxia hipobárica tuvo un efecto específico sobre la mtNOS.

En estudios previos, los complejos respiratorios (complejos I-IV), medidos en mitocondrias de corazón y/o hígado de ratas aclimatizadas, no mostraron cambios en sus actividades enzimáticas (Costa y col., 1988; Costa y col., 1993). En otro estudio diseñado para comparar los cambios metabólicos asociados con la exposición prolongada a la hipoxia en ventrículos izquierdo y derecho, la máxima velocidad de reacción de la citocromo oxidasa fue similar en ambos ventrículos y no hubo diferencias significativas entre las ratas controles y las adaptadas a la hipoxia (Rumsey y col., 1999). Análogamente, la actividad específica de citocromo oxidasa en homogeneizados así como en mitocondrias aisladas, no cambiaron en ambos ventrículos de ratas expuestas a hipoxia hipobárica intermitente (Stieglerova y col., 1999). De igual modo, la actividad de la citocromo oxidasa en homogeneizados de ventrículos derecho e izquierdo no resultó esencialmente afectada por la hipoxia crónica, independientemente de la edad (Chouabe y col., 2004).

4.3.4. Producción de NO por mitocondrias cardíacas durante la desaclimatización.

Análogamente a los parámetros contráctiles de los músculos papilares, la actividad de mtNOS, significativamente aumentada durante la aclimatización, declinó con una tendencia lineal una vez finalizado el estímulo hipóxico.

Los tres efectos de la aclimatización a la altura observados en el ventrículo izquierdo, a saber, preservación de la declinación en la actividad mecánica ocasionada por la edad, mejora en la capacidad de recuperación contráctil post hipoxia/reoxigenación, y aumento en la actividad de mtNOS, mostraron una declinación con un tiempo medio similar durante la desaclimatización. Este hecho apoya nuestra hipótesis que implica al NO generado por las mitocondrias en los mecanismos subyacentes al establecimiento de la cardioprotección por la hipoxia crónica.

La cardioprotección en conejos inmaduros hipóxicos fue asociada a un aumento de la eNOS (Shi y col., 2002). Sin embargo, aún cuando la cardioprotección y su bloqueo por L-NAME persistieron durante 20 días una vez suspendido el estímulo hipóxico, no fueron acompañados por un aumento de eNOS (Fitzpatrick y col., 2005). Los resultados de la presente tesis, que sugieren la participación de la mtNOS en el mecanismo involucrado, permitirían explicar las observaciones descriptas.

4.3.5. Expresión de NOS en mitocondrias cardíacas.

A más de una década de los primeros informes sobre la actividad de la mtNOS (Ghafourifar y Richter, 1997; Giulivi y col., 1998), la inmunoreactividad de esta enzima es un tema aún en debate (Lacza y col., 2003; Brookes, 2004). Hay evidencias consistentes que indican que la mtNOS es una proteína integral de la membrana mitocondrial interna y sería la consecuencia de modificaciones postranslacionales de la nNOS α (ver 1.3.2): acilación con ácido mirístico en la secuencia NH₂-terminal y fosforilación en la región COOH-terminal (Elfering y col., 2002). La similitud de la mtNOS con la isoforma neuronal fue deducida asimismo a partir de la ausencia de producción de NO por mitocondrias de ratones nNOS^{-/-} (Kanai y col., 2001).

Los análisis de Western blot realizados en el presente trabajo mostraron un aumento asociado a la aclimatización en la expresión de la nNOS y la iNOS

en la fracción mitocondrial del ventrículo izquierdo. Previamente, había sido demostrado que las mitocondrias cardíacas exhiben inmunoreactividad con anticuerpos anti-iNOS (Gonzales y col., 2005; Fellet y col., 2006). En un estudio reciente, un aumento de ambas isoformas ha sido confirmado en ratas aclimatadas a una altura de 4340 m (Zaobornyj y col., 2009). El 51-57% de homología informado para la nNOS, iNOS, y eNOS, y la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-NOS específicos para cada isoforma, podrían contribuir a explicar los resultados contradictorios (Lacza y col., 2003; Ghafourifar y Cadenas, 2005; Kato y Giulivi, 2006).

Los tiempos medios de declinación en la cantidad de proteína, evaluados durante la desaclimatización, fueron similares a los de la capacidad de producción de NO y las modificaciones en la contractilidad conferidas por la hipoxia crónica. Esto sugiere que las variaciones en la producción de NO mitocondrial que acompañan al establecimiento de los efectos cardioprotectores durante la aclimatización se pueden atribuir, al menos en parte, a variaciones en el contenido de mtNOS.

La hipoxia induce la expresión de factores de transcripción como los factores inducibles por hipoxia (HIF-1 y HIF- 2), (Sogawa y col., 1998; Hagen y col., 2003; Semenza, 2004). Durante la hipoxia, el HIF-1 activa gran cantidad de genes, incluyendo a los involucrados en la síntesis de NO, la eritropoyesis, la angiogénesis, la glucólisis y la proliferación celular (Neubauer, 2001; Semenza, 2004). En particular, la expresión de la iNOS estaría regulada de manera similar a los genes clásicamente regulados por oxígeno, por ejemplo, la eritropoyetina (Jelkmann, 1992; Melillo y col., 1995). La acumulación de nNOS mRNA ha sido observada en sistema nervioso después de hipoxia *in vivo* (Prabhakar y col., 1996; Guo y col., 1997), lo cual podría involucrar una activación directa de la transcripción de la nNOS a través de su unión con el HIF-1 (Kvietikova y col., 1995). Asimismo, la hipoxia aguda aumentó los niveles de eNOS mRNA en riñón, pulmón, hígado y ventrículos cardíacos de rata, con menor efecto en ventrículo izquierdo (Gess y col., 1997), y más recientemente se informó un aumento en células endoteliales humanas (Coulet y col., 2003).

No hay consenso sobre las isoformas de NOS involucradas en la cardioprotección conferida por la hipoxia crónica. Tanto la eNOS como la iNOS han sido previamente implicadas en diferentes modelos (Baker, 2004; Kolar y

Ostadal, 2004; Manukhina y col., 2006); el presente estudio involucra por primera vez a la isoforma neuronal en el mecanismo de adaptación cardíaca a la hipoxia.

4.3.6. Producción mitocondrial de NO y actividad mecánica del ventrículo izquierdo durante la maduración y el envejecimiento bajo condiciones de hipoxia y de normoxia.

El aumento en la actividad de mtNOS cardíaca en las ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica se asoció a una significativa prevención de la declinación en los valores de TD, +T y -T ocasionada por la edad. A los 4, 8 y 12 meses de edad, las ratas hipoxicas mostraron un incremento de 20, 35 y 45 %, respectivamente, en la actividad de mtNOS. Ese incremento se relacionó con una caída más lenta de los parámetros contráctiles en función de la edad en las ratas hipoxicas adultas que en sus controles normoxicas. En consecuencia, la actividad mecánica del músculo papilar resultó significativamente mayor en las ratas hipoxicas que en las normoxicas a los 4 (34 %), 8 (64%), y 12 (62%) meses de edad. De manera similar, el aumento en la actividad de mtNOS se relacionó con una mayor capacidad de recuperación de los parámetros de actividad mecánica post hipoxia/reoxigenación. Como se explica en 4.3.7, la inhibición competitiva de la citocromo oxidasa por el NO podría ser uno de los mecanismos involucrados en la modulación de la contractilidad cardíaca y de su tolerancia a la H/R por el NO. En la literatura se han descrito otros mecanismos que contribuirían al efecto protector del NO en la adaptación a la hipoxia (Manukhina y col., 2006). Estos estarían relacionados con sus efectos antioxidantes, antiapoptóticos, citoprotectores, preventivos de la sobrecarga de calcio, vasodilatadores y angiogénicos (Fig. 4.1).

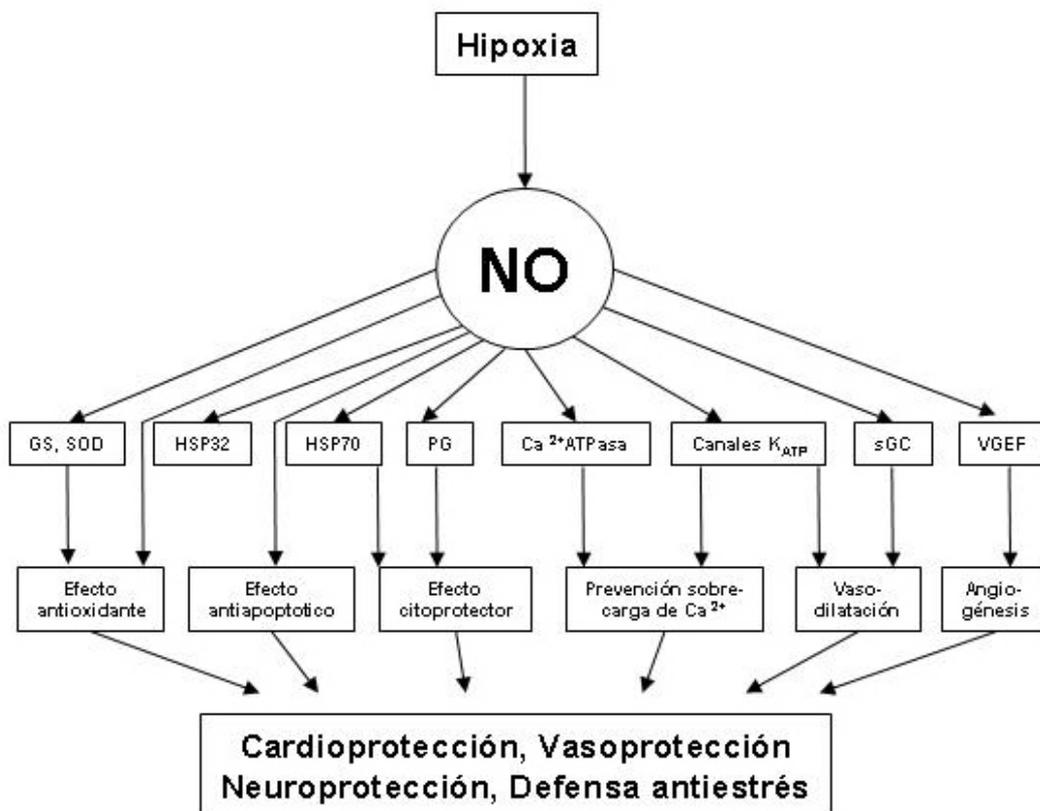


Fig. 4.1. Mecanismos dependientes del NO en los efectos protectores de la adaptación a la hipoxia. GS: glutatión; SOD: superóxido dismutasa; HSP: heat shock protein; PG: prostaglandinas; sGC: guanilato ciclasa soluble; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (adaptado de Manukhina y col., 2006).

Los efectos beneficiosos se perdieron en los animales hipóxicos de 18 meses en los cuales, a pesar de que la actividad de mtNOS estaba aumentada en un 60%, no hubo diferencias significativas en la función contráctil en comparación con las ratas normóxicas. Esto podría atribuirse a una excesiva inhibición de la citocromo oxidasa y un aumento en la formación de ONOO-, especie de reconocida toxicidad mitocondrial (Riobo y col., 2001). Un exceso en la producción de peroxinitrito no sólo produce disfunción mitocondrial, sino que puede tener otros efectos adversos (Fig.4.2), los cuales finalmente desencadenarían la muerte celular (Manukhina y col., 2006)

4.3.7. Correlación entre la producción mitocondrial de NO y la actividad mecánica del ventrículo izquierdo durante la aclimatización y la desaclimatización.

La actividad óptima de mtNOS asociada con la máxima actividad mecánica obtenida antes y después de la H/R *in vitro* durante los estudios de

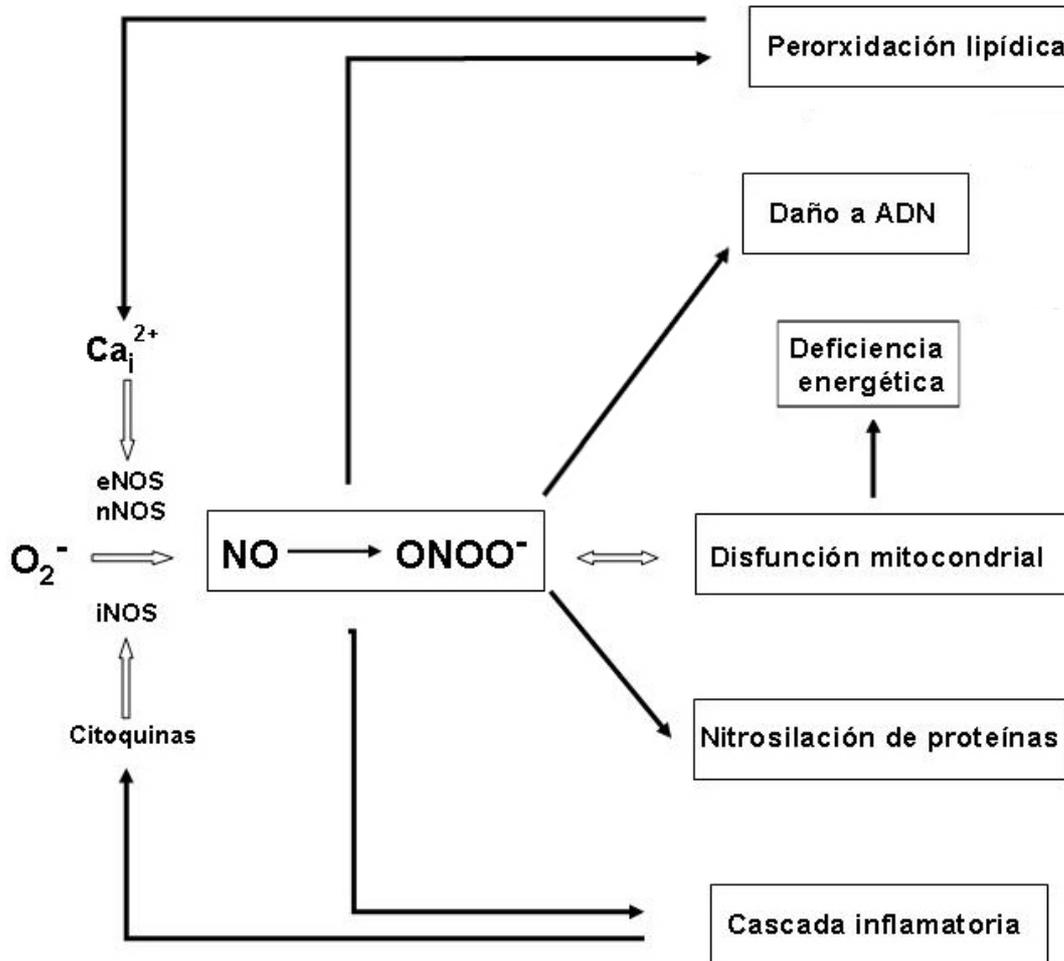


Fig. 4.2. Mecanismos deletéreos dependientes del NO (adaptado de Manukhina y col., 2006).

aclimatización, fue de $0.69 \text{ nmol NO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$, y correspondió a los animales jóvenes (2 meses). Durante la aclimatización, la actividad de mtNOS aumentó (Fig. 3.14), y la declinación en la actividad mecánica asociada a la edad se atenuó (Figs. 3.1 y 3.3). Durante la desaclimatización, ambos parámetros declinaron (Fig. 3.18). Al representar conjuntamente los datos obtenidos durante la aclimatización y la desaclimatización, la relación entre cada uno de los parámetros de contractilidad basal analizados y la actividad de mtNOS mostró un ajuste del tipo gaussiano (Figs. 3.24 y 3.25), ubicando a la producción óptima de NO en el rango de $0.70\text{-}0.74 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$.

Utilizando la medida de producción de NO óptima y considerando la inhibición respiratoria mitocondrial dependiente del NO (Poderoso y col., 1999; Valdez y col., 2000; Boveris y col., 2003; Antunes y col., 2004), el estado estacionario cardíaco intramitocondrial de NO fue estimado aproximadamente en 200 nM. Este valor es mayor que el de 50-100 nM medido en citosol de corazón perfundido de rata (Poderoso y col., 1998), sugiriendo así la importancia fisiológica de la difusión del NO desde las mitocondrias al citosol.

El movimiento cíclico de Ca^{2+} a través de los canales iónicos modula el acoplamiento excitación-contracción, produciendo la contracción y relajación de los miofilamentos (ver 1.2.1.2); a su vez, la síntesis de NO por las NOS constitutivas (incluyendo la mtNOS) es dependiente del Ca^{2+} . Las concentraciones de NO fluctúan durante el ciclo cardíaco, en el rango submicromolar, lo cual otorga sustento a un rol fisiológico del NO en la contractilidad miocárdica (Pinsky y col., 1997; Hare, 2003; Rastaldo y col., 2007). Muchas de las controversias en la literatura provienen de la direccionalidad de los efectos del NO (Hare, 2003; Sears y col., 2004). Por ejemplo, el impacto del NO sobre la contractilidad basal del miocardio ha sido informado como positivo (Kojda y col., 1996; Preckel y col., 1997), negativo (Brady y col., 1993), o ausente (Vandecasteele y col., 1999). Una de las explicaciones sugeridas para estos hallazgos divergentes es que el efecto del NO sobre la contractilidad es bimodal de una manera dependiente de la concentración (Mohan y col., 1996; Ziolo y col., 2001; Rastaldo y col., 2007) como se muestra en el presente estudio. Además, como puede verse en la Fig. 4.3, existen respuestas específicas para las distintas isoformas y localizaciones de NOS en el miocardio (Hare, 2003; Rastaldo y col., 2007). (Barouch y col., 2002).

4.3.8. Mecanismos moduladores de la contractilidad. Rol del NO mitocondrial.

Existen varios mecanismos por los cuales el NO modularía la actividad mecánica del corazón (Hare, 2003; Sears y col., 2004; Rastaldo y col., 2007) y explicarían que un moderado incremento en su producción pueda relacionarse con una mejor función contráctil y tolerancia a la H/R. Nuestros estudios,

mostrando un aumento en la respuesta al calcio de la tensión desarrollada, así como de las velocidades máximas de contracción y relajación, hasta 5 meses después de interrumpida la hipopresión, sugieren que cambios en la regulación del calcio participan en el mecanismo de preservación de la función del miocardio por la hipoxia crónica. El aumento del NO producido por las mitocondrias podría estar involucrado en estos cambios .

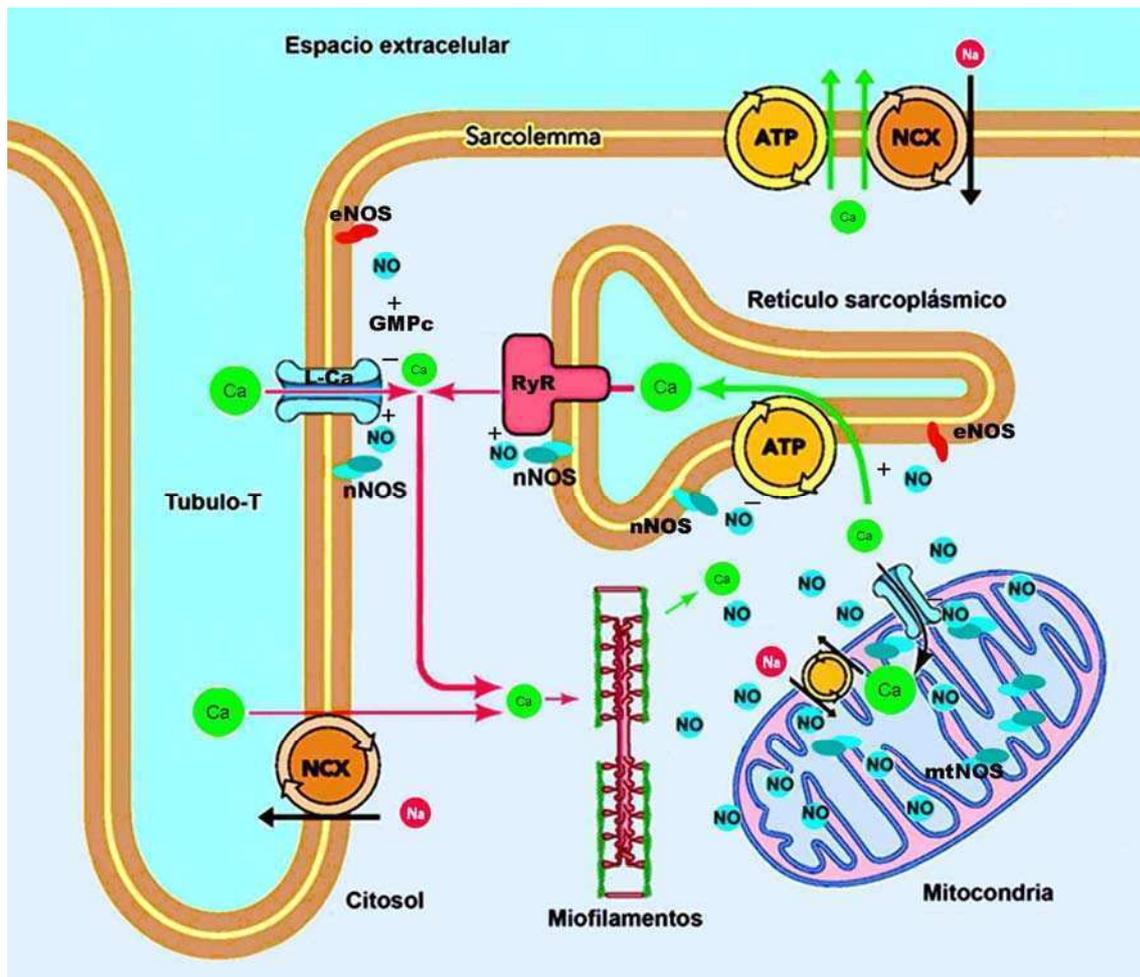


Fig. 4.3. Transporte de Ca en cardiomiocitos y su modulación por NO. L-Ca: canal de Ca tipo L. RyR: canal de rianodina. ATP es ATPasa (SR y sarcolemal). NCX: intercambiador Na/Ca. Adaptado de Bers, 2002.

El NO modula la actividad de varios canales de calcio clave para el acoplamiento excitación-contracción y mecano-energético (Fig. 4.3). Los mecanismos por los cuales el NO modula los movimientos cíclicos del calcio miocárdico son aún controvertidos. Los canales L de calcio del sarcolemma y los calcio-ATPasa del SR serían modulados por vías GMPc dependientes e

independientes (Bers, 2002; Hare, 2003), las últimas fundamentalmente por la reacción de S-nitrosilación de grupos sulfhidrilos de cisteína (Hare, 2003; Rastaldo y col., 2007). Las diferentes isoformas de NOS poseen localizaciones intracelulares específicas. En particular, la nNOS, encontrada fundamentalmente en retículo sarcoplásmico (Hare, 2003; Rastaldo y col., 2007, Sears y col., 2004) y mitocondrias (Kanai y col., 2001, y el presente estudio), regularía preferencialmente la liberación y recaptura de calcio, potenciando la fuerza cardíaca desarrollada. El NO generado por la nNOS del SR activaría los canales de rianodina (RyR) por nitrosilación (Xu y col., 1998) modulando las señales citosólicas de Ca^{2+} . Existen evidencias de que éstas son eficientemente transmitidas a las mitocondrias, lo cual genera un acoplamiento entre la excitación-contracción de los miofilamentos y la producción de energía oxidativa mitocondrial (Csordas y col., 2006).

El NO funcionaría entonces como un mediador de la homeostasis del calcio celular, de una manera altamente compleja y específica (Clementi, 1998), lo cual afectaría a su vez la homeostasis del calcio mitocondrial. En células endoteliales se demostró que la estimulación de la recaptura de calcio por la mitocondria puede activar la producción mitocondrial de NO, el cual inhibiría la entrada de calcio, convirtiéndose así en un potencial componente de un sistema de retroalimentación negativa (Dedkova y Blatter, 2005). En los cardiomiocitos, un mecanismo similar sería de particular importancia en la protección contra una sobrecarga de calcio mitocondrial y podría estar involucrado en la cardioprotección por la hipoxia crónica.

Además de la modulación de los movimientos de calcio, el NO influiría en la energética del miocardio a través de la modulación de la biodisponibilidad y el metabolismo del oxígeno. De acuerdo al concepto clásico, el NO generado por la isoforma endotelial de NOS difunde a las células adyacentes de músculo liso, donde vía cGMP conduce a la vasodilatación, incrementando así el flujo sanguíneo y la liberación de oxígeno al tejido (Rapoport y col., 1983; Clementi y col., 1999).

Por otra parte, es conocido que el NO actúa como un regulador fisiológico de la respiración mitocondrial a través de mecanismos cGMP-independientes (Fig. 4.4). El NO inhibe la respiración mitocondrial por inhibición rápida, selectiva y reversible de la citocromo oxidasa (Brown y Cooper, 1994;

Cleeter y col., 1994; Cassina y Radi, 1996; Poderoso y col., 1996; Clementi y col., 1999; Brown y Borutaite, 2007). Esta inhibición del complejo IV ocurre en competencia con el O_2 (Sarti y col., 2000; Cooper, 2002; Mason y col., 2006; Cooper y Giulivi, 2007), de modo tal que el NO aumenta drásticamente la concentración de O_2 requerida para obtener la mitad de la velocidad máxima de consumo de O_2 de $1,4 \mu M$ en ausencia de NO a $3,4 \mu M$ en presencia de $0,2 \mu M$ NO (Costa y col., 1997; Boveris y col., 2000). En mitocondrias, sinaptosomas y membranas mitocondriales, el 50% de inhibición de la cadena respiratoria ocurre cuando la relación O_2/NO se halla entre 150 y 600 (Cleeter y col., 1994; Boveris y col., 1999; Antunes y col., 2004).

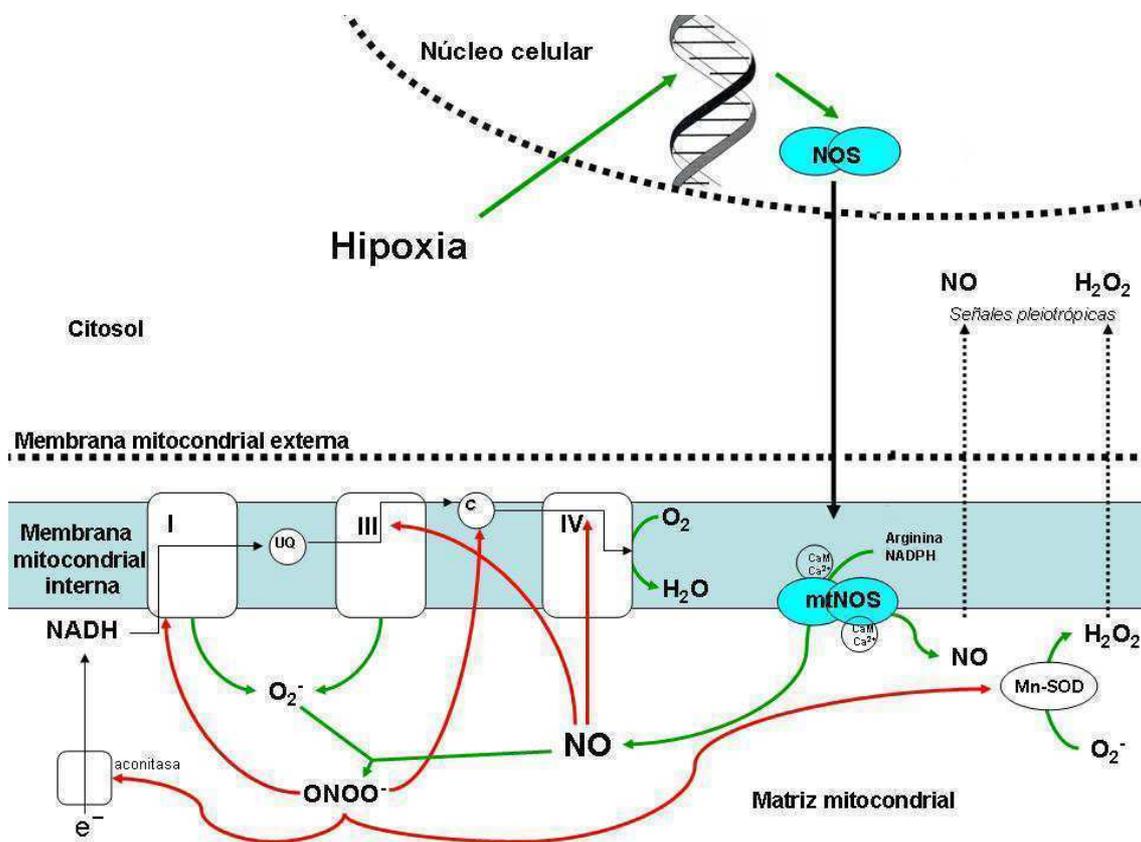


Fig. 4.4. Interacción del NO con la cadena respiratoria mitocondrial. Las líneas verdes indican producción y las rojas indican inhibición. Ver explicación en el texto.

Aparte de la acción del NO sobre la citocromo oxidasa, otros complejos respiratorios (fundamentalmente complejos I y III) son inhibidos con menor potencia pero más persistentemente por el NO y especies reactivas del

nitrógeno (RNS), esencialmente por alteraciones directas sobre las proteínas respiratorias. En particular, el complejo I es inactivado por una variedad de vías diferentes (Brown y Borutaite, 2004), incluyendo probablemente mecanismos de S-nitrosilación (Borutaite y col., 2000; Burwell y col., 2006; Dahm y col., 2006) y nitración, o sea, la adición del grupo NO_2^+ usualmente a un residuo de tirosina (Riobo y col., 2001; Murray y col., 2003).

El complejo II es relativamente insensible al NO y a las RNS (Cassina y Radi, 1996; Welter y col., 1996; Pearce y col., 2001). El complejo III puede ser inhibido reversiblemente por elevadas concentraciones de NO (Poderoso y col., 1996; Poderoso y col., 1999). La producción de anión superóxido a nivel de los complejos I y III, y la consiguiente producción de H_2O_2 , aumenta cuando la cadena respiratoria se halla inhibida por acción de niveles moderados de NO. Elevadas concentraciones de NO inhiben la producción de H_2O_2 , por combinación con su precursor anión superóxido, resultando en la producción de peroxinitrito (Poderoso y col., 1996; Poderoso y col., 1998; Borutaite y Brown, 2003). El peroxinitrito bloquea la transferencia de electrones en varios sitios de la cadena respiratoria, y también tiene otros efectos sobre las mitocondrias que pueden influir sobre la producción de energía, como ser la inhibición de la aconitasa, enzima del ciclo de Krebs (Gardner y col., 1997; Castro y col., 1998).

El reconocimiento del NO como el primer regulador fisiológico conocido que actúa directamente sobre la cadena respiratoria mitocondrial reveló la importancia que el NO tendría en la adaptación celular a la hipoxia (Costa, 2007). La respiración inhibida por el NO permitiría que el O_2 difunda más lejos a lo largo de su gradiente, extendiendo el espacio de tejido adecuadamente oxigenado a mayor distancia del vaso sanguíneo (Poderoso y col., 1998), lo cual ayudaría a aumentar la eficiencia cardíaca. Se ha informado que la inhibición de la NOS aumenta el consumo de O_2 y reduce la eficiencia mecánica del corazón, evaluada como la relación entre el trabajo realizado por el ventrículo y el O_2 consumido (Saavedra y col., 2002).

Se ha descrito también que el NO estimula la biogénesis mitocondrial en cardiomiocitos y otros tipos celulares (Brown, 2003; Nisoli y col., 2003) y, por otra parte, estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que el número de mitocondrias por unidad de volumen aumenta en el ventrículo izquierdo

(Costa y col., 1988) durante la aclimatización a una altura de 4400 m. El aumento en la densidad numérica estuvo acompañado por una disminución en el tamaño de las mitocondrias sin cambios en la densidad volumétrica (Costa y col., 1988). Resultados similares han sido recientemente confirmados en corazón de ratas expuestas a 5000 m de altura simulada como en el presente estudio (Nouette-Gaulain y col., 2005). El consiguiente aumento de la relación superficie/volumen mitocondrial incrementaría la capacidad de extracción de oxígeno por el tejido. En hígado, el examen de microfotografías electrónicas mostró una distribución mas homogénea de las mitocondrias en ratas expuestas crónicamente a la hipoxia que en sus controles (Costa y col., 1988). Las células con mitocondrias dispuestas en “clusters” o agregados, como se encuentran en hígado y otros tejidos, requieren concentraciones de O₂ más elevadas que las células con mitocondrias uniformemente distribuídas (Jones, 1984; Jones, 1986). En cardiomiocitos, donde las mitocondrias se encuentran fundamentalmente entre las miofibrillas, no se detectaron cambios en su distribución en las ratas aclimatizadas. Sin embargo, un aumento del NO tendría un rol similar, permitiendo al O₂ difundir más lejos y alcanzar a más mitocondrias, a través de su control sobre el consumo de O₂ mitocondrial (Poderoso y col., 1998).

Otros mecanismos podrían estar asimismo involucrados en el aumento de la eficiencia de la contracción del miocardio en términos de la utilización de la energía en la adaptación a la hipoxia. Se ha informado que la aclimatización a la altura disminuye las actividades específicas de varias ATPasas sarcolemales, y al mismo tiempo, incrementa sus afinidades por el ATP, lo cual permitiría una mayor eficiencia en la utilización del ATP (Ostadal y col., 1999). La selección de sustratos y vías metabólicas de alta eficiencia energética contribuiría a disminuir los requerimientos de oxígeno (Ostadal y col., 1999).

El incremento en la actividad de mtNOS y liberación de NO en el corazón hipóxico probablemente funcione como un mecanismo molecular de señalización que conduce a la preservación de la masa cardíaca y el retardo del proceso de apoptosis, contribuyendo a una mejora en la función contráctil. Considerando al NO mitocondrial, se han observado correlaciones biológicamente relevantes entre la actividad de la mtNOS y el ciclo de proliferación celular (Galli y col., 2003) y han sido interpretadas como el efecto

pleiotrópico del NO liberado por las mitocondrias (Boveris y col., 2002; Boyd y Cadenas, 2002). La difusión de NO y H₂O₂ desde la mitocondria al citosol constituiría una señal pleiotrópica que indica una carga energética mitocondrial optimizada a los factores citosólicos de activación involucrados en la regulación del ciclo celular (Fig. 4.4).

A pesar de la gran variedad de factores que han sido propuestos para explicar el efecto cardioprotector de la hipoxia crónica (Baker, 2004; Kolar y Ostadal, 2004), el detalle del mecanismo molecular aun permanece sin dilucidarse. En cuanto a la participación del NO, otros posibles mecanismos incluyen la apertura de los canales sarcolemales y/o mitocondriales de potasio dependientes de ATP, la inhibición de la apertura de los poros de permeabilidad transitoria mitocondriales, y acciones antioxidantes directas, tales como la inhibición de los efectos del anión superóxido y el peroxinitrito (Jones y Bolli, 2006).

Considerando la extendida memoria de la cardioprotección conferida por la adaptación a la hipoxia hipobárica crónica sostenida, la elucidación de la base molecular de este fenómeno sería de invaluable importancia para el desarrollo de agentes farmacológicos o nuevas terapias génicas como estrategias para inducir en forma permanente un fenotipo cardioprotegido. El NO producido por las mitocondrias parecería jugar un rol clave en este mecanismo, posiblemente a través de la regulación del consumo de oxígeno y la producción de especies reactivas del oxígeno por la cadena respiratoria, la modulación de la concentración intramitocondrial de calcio, la activación de los canales mitocondriales de potasio ATP-dependientes y la señalización celular a través de la liberación de NO mitocondrial al citosol.

5. CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó la función del miocardio en ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica y en sus controles mediante la determinación de los parámetros de actividad mecánica de los músculos papilares de ventrículo izquierdo. Entre los hallazgos más relevantes se destaca que la hipoxia retardó la declinación asociada a la edad en los principales parámetros de actividad mecánica del músculo papilar. En consecuencia, los animales aclimatizados adultos, mostraron un aumento en la capacidad funcional del ventrículo izquierdo con respecto a sus controles etarios normóxicos. Además, los músculos papilares de los animales aclimatizados presentaron una mayor capacidad de recuperación de su actividad contráctil luego de ser sometidos a una deprivación aguda de oxígeno. Ambos efectos cardioprotectores tuvieron un tiempo medio de normalización mayor de 5 meses una vez suspendido el estímulo hipóxico. Este modelo de cardioprotección endógena constituye así el de mayor memoria informado a la fecha, resultando de fundamental interés la elucidación de sus mecanismos celulares.

En relación con éstos, un aumento en la actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) en ventrículo izquierdo, asociado a los efectos de la hipoxia sobre la actividad mecánica, constituyó uno de los hallazgos bioquímicos más relevantes del estudio. Se pudo establecer una relación bifásica entre la función contráctil y la actividad de la mtNOS y fijar un nivel óptimo de NO ($0.70-0.74 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) para el cual los efectos cardioprotectores observados serían máximos. Asimismo, el tiempo medio de declinación de la actividad de mtNOS durante la desaclimatización fue de 5 meses, coincidiendo con los tiempos medios de cardioprotección pre y post hipoxia/reoxigenación.

Estos efectos sobre la capacidad contráctil y la actividad de la mtNOS mostraron una persistencia significativamente mayor que los cambios clásicos que ocurren durante la aclimatización. En particular, la disminución en la ganancia de peso corporal y el aumento del hematocrito se encontraron normalizados ya a los 2 meses de suspendido el estímulo hipóxico. En cuanto

a la hipertrofia desarrollada por el ventrículo derecho, declinó con un tiempo medio de 3.7 meses. La exposición crónica a la altura, en cambio, no produjo modificaciones en la masa ventricular izquierda, lo cual implicaría que los efectos cardioprotectores observados serían sólo atribuibles a la adaptación a la hipoxia.

En cuanto a los parámetros de actividad mecánica determinados en músculo papilar, la tensión de reposo (TR), la máxima tensión desarrollada (TD), y las velocidades máximas de contracción (+T) y de relajación (-T) declinaron hasta los 8 meses de edad, y luego permanecieron esencialmente constantes. En las ratas sometidas a hipoxia, la TD, +T, y -T también disminuyeron durante la maduración, pero más lentamente que en los controles, resultando en valores 64, 67, y 52% superiores, respectivamente, a los 8 meses de edad. La elasticidad de las fibras musculares, evaluada a través de la TR, no se modificó por la hipoxia. El calcio estaría involucrado en el mecanismo de los efectos descritos, ya que los músculos papilares de los animales expuestos a hipoxia tuvieron una sensibilidad y una respuesta máxima al calcio aumentadas con respecto a los controles normóxicos. La persistencia de esta última aún a los 5 meses de desaclimatización ($t_{1/2} = 5.9$ meses) destaca su participación en los cambios de actividad mecánica observados.

La tolerancia de la función contráctil del músculo papilar a un episodio de hipoxia/reoxigenación *in vitro* fue significativamente superior en los animales aclimatizados. Este efecto declinó con un tiempo medio de 5.3 meses una vez interrumpida la hipopresión, constituyendo así la hipoxia hipobárica crónica sostenida estudiada en esta investigación el modelo de cardioprotección de mayor persistencia conocido hasta el momento.

En el presente estudio, se evaluó que la liberación de NO mitocondrial da cuenta del 55% del total de NO en citosol de ventrículo izquierdo de animales normóxicos, lo cual indicaría la relevancia de las mitocondrias en la generación del NO celular. Asimismo se describió por primera vez el comportamiento de la actividad de la mtNOS cardíaca durante la maduración y el envejecimiento. La actividad de la mtNOS disminuyó con el avance de la edad, acompañando la declinación en la función contráctil del miocardio. La HHC a su vez aumentó hasta un 60% la producción de NO por las mitocondrias

de ventrículo izquierdo. Este aumento fue suficientemente marcado como para contrarrestar la declinación asociada a la edad, y alcanzar una actividad mayor que la correspondiente a ratas jóvenes normóxicas. La actividad de mtNOS declinó una vez finalizada la hipoxia con un tiempo medio de 5 meses. El efecto de la hipoxia fue específico para la mtNOS, ya que la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales I-III y IV, así como el contenido de citocromos aa_3 y c no se alteraron por la hipoxia. El aumento en la actividad de mtNOS se acompañó por un incremento en la expresión de las isoformas iNOS y nNOS, indicando que el cambio en la producción de NO mitocondrial durante la aclimatación involucra variaciones en el contenido de enzima. El presente estudio involucra por primera vez a la isoforma neuronal en el mecanismo de adaptación cardíaca a la hipoxia.

Este modelo de hipoxia hipobárica crónica sostenida es el que representa con mayor fidelidad la hipoxia fisiológica característica de la altura y la de varias condiciones patológicas respiratorias y/o circulatorias, tales como el corazón pulmonar. El modelo desarrollado en nuestro laboratorio provee el efecto más persistente conocido hasta el momento sobre la preservación de la actividad mecánica cardíaca y su tolerancia a la deprivación de oxígeno. Por lo tanto, la elucidación de la base molecular de este fenómeno cobra gran importancia para el desarrollo de agentes farmacológicos efectivos y de nuevas terapias génicas dirigidas a inducir fenotipos permanentemente cardioprotectidos (cardioprotección profiláctica). Los resultados de esta tesis apuntan a un rol de la mtNOS cardíaca en los mecanismos involucrados.

Lic. Pablo H. La Padula

Dra. Lidia E. Costa

6. RESUMEN

En la presente tesis se evaluó la función miocárdica durante la maduración y el envejecimiento, tanto en condiciones de normoxia como durante la respuesta fisiológica a la hipoxia hipobárica crónica con exposición sostenida, y la duración de los efectos de la aclimatización una vez suprimido el estímulo hipóxico. Simultáneamente se estudiaron los mecanismos celulares implicados, en particular, a nivel mitocondrial.

Los estudios se realizaron en ratas Wistar macho de 7 semanas de edad sometidas a 5000 m de altura simulada (53.8 kPa = 404 mmHg) en una cámara de hipopresión durante períodos variables hasta los 18 meses, y en sus respectivos controles a nivel del mar (101.3 kPa = 760 mmHg). Una vez establecido el tiempo requerido para lograr la aclimatización, se evaluó el curso de regresión de los efectos observados durante la desaclimatización.

Durante la aclimatización tuvieron lugar las respuestas clásicas a la altura. Así, el valor del hematocrito aumentó, el peso corporal disminuyó con respecto a los controles y el peso del corazón se incrementó debido a la hipertrofia del ventrículo derecho, en tanto que la masa ventricular izquierda no sufrió modificaciones significativas. El peso corporal y el valor globular se encontraron normalizados ya a los dos meses de suspendido el estímulo hipóxico en tanto que el incremento en la masa ventricular derecha revirtió con un tiempo medio ($t_{1/2}$) de 3.7 meses.

La función miocárdica se evaluó a través de la determinación de los parámetros de actividad mecánica de los músculos papilares del ventrículo izquierdo en condiciones isométricas a 30°C. Las determinaciones se realizaron en condiciones basales y durante un episodio de 60 min de hipoxia seguida de 30 min de reoxigenación (H/R). Una vez caracterizada la función miocárdica durante la hipoxia, se estudió la respuesta al calcio de los parámetros afectados.

La tensión de reposo (TR), la máxima tensión desarrollada (TD), y las velocidades máximas de contracción (+T) y de relajación (-T) declinaron hasta los 8 meses de edad, y luego permanecieron esencialmente constantes. En las

ratas sometidas a hipoxia, la TD, +T, y -T también disminuyeron durante la maduración, pero más lentamente que en los controles, resultando en valores 64, 67, y 52% superiores, respectivamente, a los 8 meses de edad. La elasticidad de las fibras musculares, evaluada a través de la TR, no se modificó por la hipoxia. Los parámetros temporales no sufrieron modificaciones fisiológicamente relevantes por la edad ni por la hipoxia. La capacidad de recuperación de TD, +T, y -T después de un episodio de H/R fue superior en las ratas jóvenes tanto normóxicas como hipóxicas y en las ratas adultas aclimatizadas mejoró con respecto a los controles, equiparándose con la de los animales jóvenes. En las ratas de 18 meses normóxicas e hipóxicas, los parámetros basales de contractilidad y su tolerancia a un episodio de H/R fueron similares. En conclusión, la HHC tuvo un efecto protector sobre la declinación de la contractilidad con la edad, y a su vez mejoró la respuesta contráctil frente a un episodio agudo de H/R. Ambos efectos cardioprotectores se perdieron con el envejecimiento.

La función contráctil en respuesta al calcio y a la H/R fue determinada en músculo papilar de animales óptimamente aclimatizados luego de tres periodos de retornados a presión atmosférica ambiental.

En todo el rango de concentración de calcio estudiado, la TD, +T, y -T fueron superiores en los grupos de animales prehipóxicos que en los controles. El porcentaje de aumento promedio de los tres parámetros mostró una declinación lineal durante la desaclimatización, con un tiempo medio de 5.9 meses. A los 0.4 meses, la concentración de calcio requerida para obtener el 50% de la respuesta máxima fue significativamente mayor que en el resto de los grupos. Por lo tanto, los resultados sugieren que la respuesta al calcio está involucrada en el mecanismo del efecto de la hipoxia sobre la preservación de la función miocárdica basal durante la maduración.

La tolerancia de la TD a la H/R fue 129, 107, y 71% mayor en las ratas desaclimatizadas por 0.4, 2 y 5 meses, respectivamente, que en los controles; +T y -T mostraron aumentos similares. Los tres parámetros presentaron una declinación similar durante la desaclimatización, con un tiempo medio promedio de 5.3 meses. Nuestro modelo de hipoxia proveería el efecto cardioprotector más persistente informado a la fecha una vez interrumpido el tratamiento.

La producción de NO mitocondrial se estudió en todos los grupos de ratas sometidas a hipoxia y en sus controles normóxicos.

Las mitocondrias cardíacas de animales normóxicos jóvenes (2 meses) produjeron 0.62 y 0.37 nmol NO·min⁻¹·mg proteína⁻¹ en los estados metabólicos 4 y 3, respectivamente. La liberación de NO mitocondrial al citosol que fue estimada en 29 nmol NO·min⁻¹·g corazón⁻¹, dando cuenta del 55% de la generación de NO. La actividad de la mtNOS medida en membranas submitocondriales a pH óptimo, el cual fue determinado en 7.4, resultó de 0.69 nmol NO·min⁻¹·mg proteína⁻¹.

En el presente estudio se describió por primera vez el comportamiento de la actividad de la mtNOS cardíaca durante la maduración y el envejecimiento. Las ratas normóxicas mostraron una declinación en la producción de NO mitocondrial de un 20% entre los 2 y los 18 meses de edad. Contrariamente, la exposición a la hipoxia produjo un aumento del 20-60%, en comparación con sus respectivos controles, durante el mismo periodo. A su vez la actividad de la NADH-citocromo c reductasa y citocromo oxidasa declinó un 36 y 12%, respectivamente, entre los 2 y los 18 meses de edad, pero no se modificó por la exposición a la hipoxia. Los contenidos de citocromo c y aa₃ no sufrieron modificaciones por la hipoxia. En conclusión, el efecto de la hipoxia fue específico para la mtNOS.

El aumento en la actividad de mtNOS de ventrículo izquierdo en los animales hipóxicos estuvo asociado a un retardo en la declinación de la actividad contráctil del músculo papilar ocasionada por la edad y a una aumentada capacidad de recuperación post H/R. La correlación de la actividad de mtNOS de ventrículo izquierdo con la contractilidad de músculo papilar (determinada como TD, +T, y -T) resultó bifásica, correspondiendo la actividad óptima de mtNOS a la medida en las ratas jóvenes. Se concluyó que la mtNOS cardíaca juega un rol en la contractilidad miocárdica.

La actividad de la mtNOS una vez suspendido el estímulo hipóxico fue 42, 27 y 20% mayor que en los controles a los 0.4, 2, y 5 meses de desaclimatización, respectivamente. El tiempo medio de declinación de la actividad de mtNOS fue de 5 meses, coincidiendo con los tiempos medios de cardioprotección pre y post H/R. Por lo tanto, los efectos de la hipoxia sobre la actividad de la mtNOS y la capacidad contráctil del ventrículo izquierdo poseen

una persistencia significativamente mayor que los cambios clásicos que ocurren durante la aclimatización.

La correlación entre la actividad de la mtNOS y la actividad contráctil pre y post H/R, determinada a través de sus parámetros TD, +T, y -T durante la aclimatización y la desaclimatización, permitió establecer una relación gaussiana. El valor de producción de NO óptimo, para el cual los efectos cardioprotectores observados serían máximos, fue ajustado en el rango de 0.70-0.74 nmol·min⁻¹·mg proteína⁻¹ para los diferentes parámetros estudiados.

El aumento en la actividad de mtNOS se acompañó por un incremento en la expresión de las isoformas iNOS y nNOS, determinadas por análisis de Western blot. El presente estudio involucra por primera vez a la isoforma neuronal en el mecanismo de adaptación cardíaca a la hipoxia. Durante la desaclimatización la expresión de ambas isoformas mostró un comportamiento similar a la actividad de mtNOS medida por el ensayo bioquímico. El tiempo medio de declinación fue de 5.3 y 4.7 meses para iNOS y nNOS, respectivamente, consistente con los valores determinados para la producción de NO, la actividad mecánica basal y la tolerancia a la H/R.

En conclusión, la adaptación a la hipoxia hipobárica crónica sostenida en ratas adultas aumentó la capacidad funcional del miocardio y su recuperación después de la H/R. La aclimatización cardíaca se desarrolló durante 4 a 12 meses de exposición a 5000 m de altura simulada y se perdió con el envejecimiento. Ambos efectos cardioprotectores persistieron por más de 5 meses una vez retornados los animales aclimatizados a nivel del mar. La mtNOS aumentó específicamente en las mitocondrias de miocardio de las ratas aclimatizadas, declinando una vez finalizada la exposición a la hipoxia. Su actividad y expresión tuvieron un comportamiento similar al de los parámetros de actividad mecánica del músculo papilar. La mtNOS cardíaca estaría regulada por el nivel de oxígeno en el aire inspirado y su correlación con los efectos cardioprotectores observados sugiere un rol para esta enzima en el mecanismo involucrado.

7. PUBLICACIONES

Parte de los resultados de la presente tesis conforman las siguientes publicaciones:

La Padula P, Costa LE. (2004) Cardioprotective Effect of Acclimatization to Sustained Hypobaric Hypoxia. *Proceedings of the XII Meeting of the Society for Free Radical Research*, Bologna, 137-140.

Valdez LB, Zaobornyj T, Alvarez S, Boveris A, La Padula P, and Costa LE. (2004) Effects of Hypoxia and Aging on Heart mtNOS. *Proceedings of the XII Meeting of the Society for Free Radical Research*, Bologna, 125-128.

La Padula P, Costa LE. (2005) Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. I. Mechanical activity. *J Appl Physiol* **98**: 2363-2369.

Zaobornyj T, Valdez LB, La Padula P, Costa LE, Boveris A. (2005) Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. II. mtNOS activity. *J Appl Physiol* **98**: 2370-2375.

La Padula P, Bustamante J, Czerniczyniec A, Costa LE. (2008) Time course of regression of the protection conferred by simulated high altitude to rat myocardium: correlation with mtNOS. *J Appl Physiol* **105**: 951-957.

8. REFERENCIAS

Acosta D. (1590) *Historia Natural y Moral de las Indias, en que se tratan las Cosas Notables del Cielo, y Elementos, Metales, Plantas, y Animales dellas: Y los ritos, y Ceremonias, Leyes, y Gobierno, y Guerra de los indios.* Sevielle, Juan de León.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615.

Alvarez S, Boveris A. (2004) Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* **37**: 1472-1478.

Antunes F, Boveris A, Cadenas E. (2004) On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16774-16779.

Asemu G, Papousek F, Ostadal B, Kolar F. (1999) Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J Mol Cell Cardiol* **31**: 1821-1831.

Baker EJ, Boerboom LE, Olinger GN, Baker JE. (1995) Tolerance of the developing heart to ischemia: impact of hypoxemia from birth. *Am J Physiol* **268**: H1165-1173.

Baker JE, Holman P, Kalyanaraman B, Griffith OW, Pritchard KA, Jr. (1999) Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann N Y Acad Sci* **874**: 236-253.

Baker JE. (2004) Oxidative stress and adaptation of the infant heart to hypoxia and ischemia. *Antioxid Redox Signal* **6**: 423-429.

Balaban RS. (2002) Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* **34**: 1259-1271.

Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, et al. (1994) Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* **269**: 27580-

27588.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. (2002) Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* **416**: 337-339.

Bartling B, Hilgefort C, Friedrich I, Silber RE, Simm A. (2003) Cardio-protective determinants are conserved in aged human myocardium after ischemic preconditioning. *FEBS Lett* **555**: 539-544.

Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. (1995) Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 896-900.

Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. (1996) Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 40-44.

Belge C, Massion PB, Pelat M, Balligand JL. (2005) Nitric oxide and the heart: update on new paradigms. *Ann N Y Acad Sci* **1047**: 173-182.

Bers DM. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**: 198-205.

Bert P. (1878) *La Pression Barométrique: Recherches de physiologie expérimentale*. Paris, Masson.

Besse S, Assayag P, Delcayre C, Carre F, Cheav SL, Lecarpentier Y, Swynghedauw B. (1993) Normal and hypertrophied senescent rat heart: mechanical and molecular characteristics. *Am J Physiol* **265**: H183-190.

Bolli R. (2007) Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**: H19-27.

Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC. (2000) Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 405-412.

Borutaite V, Brown GC. (2003) Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion. *Free Radic Biol Med* **35**: 1457-1468.

Borutaite V, Moncada S, Brown GC. (2005) Nitric oxide from inducible nitric oxide synthase sensitizes the inflamed aorta to hypoxic damage via respiratory inhibition. *Shock* **23**: 319-323.

Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. (1999) Regulation of

mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol* **301**: 188-198.

Boveris A, Costa LE, Poderoso JJ, Carreras MC, Cadenas E. (2000) Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* **899**: 121-135.

Boveris A, Alvarez S, Navarro A. (2002a) The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* **33**: 1186-1193.

Boveris A, Arnaiz SL, Bustamante J, Alvarez S, Valdez L, Boveris AD, Navarro A. (2002b) Pharmacological regulation of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* **359**: 328-339.

Boveris A, D'Amico G, Lores-Arnaiz S, Costa LE. (2003a) Enalapril increases mitochondrial nitric oxide synthase activity in heart and liver. *Antioxid Redox Signal* **5**: 691-697.

Boveris A, Valdez LB, Alvarez S, Zaobornyj T, Boveris AD, Navarro A. (2003b) Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal* **5**: 265-271.

Boveris DL, Boveris A. (2007) Oxygen delivery to the tissues and mitochondrial respiration. *Front Biosci* **12**: 1014-1023.

Bowditch H. (1871) Uber die Eigenthumlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber sachs Akad Wiss* **23**: 652-689.

Boyd CS, Cadenas E. (2002) Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol Chem* **383**: 411-423.

Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE. (1993) Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* **265**: H176-182.

Brandes R, Bers DM. (1997) Intracellular Ca²⁺ increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ Res* **80**: 82-87.

Brandes R, Bers DM. (2002) Simultaneous measurements of mitochondrial NADH and Ca²⁺ during increased work in intact rat heart trabeculae. *Biophys J* **83**: 587-604.

Brodde OE, Michel MC. (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* **51**: 651-690.

Brookes PS. (2004) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion* **3**: 187-

204.

Brown GC, Cooper CE. (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* **356**: 295-298.

Brown GC. (2003) Cell biology. NO says yes to mitochondria. *Science* **299**: 838-839.

Brown GC, Borutaite V. (2004) Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* **1658**: 44-49.

Brown GC, Borutaite V. (2007) Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res* **75**: 283-290.

Bunn HF, Poyton RO. (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* **76**: 839-885.

Burwell LS, Nadtochiy SM, Tompkins AJ, Young S, Brookes PS. (2006) Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochem J* **394**: 627-634.

Bustamante J, Bersier G, Romero M, Badin RA, Boveris A. (2000) Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **376**: 239-247.

Bustamante J, Bersier G, Badin RA, Cymering G, Parodi A, Boveris A. (2002) Sequential NO production by mitochondria and endoplasmic reticulum during induced apoptosis. *Nitric Oxide* **6**: 333-341, 2002.

Bustamante J, Di Libero E, Fernandez-Cobo M, Monti N, Cadenas E, Boveris A. (2004) Kinetic analysis of thapsigargin-induced thymocyte apoptosis. *Free Radic Biol Med* **37**: 1490-1498.

Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. (2003) Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **108**: 79-85.

Carreras MC, Peralta JG, Converso DP, Finocchietto PV, Rebagliati I, Zaninovich AA, Poderoso JJ. (2001) Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid-dependent regulation of O² uptake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H2282-2288.

Cassina A, Radi R. (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and

peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* **328**: 309-316.

Castro LA, Robalinho RL, Cayota A, Meneghini R, Radi R. (1998) Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **359**: 215-224.

Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* **345**: 50-54.

Clementi E. (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem Pharmacol* **55**: 713-718.

Clementi E, Brown GC, Foxwell N, Moncada S. (1999) On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1559-1562.

Cooper CE. (2002) Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem Sci* **27**: 33-39.

Cooper CE, Giulivi C. (2007) Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption. II: Molecular mechanism and tissue physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**: C1993-2003.

Cortassa S, Aon MA, Marban E, Winslow RL, O'Rourke B. (2003) An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophys J* **84**: 2734-2755.

Cortassa S, Aon MA, O'Rourke B, Jacques R, Tseng HJ, Marban E, Winslow RL. (2006) A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte. *Biophys J* **91**: 1564-1589.

Costa LE. (2007) Nitric oxide and mitochondrial adaptation to hypobaric hypoxia. En: *Advances in Chemistry and Biology of Nitric Oxide*, eds Giménez MS, Gomez NN, Research Signpost, Kerala, India.

Costa LE, Boveris A, Koch OR, Taquini AC. (1988) Liver and heart mitochondria in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Am J Physiol* **255**: C123-129.

Costa LE, Llesuy S, Boveris A. (1993) Active oxygen species in the liver of

rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Am J Physiol* **264**: C1395-1400.

Costa LE, La-Padula P, Lores-Arnaiz S, D'Amico G, Boveris A, Kurnjek ML, Basso N. (2002) Long-term angiotensin II inhibition increases mitochondrial nitric oxide synthase and not antioxidant enzyme activities in rat heart. *J Hypertens* **20**: 2487-2494.

Costa LE, Mendez G, Boveris A. (1997) Oxygen dependence of mitochondrial function measured by high-resolution respirometry in long-term hypoxic rats. *Am J Physiol Cell Physiol* **273**: C852-858.

Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F. (2003) Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem* **278**: 46230-46240.

Csordas A, Pankotai E, Snipes JA, Cselenyak A, Sarszegi Z, Cziraki A, Gaszner B, Papp L, Benko R, Kiss L, Kovacs E, Kollai M, Szabo C, Busija DW, Lacza Z. (2007) Human heart mitochondria do not produce physiologically relevant quantities of nitric oxide. *Life Sci* **80**: 633-637.

Csordas G, Renken C, Varnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnoczky G. (2006) Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* **174**: 915-921.

Chance B, Williams GR. (1955a) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* **217**: 383-393.

Chance B, Williams GR. (1955b) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* **217**: 409-427.

Chance B, Williams GR. (1955c) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J Biol Chem* **217**: 429-438.

Chance B, Williams GR. (1955d) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra. *J Biol Chem* **217**: 395-407.

Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. (1994) Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* **269**: 6765-6772.

Chen K, Pittman RN, Popel AS. (2008) Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. *Antioxid Redox Signal* **10**: 1185-1198.

- Chesnais JM, Fischmeister R, Mery PF.** (1999) Positive and negative inotropic effects of NO donors in atrial and ventricular fibres of the frog heart. *J Physiol* **518**: 449-461.
- Chouabe C, Ricci E, Amsellem J, Blaineau S, Dalmaz Y, Favier R, Pequignot JM, Bonvallet R.** (2004) Effects of aging on the cardiac remodeling induced by chronic high-altitude hypoxia in rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: H1246-1253.
- Dahm CC, Moore K, Murphy MP.** (2006) Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J Biol Chem* **281**: 10056-10065.
- Davidson SM, Duchen MR.** (2006) Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovasc Res* **71**: 10-21.
- de Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Bucknall CA, Salas E, Martin JF, Moncada S.** (1993) Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* **341**: 84-85.
- Dedkova EN, Wang YG, Blatter LA, Lipsius SL.** (2002) Nitric oxide signalling by selective beta2-adrenoceptor stimulation prevents ACh-induced inhibition of beta2-stimulated Ca²⁺ current in cat atrial myocytes. *J Physiol* **542**: 711-723.
- Dedkova EN, Ji X, Wang YG, Blatter LA, Lipsius SL.** (2003) Signaling mechanisms that mediate nitric oxide production induced by acetylcholine exposure and withdrawal in cat atrial myocytes. *Circ Res* **93**: 1233-1240.
- Dedkova EN, Blatter LA.** (2005) Modulation of mitochondrial Ca²⁺ by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C836-845.
- Dedkova EN, Blatter LA.** (2006) Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide and ROS production by mitochondria-specific nitric oxide synthase (mtNOS) in cat ventricular myocytes. *Biophys J* **90**: 521a
- Dedkova EN, Wang YG, Ji X, Blatter LA, Samarel AM, Lipsius SL.** (2007) Signalling mechanisms in contraction-mediated stimulation of intracellular NO production in cat ventricular myocytes. *J Physiol* **580**: 327-345.
- Dedkova EN, Blatter LA.** (2008) Mitochondrial Ca²⁺ and the heart. *Cell Calcium* **44**: 77-91.
- Dedkova EN, Blatter LA.** (2009) Characteristics and function of cardiac

mitochondrial nitric oxide synthase. *J Physiol* **587**: 851-872.

Denton RM, Randle PJ, Martin BR. (1972) Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J* **128**: 161-163.

Denton RM, Richards DA, Chin JG. (1978) Calcium ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem J* **176**: 899-906.

Denton RM, McCormack JG. (1985) Ca²⁺ transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. *Am J Physiol* **249**: E543-554.

Denton RM, McCormack JG. (1990) Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu Rev Physiol* **52**: 451-466.

Derakhshan B, Hao G, Gross SS. (2007) Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. *Cardiovasc Res* **75**: 210-219.

Dietrich HH, Ellsworth ML, Sprague RS, Dacey RG, Jr. (2000) Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**: H1294-1298.

Eells JT, Henry MM, Gross GJ, Baker JE. (2000) Increased mitochondrial K(ATP) channel activity during chronic myocardial hypoxia: is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? *Circ Res* **87**: 915-921.

Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **277**: 38079-38086.

Fellet AL, Balaszczuk AM, Arranz C, Lopez-Costa JJ, Boveris A, Bustamante J. (2006) Autonomic regulation of pacemaker activity: role of heart nitric oxide synthases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H1246-1254.

Fenton RA, Dickson EW, Meyer TE, Dobson JG, Jr. (2000) Aging reduces the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **32**: 1371-1375.

Fitzpatrick CM, Shi Y, Hutchins WC, Su J, Gross GJ, Ostadal B, Tweddell JS, Baker JE. (2005) Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H62-68.

Forkel J, Chen X, Wandinger S, Keser F, Duschin A, Schwanke U, Frede S, Massoudy P, Schulz R, Jakob H, Heusch G. (2004) Responses of chronically hypoxic rat hearts to ischemia: KATP channel blockade does not abolish

increased RV tolerance to ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**: H545-551.

Franco MC, Arciuch VG, Peralta JG, Galli S, Levisman D, Lopez LM, Romorini L, Poderoso JJ, Carreras MC. (2006) Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **281**: 4779-4786.

Frank O. (1885) Zur Dynamik des Herz-muskels. *Z. Biologie* **32**: 370-447.

French S, Giulivi C, Balaban RS. (2001) Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**: H2863-2867.

Frisancho AR. (1975) Functional adaptation to high altitude hypoxia. *Science* **187**: 313-319.

Galli S, Labato MI, Bal de Kier Joffe E, Carreras MC, Poderoso JJ. (2003) Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Res* **63**: 6370-6377.

Gardner PR, Costantino G, Szabo C, Salzman AL. (1997) Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J Biol Chem* **272**: 25071-25076.

Gende OA, Mattiazzi A, Camilion MC, Pedroni P, Taquini C, Gomez Llambi H, Cingolani HE. (1985) Renal hypertension impairs inotropic isoproterenol effect without beta-receptor changes. *Am J Physiol* **249**: H814-819.

Gess B, Schricker K, Pfeifer M, Kurtz A. (1997) Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats. *Am J Physiol* **273**: R905-910.

Ghafourifar P, Richter C. (1997) Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* **418**: 291-296.

Ghafourifar P, Cadenas E. (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* **26**: 190-195.

Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* **273**: 11038-11043.

Gladwin MT. (2005) Hemoglobin as a nitrite reductase regulating red cell-dependent hypoxic vasodilation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**: 363-366.

Gladwin MT. (2006) Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation. *Adv Exp Med Biol* **588**: 189-205.

Gomez Llambi H, Manni F, La Padula P, Carretero OA, Taquini CM. (1996)

Myocardial contractility is modulated by angiotensin II via nitric oxide. *Hypertension* **27**: 704-708.

Gonzales GF, Chung FA, Miranda S, Valdez LB, Zaobornyj T, Bustamante J, Boveris A. (2005) Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4,340 m). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H2568-2573.

Granger DL, Lehninger AL. (1982) Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol* **95**: 527-535.

Guo Y, Ward ME, Beasjourns S, Mori M, Hussain SN. (1997) Regulation of cerebellar nitric oxide production in response to prolonged in vivo hypoxia. *J Neurosci Res* **49**: 89-97.

Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S. (2003) Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* **302**: 1975-1978.

Hansford RG. (1985) Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **102**: 1-72.

Hare JM. (2003) Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* **35**: 719-729.

Headrick JP. (1998) Aging impairs functional, metabolic and ionic recovery from ischemia-reperfusion and hypoxia-reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 1415-1430.

Heath D, Williams DR. (1979) The lung at high altitude. *Invest Cell Pathol* **2**: 147-156.

Hobai IA, O'Rourke B. (2000) Enhanced Ca²⁺-activated Na⁺-Ca²⁺ exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res* **87**: 690-698.

Hobai IA, O'Rourke B. (2001) Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation* **103**: 1577-1584.

Hochachka PW. (1992) Muscle enzymatic composition and metabolic regulation in high altitude adapted natives. *Int J Sports Med* **13 Suppl 1**: S89-91.

Hoit BD, Dalton ND, Erzurum SC, Laskowski D, Strohl KP, Beall CM. (2005) Nitric oxide and cardiopulmonary hemodynamics in Tibetan highlanders. *J Appl Physiol* **99**: 1796-1801.

Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, Nakagawa J, Yajima M, Liu W,

- Ishikawa N, Kawai N, Masumizu T, Kohno M.** (1999) Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea pig myocardial mitochondria. *Eur J Pharmacol* **380**: 37-48.
- Hrbasova M, Novotny J, Hejnova L, Kolar F, Neckar J, Svoboda P.** (2003) Altered myocardial Gs protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J Appl Physiol* **94**: 2423-2432.
- Hurtado A.** (1960) Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med* **53**: 247-258.
- Hurtado A.** (1964) Animals in high altitude: resident man. *Handbook of Physiology, Physiological Society. Washington D.C.:* 843-860.
- Ignarro LJ.** (2000) Nitric oxide: Biology and Pathobiology. *Academic Press, New York:*
- Jelkmann W.** (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* **72**: 449-489.
- Jones DP.** (1984) Effect of mitochondrial clustering on O₂ supply in hepatocytes. *Am J Physiol* **247**: C83-89.
- Jones DP.** (1986) Intracellular diffusion gradients of O₂ and ATP. *Am J Physiol* **250**: C663-675.
- Jones SP, Bolli R.** (2006) The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **40**: 16-23.
- Jurado S, Sanchez-Prieto J, Torres M.** (2005) Expression of cGMP-dependent protein kinases (I and II) and neuronal nitric oxide synthase in the developing rat cerebellum. *Brain Res Bull* **65**: 111-115.
- Kanai AJ, Mesaros S, Finkel MS, Oddis CV, Birder LA, Malinski T.** (1997) Beta-adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am J Physiol* **273**: C1371-1377.
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J.** (2001) Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14126-14131.
- Kanai AJ, Epperly M, Pearce I, Birder I, Zeidel M, Meters S, Greenberger J, Groat W, Apodaca G, Peterson J.** (2004) Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**: H13-H21.

- Kato K, Giulivi C.** (2006) Critical overview of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Front Biosci* **11**: 2725-2738.
- Katz LA, Koretsky AP, Balaban RS.** (1987) Respiratory control in the glucose perfused heart. A ³¹P NMR and NADH fluorescence study. *FEBS Lett* **221**: 270-276.
- Katz LA, Koretsky AP, Balaban RS.** (1988) Activation of dehydrogenase activity and cardiac respiration: a ³¹P-NMR study. *Am J Physiol* **255**: H185-188.
- Katz LA, Swain JA, Portman MA, Balaban RS.** (1989) Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo. *Am J Physiol* **256**: H265-274.
- Kaye DM, Wiviott SD, Balligand JL, Simmons WW, Smith TW, Kelly RA.** (1996) Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* **78**: 217-224.
- Kellogg RH.** (1978) La pression barométrique: Paul Bert's hypoxia theory and its critics. *Resp Physiol*. **34**: 1-28.
- Kelly RA, Balligand JL, Smith TW.** (1996) Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* **79**: 363-380.
- Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W.** (1992) Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics* **14**: 802-804.
- Kloner RA.** (1998) Ischemic preconditioning: the issues of refractoriness and tolerance. *J Am Coll Cardiol* **31**: 1150-1151.
- Knowles RG, Moncada S.** (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298**: 249-258.
- Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schluter KD, Piper HM, Noack E.** (1996) Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res* **78**: 91-101.
- Kolar F, Ostadal B.** (2004) Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* **53**: S3-13.
- Kong X, Tweddell JS, Gross GJ, Baker JE.** (2001) Sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP} channels mediate cardioprotection in chronically hypoxic hearts. *J Mol Cell Cardiol* **33**: 1041-1045.

- Kopecky M, Daum S.** (1958) [Adaptation of the myocardium to altitude anoxia.]. *Cesk Fysiol* **7**: 218-219.
- Kumar GK, Klein JB.** (2004) Analysis of expression and posttranslational modification of proteins during hypoxia. *J Appl Physiol* **96**: 1178-1186.
- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M.** (1993) Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* **72**: 1293-1299.
- Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M.** (1995) The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res* **23**: 4542-4550.
- Lacza Z, Puskar M, Figueroa JP, Zhang J, Rajapakse N, Busija DW.** (2001) Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* **31**: 1609-1615.
- Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, Horvath EM, Figueroa JP, Szabo C, Busija DW.** (2003) Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med* **35**: 1217-1228.
- Lacza Z, Pankotai E, Csordas A, Gero D, Kiss L, Horvath EM, Kollai M, Busija DW, Szabo C.** (2006) Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist? *Nitric Oxide* **14**: 162-168.
- Lehninger AL.** (2004) Principles of biochemistry, 4^a edición.
- Lenaz G, Genova ML.** (2009) Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 1750-1772.
- Lenaz G, Genova ML.** (2010) Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal* **12**: 916-1008.
- Lenfant C, Sullivan K.** (1971) Adaptation to high altitude. *N Engl J Med* **284**: 1298-1309.
- Lores-Arnaiz S, Bustamante J, Czernizyniec A, Galeano P, Gonzalez Gervasoni M, Rodil Martinez A, Paglia N, Cores V, Lores-Arnaiz MR.** (2007) Exposure to enriched environments increases brain nitric oxide synthase and improves cognitive performance in prepubertal but not in young rats. *Behav Brain Res* **184**: 117-123.
- Lores-Arnaiz S, Coronel MF, Boveris A.** (1999) Nitric oxide, superoxide, and

hydrogen peroxide production in brain mitochondria after haloperidol treatment. *Nitric Oxide* **3**: 235-243.

Lynch FM, Austin C, Heagerty AM, Izzard AS. (2006) Adenosine and hypoxic dilation of rat coronary small arteries: roles of the ATP-sensitive potassium channel, endothelium, and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**: H1145-1150.

Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B. (2006) Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res* **99**: 172-182.

Maack C, O'Rourke B. (2007) Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol* **102**: 369-392.

Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. (2006) Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**: 343-365.

Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. (1993) Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* **88**: 1264-1272.

Marconi C, Marzorati M, Cerretelli P. (2006) Work capacity of permanent residents of high altitude. *High Alt Med Biol* **7**: 105-115.

Martin L, Wertenberger G, Hippensteele J, Bullard R. (1972) Thyroidal influence on myocardial changes induced by simulated high altitude. *Am J Physiol* **222**: 1599-1603.

Martinez-Ruiz A, Lamas S. (2007) Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovasc Res* **75**: 220-228.

Mason MG, Nicholls P, Wilson MT, Cooper CE. (2006) Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 708-713.

Massion PB, Balligand JL. (2003) Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol* **546**: 63-75.

Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. (2003) Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* **93**: 388-398.

- Mattiazzi AR.** (2000) Músculo esquelético, cardíaco y liso. En: *Fisiología Humana de Houssay*, Cingolani HE y Houssay AB, El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.
- McCormack JG, Denton RM.** (1979) The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J* **180**: 533-544.
- McCormack JG, Denton RM.** (1984) Role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of Ca²⁺. *Biochem J* **218**: 235-247.
- McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM.** (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* **70**: 391-425.
- McGrath JJ, Prochazka J, Pelouch V, Ostadal B.** (1973) Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *J Appl Physiol* **34**: 289-293.
- Meerson FZ, Gomzakov OA, Shimkovich MV.** (1973) Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol* **31**: 30-34.
- Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L.** (1995) A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* **182**: 1683-1693.
- Mohan P, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU.** (1996) Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation* **93**: 1223-1229.
- Murphy ME, Noack E.** (1994) Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods Enzymol* **233**: 240-250.
- Murray J, Taylor SW, Zhang B, Ghosh SS, Capaldi RA.** (2003) Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem* **278**: 37223-37230.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA.** (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**: 1124-1136.
- Nathan C.** (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* **6**: 3051-3064.

- Navarro A, Boveris A.** (2004) Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**: R1244-1249.
- Neckar J, Szarszoi O, Koten L, Papousek F, Ostadal B, Grover GJ, Kolar F.** (2002) Effects of mitochondrial K_{ATP} modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* **55**: 567-575.
- Neckar J, Ostadal B, Kolar F.** (2004) Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res* **53**: 621-628.
- Neubauer JA.** (2001) Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* **90**: 1593-1599.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO.** (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**: 896-899.
- Nouette-Gaulain K, Malgat M, Rocher C, Savineau JP, Marthan R, Mazat JP, Sztark F.** (2005) Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res* **66**: 132-140.
- Ostadal B, Prochakza J, Pelouch V, Urbanova D, Widimsky J, Stanek V.** (1985) Pharmacological treatment and spontaneous reversibility of cardiopulmonary changes induced by intermittent high altitude hypoxia. *Prog Resp Res* **20**: 17-25.
- Ostadal B, Ostadalova I, Dhalla NS.** (1999) Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* **79**: 635-659.
- Oxenham H, Sharpe N.** (2003) Cardiovascular aging and heart failure. *Eur J Heart Fail* **5**: 427-434.
- Paolucci N, Ekelund UE, Isoda T, Ozaki M, Vandegaer K, Georgakopoulos D, Harrison RW, Kass DA, Hare JM.** (2000) cGMP-independent inotropic effects of nitric oxide and peroxynitrite donors: potential role for nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**: H1982-1988.
- Parihar MS, Parihar A, Villamena FA, Vaccaro PS, Ghafourifar P.** (2008) Inactivation of mitochondrial respiratory chain complex I leads mitochondrial

nitric oxide synthase to become pro-oxidative. *Biochem Biophys Res Commun* **367**: 761-767.

Patterson SW, Piper H, Starling EH. (1914) The regulation of the heart beat. *J Physiol* **48**: 465-513.

Pearce LL, Epperly MW, Greenberger JS, Pitt BR, Peterson J. (2001) Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide* **5**: 128-136.

Peluffo G, Radi R. (2007) Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* **75**: 291-302.

Penaloza D, Arias-Stella J. (2007) The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation* **115**: 1132-1146.

Peralta JG, Finocchietto PV, Converso D, Schopfer F, Carreras MC, Poderoso JJ. (2003) Modulation of mitochondrial nitric oxide synthase and energy expenditure in rats during cold acclimation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**: H2375-2383.

Persichini T, Mazzone V, Polticelli F, Moreno S, Venturini G, Clementi E, Colasanti M. (2005) Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome c oxidase. *Neurosci Lett* **384**: 254-259.

Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T. (1997) Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res* **81**: 372-379.

Pittman RN. (2010) Erythrocytes: Surveyors as well as purveyors of oxygen? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**: H1637-8.

Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* **328**: 85-92.

Poderoso JJ, Peralta JG, Lisdero CL, Carreras MC, Radisic M, Schopfer F, Cadenas E, Boveris A. (1998) Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am J Physiol* **274**: C112-119.

Poderoso JJ, Lisdero C, Schopfer F, Riobo N, Carreras MC, Cadenas E, Boveris A. (1999) The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox

reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem* **274**: 37709-37716.

Poupa O, Krofta K, Prochazka J, Turek Z. (1966) Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc* **25**: 1243-1246.

Prabhakar NR, Rao S, Premkumar D, Pieramici SF, Kumar GK, Kalaria RK. (1996) Regulation of neuronal nitric oxide synthase gene expression by hypoxia. Role of nitric oxide in respiratory adaptation to low pO₂. *Adv Exp Med Biol* **410**: 345-348.

Preckel B, Kojda G, Schlack W, Ebel D, Kottenberg K, Noack E, Thamer V. (1997) Inotropic effects of glyceryl trinitrate and spontaneous NO donors in the dog heart. *Circulation* **96**: 2675-2682.

Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* **33**: 1451-1464.

Raguso CA, Guinot SL, Janssens JP, Kayser B, Pichard C. (2004) Chronic hypoxia: common traits between chronic obstructive pulmonary disease and altitude. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**: 411-417.

Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* **306**: 174-176.

Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, Losano G. (2007) Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci* **81**: 779-793.

Reynafarje B. (1985) Biochemical adaptation to chronic hypoxia of high altitude. *Mol Physiol* **8**: 463-471.

Riobo NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ. (2001) Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* **359**: 139-145.

Riobo NA, Melani M, Sanjuan N, Fiszman ML, Gravielle MC, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ. (2002) The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. *J Biol Chem* **277**: 42447-42455.

Robinson LJ, Weremowicz S, Morton CC, Michel T. (1994) Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Genomics* **19**: 350-357.

Rumsey WL, Abbott B, Bertelsen D, Mallamaci M, Hagan K, Nelson D, Erecinska M. (1999) Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *Am J Physiol* **276**: H71-80.

- Saavedra WF, Paolocci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie JS, Harrison RW, Zeichner J, Mudrick D, Marban E, Kass DA, Hare JM.** (2002) Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ Res* **90**: 297-304.
- Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T.** (2006) Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* **571**: 253-273.
- Saks VA, Kuznetsov AV, Vendelin M, Guerrero K, Kay L, Seppet EK.** (2004) Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism. *Mol Cell Biochem* **256-257**: 185-199.
- Sarkar S, Banerjee PK, Selvamurthy W.** (2003) High altitude hypoxia: an intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Mol Cell Biochem* **253**: 287-305.
- Sarti P, Giuffre A, Forte E, Mastronicola D, Barone MC, Brunori M.** (2000) Nitric oxide and cytochrome c oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 183-187.
- Selkurt EE.** (1975) Fisiología. 2da. Ed. El Ateneo. Buenos Aires p 642.
- Schlossmann J, Hofmann F.** (2005) cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov Today* **10**: 627-634.
- Schuh K, Uldrijan S, Telkamp M, Rothlein N, Neyses L.** (2001) The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J Cell Biol* **155**: 201-205.
- Schulman D, Latchman DS, Yellon DM.** (2001) Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H1630-1636.
- Sears CE, Ashley EA, Casadei B.** (2004) Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 1021-1044.
- Selkurt EE.** (1975) Fisiología, 2da. Ed. El Ateneo editorial, Buenos Aires.
- Semenza GL, Wang GL.** (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**: 5447-5454.
- Semenza GL.** (2004) O₂-regulated gene expression: transcriptional control of

cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol* **96**: 1173-1177; discussion 1170-1172.

Shah AM, MacCarthy PA. (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther* **86**: 49-86.

Shi Y, Pritchard KA, Jr., Holman P, Rafiee P, Griffith OW, Kalyanaraman B, Baker JE. (2000) Chronic myocardial hypoxia increases nitric oxide synthase and decreases caveolin-3. *Free Radic Biol Med* **29**: 695-703.

Shi Y, Baker JE, Zhang C, Tweddell JS, Su J, Pritchard KA, Jr. (2002) Chronic hypoxia increases endothelial nitric oxide synthase generation of nitric oxide by increasing heat shock protein 90 association and serine phosphorylation. *Circ Res* **91**: 300-306.

Simler N, Malgoyre A, Koulmann N, Alonso A, Peinnequin A, Bigard AX. (2007) Hypoxic stimulus alters hypothalamic AMP-activated protein kinase phosphorylation concomitant to hypophagia. *J Appl Physiol* **102**: 2135-2141.

Singh S, Evans TW. (1997) Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* **10**: 699-707.

Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y. (1998) Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7368-7373.

Stieglerova A, Drahota Z, Houstek J, Milerova M, Pelouch V, Ostadal B. (1999) Activity of cytochrome c oxidase in the right and left ventricular myocardium of male and female rats exposed to intermittent high altitude hypoxia. *Ann N Y Acad Sci* **874**: 269-277.

Stuehr D, Pou S, Rosen GM. (2001) Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* **276**: 14533-14536.

Szent-Gyorgyi AG. (1953) Meromyosins, the subunits of myosin. *Arch Biochem Biophys* **42**: 305-320.

Taquini AC. (1954) El Corazón Pulmonar. Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.

Tay YM, Lim KS, Sheu FS, Jenner A, Whiteman M, Wong KP, Halliwell B. (2004) Do mitochondria make nitric oxide? *Free Radic Res* **38**: 591-599.

Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS. (2000) Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C423-435.

- Territo PR, French SA, Balaban RS.** (2001a) Simulation of cardiac work transitions, in vitro: effects of simultaneous Ca²⁺ and ATPase additions on isolated porcine heart mitochondria. *Cell Calcium* **30**: 19-27.
- Territo PR, French SA, Dunleavy MC, Evans FJ, Balaban RS.** (2001b) Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mV_{O₂}, NADH, and light scattering. *J Biol Chem* **276**: 2586-2599.
- Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR, Jr.** (2001) The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 355-360.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera-Del Valle N, Huang P.** (2008) Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid Redox Signal* **10**: 1343-74.
- Turek Z, Kubat K, Ringnalda BE, Kreuzer F.** (1980) Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude. *Basic Res Cardiol* **75**: 544-554.
- Valdez LB, Alvarez S, Arnaiz SL, Schopfer F, Carreras MC, Poderoso JJ, Boveris A.** (2000a) Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix. *Free Radic Biol Med* **29**: 349-356.
- Valdez LB, Lores Arnaiz S, Bustamante J, Alvarez S, Costa LE, Boveris A.** (2000b) Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res* **33**: 65-70.
- Vandecasteele G, Eschenhagen T, Scholz H, Stein B, Verde I, Fischmeister R.** (1999) Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* **5**: 331-334.
- Wang Y, Newton DC, Marsden PA.** (1999a) Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol* **13**: 21-43.
- Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA.** (1999b) RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12150-12155.
- Wang YG, Dedkova EN, Steinberg SF, Blatter LA, Lipsius SL.** (2002) Beta 2-adrenergic receptor signaling acts via NO release to mediate ACh-induced activation of ATP-sensitive K⁺ current in cat atrial myocytes. *J Gen Physiol* **119**: 69-82.
- Wang YG, Dedkova EN, Ji X, Blatter LA, Lipsius SL.** (2005) Phenylephrine

acts via IP₃-dependent intracellular NO release to stimulate L-type Ca²⁺ current in cat atrial myocytes. *J Physiol* **567**: 143-157.

Weibel ER, Hoppeler H. (1991) Respiratory system adaptation to hypoxia: lung to mitochondria. In: Response and adaptation to hypoxia. *Edited by S. Lahiri, N.S. Cherniack, and R.S. Fitzgerald. New York:Oxford University Press*: 3-13.

Welter R, Yu L, Yu CA. (1996) The effects of nitric oxide on electron transport complexes. *Arch Biochem Biophys* **331**: 9-14.

West JB. (2007) Point: the lactate paradox does/does not occur during exercise at high altitude. *J Appl Physiol* **102**: 2398-2399.

Williamson JR, Ford C, Illingworth J, Safer B. (1976) Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux. *Circ Res* **38**: 139-51.

Winterbourn CC. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* **4**: 278-86.

Wu T, Kayser B. (2006) High altitude adaptation in Tibetans. *High Alt Med Biol* **7**: 193-208.

Xi L, Tekin D, Gursoy E, Salloum F, Levasseur JE, Kukreja RC. (2002) Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H5-12.

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 657-662.

Xu KY, Kuppusamy SP, Wang JQ, Li H, Cui H, Dawson TM, Huang PL, Burnett AL, Kuppusamy P, Becker LC. (2003) Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia-induced inactivation. *J Biol Chem* **278**: 41798-41803.

Yoshikane H, Nihei T, Moriyama K. (1986) Three-dimensional observation of intracellular membranous structures in dog heart muscle cells by scanning electron microscopy. *J Submicrosc Cytol* **18**: 629-636.

Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C. (1991) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem* **266**: 12544-12547.

Zagorska A, Dulak J. (2004) HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* **51**: 563-585.

Zanella B, Giordano E, Muscari C, Zini M, Guarnieri C. (2004) Nitric oxide

synthase activity in rat cardiac mitochondria. *Basic Res Cardiol* **99**: 159-164.

Zaobornyj T, Valdez LB, Iglesias DE, Gasco M, Gonzales GF, Boveris AA.

(2009) Mitochondrial nitric oxide metabolism during rat heart adaptation to high altitude: effect of sildenafil, L-NAME and L-Arginine treatments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**: H1741-7.

Zhou Z, Matlib MA, Bers DM. (1998) Cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ signals in patch clamped mammalian ventricular myocytes. *J Physiol* **507**: 379-403.

Ziolo MT, Katoh H, Bers DM. (2001) Positive and negative effects of nitric oxide on Ca(2+) sparks: influence of beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H2295-2303.