



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**PAPEL DEL DONADOR DE NO
MONONITRATO DE
ISOSORBIDA EN LOS
PROCESOS DE HIPOXIA
CEREBRAL**

Alumna: Pérez Camacho, Almudena

Tutores: Prof. Dña. Raquel Hernández Cobo
D. Santos Blanco Ruiz

Dpto: Biología Experimental

Jaén y Septiembre, 2015

PAPEL DEL DONADOR DE NO MONONITRATO DE ISOSORBIDA EN LOS PROCESOS DE HIPOXIA CEREBRAL.

Almudena Pérez Camacho

Universidad de Jaén, Departamento de Biología Experimental

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Animales	13
3.1.1. Bioética	
3.1.2. Distribución de los animales en grupos experimentales	13
3.2. Administración de mononitrato de isosorbida y modelo de hipoxia	13
3.2.1. Hipoxia hipobárica	14
3.3. Técnicas bioquímicas	15
3.3.1. Extracción y procesamiento de las muestras destinadas a técnicas bioquímicas	15
3.3.2. Determinación de la concentración de proteínas	16
3.3.3. Análisis de expresión de proteínas mediante Western Blot	16
3.3.4. Determinación de metabolitos de óxido nítrico (NOA)	20
3.3.5. Medición de sustancias activas del ácido tiobarbitúrico (TBARS)	20
3.3.6. Determinación del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α)	21
3.3.7. Determinación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras de las células B activadas (NF- κ B)	21
3.4. Análisis estadístico	22

4. RESULTADOS	23
4.1. Técnicas bioquímicas	23
4.1.1. <i>Western Blot</i>	23
4.1.2. <i>NOA</i>	27
4.1.3. <i>TBARS</i>	28
4.1.4. <i>HIF-1α</i>	29
4.1.5. <i>NF-κB</i>	29
5. DISCUSIÓN	31
6. CONCLUSIONES	36
7. BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXO I: RESUMEN DE LOS CURSOS DEL MÁSTER	48
ANEXO II: CURRÍCULUM VITAE	53

RESUMEN

Los episodios de hipoxia cerebral conllevan una serie de eventos patológicos que implican la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, además de la puesta en marcha de una respuesta adaptativa mediante la actuación de HIF-1 α , en la que las isoformas NOS parecen ejercer un papel crucial. De hecho, diferentes estudios han demostrado que la administración controlada de donadores de óxido nítrico (NO) puede disminuir la intensidad de las lesiones en los procesos de hipoxia.

Considerando estos aspectos, los objetivos planteados en estudio han sido: 1) analizar la respuesta del sistema NO/NOS en el cerebro de ratas sometidas a un modelo de hipoxia hipobárica aguda, seguido de dos períodos de reoxigenación (0 y 2 horas), y 2) estudiar el efecto producido por el donador de NO ISMN en dicho modelo.

Los resultados obtenidos nos permiten cuestionar el papel clásico atribuido a las NOS ante fenómenos de hipoxia. Además, sugieren una alteración de la expresión de las isoformas nNOS y la iNOS, pero no de la eNOS por parte del donador ISMN.

Por lo tanto, no se le podría atribuir un papel neuroprotector al donador ISMN en el modelo experimental propuesto.

ABSTRACT

Cerebral hypoxia triggers a number of pathological events that involve the production of reactive oxygen and nitrogen species. In addition, these episodes involve an adaptive response to hypoxia carried out by HIF-1 α , in which NOS isoforms appear to play a key role. Indeed, some studies have demonstrated that controlled delivery of nitric oxide (NO) donors can lessen the severity of hypoxia-derived injuries.

Considering these facts, the aims of our study are: 1) to analyse the response of NO/NOS system in the brain of rats subjected to a model of acute hypobaric hypoxia followed by two periods of reoxygenation (0 to 2 hours), and 2) to study the effect of the NO donor ISMN in this model.

Our results allow us to question the classic role attributed to NOS within hypoxia phenomena. Thus, they suggest that ISMN may alter the expression of iNOS and nNOS isoforms, but not eNOS.

Therefore, we can not assume that ISMN would play a neuroprotective role in our experimental model.

1. INTRODUCCIÓN

Los fenómenos de hipoxia e isquemia cerebral son una de las principales causas de mortandad en Europa con más de un millón de fallecimientos al año. Estos episodios son la principal causa de discapacidad adquirida en adultos lo que supone un gran impacto no solo a nivel sanitario, sino a nivel socioeconómico.

La hipoxia se define como la disminución de la presión parcial de oxígeno en tejidos, órganos o sistemas. El déficit de oxígeno es clave en el desarrollo de diferentes patologías como los accidentes vasculares. Existen diferentes tipos de hipoxia, entre los que se encuentra la hipoxia hipobárica (HH), ocasionada por la reducción de la presión atmosférica (López-Ramos et al., 2005; Castro-Blanco et al., 2013; Hernández et al., 2013; Peinado et al., 2014).

Tanto la hipoxia como la posterior recuperación de los niveles normales de oxígeno en sangre y tejidos (reoxigenación) desencadenan alteraciones transitorias o irreversibles tanto a nivel fisiológico como molecular (LaManna et al., 2004; Rodrigo et al., 2005; Hodgkinson 2011). Concretamente, el cerebro, debido a su alto nivel de metabolismo energético, es particularmente vulnerable a la hipoxia, ya que estos procesos conllevan la generación de altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), modificando el estado oxidativo de las células de forma sustancial (Cañuelo et al. 2007; Blanco et al., 2010; Peinado et al., 2014). Por otro lado, este incremento de ERO y ERN desencadena una respuesta adaptativa que consiste en la expresión específica de genes que participan en dicha respuesta (Michiels et al., 2001). Así, durante la hipoxia también se induce la expresión de factores de transcripción, entre los cuales es necesario destacar el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1), que se encarga de regular la respuesta a la hipoxia a nivel celular, y por lo tanto, es esencial en el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno (Wang et al., 1995). Este factor de transcripción se une a unas secuencias consenso del ADN denominadas elemento de respuesta a hipoxia (ERH), que se encuentran en las regiones promotoras de los genes que participan en la respuesta adaptativa a la hipoxia (Semenza et al., 1991; Wang y Semenza, 1993; Goldberg et al., 1998).

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico formado por dos subunidades: una subunidad α (HIF-1 α) y una subunidad β (HIF-1 β) también conocida como ARNT (translocador del receptor hidrocarburos de arilo). HIF-1 β se expresa de forma constitutiva en el núcleo, por lo tanto, la actividad del complejo HIF-1 es principalmente mediada por la estabilidad de la subunidad HIF-1 α , no constitutiva e inducible por la hipoxia (Wang et al., 1995; Greer et al., 2012). Además de otros dominios, HIF-1 α posee un único dominio de

degradación dependiente de oxígeno (ODD), el cual está implicado ampliamente en el mecanismo de regulación de la estabilidad de HIF-1 α dependiente de oxígeno (Masson et al., 2001). En condiciones de normoxia (Figura 1), es decir, cuando la presión parcial de oxígeno se encuentra en valores normales (21%), se hidroxilan dos residuos de prolina presentes en el dominio ODD por parte de las enzimas prolil hidroxilasas (PHDs) (Epstein et al., 2001; Bruick y McKnight., 2001). Esta hidroxilación hace que HIF-1 α sea reconocido por la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (pVHL) que forma parte del complejo proteico E3 ubiquitina proteína ligasa (Aso et al., 2000; Kamura et al., 2000). Esto se debe a que pVHL presenta un dominio β que interactúa directamente con el dominio ODD de HIF-1 α dando lugar a la ubiquitinación de dicha subunidad y a su posterior degradación en el proteasoma (Bonicalzi et al., 2001). Se ha demostrado que la actividad de las enzimas PHD está regulada por las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Chandel et al., 1998; Agani et al., 2000; Greer et al., 2012). En condiciones de hipoxia, cuando los niveles de oxígeno se encuentran disminuidos, la presencia de ERN como el NO, disminuye la interacción entre HIF-1 α y pVHL. Esto se debe que no se lleva a cabo la hidroxilación del dominio ODD y por lo tanto queda impedida su unión a pVHL. Como consecuencia, HIF-1 α no se ubiquitina y no se degrada, aumentando así su vida media (Metzen et al., 2003; Berchner-Pfannschmidt et al., 2010). Por lo tanto, en estas condiciones de hipoxia (Figura 1), se produce el ensamblaje de la subunidad α con la subunidad β , dando lugar al factor de transcripción HIF-1, el cual se une a los HRE y actúa promoviendo la transcripción de diferentes genes diana implicados en la respuesta hipóxica como la eritropoyetina (EPO; involucrada en la eritropoyesis), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; asociado a la angiogénesis) y la óxido nítrico sintasa (NOS, responsable de la formación de NO) (Semenza, 2003; Görlach, 2009).

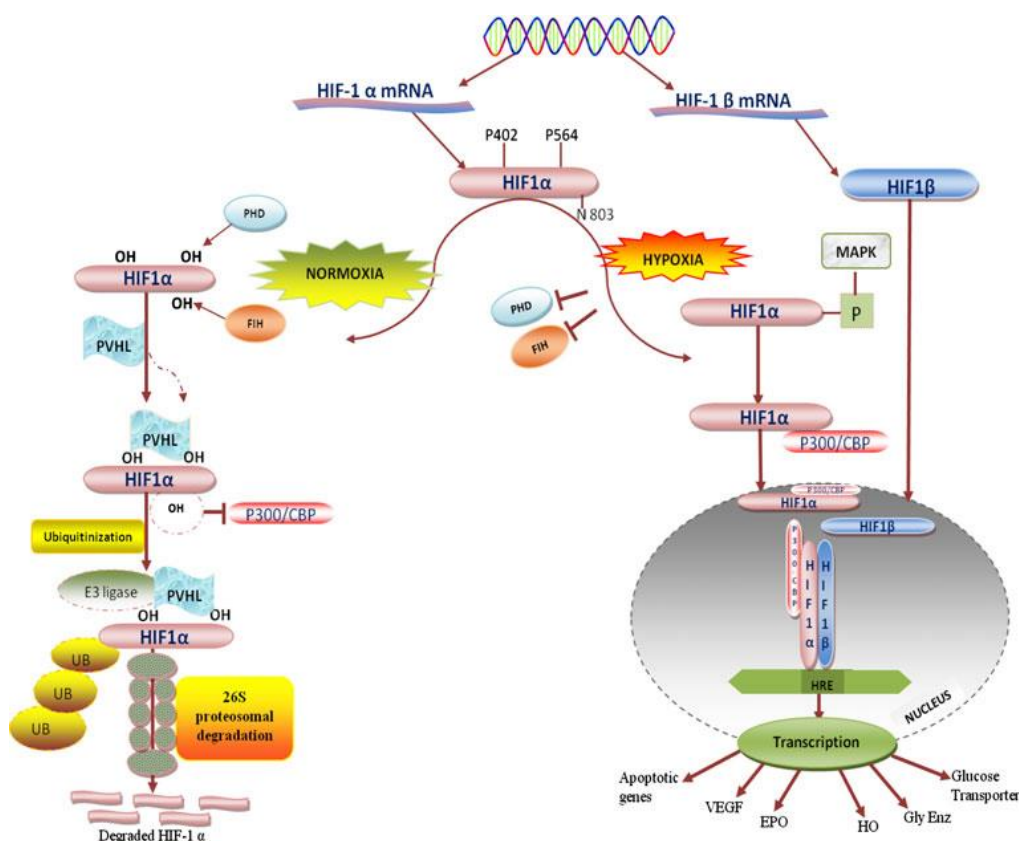


Figura 1. Representación de la regulación de HIF-1 bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Bajo condiciones normóxicas la subunidad HIF-1α es hidroxilada por PHD y el factor inhibidor de HIF (FIH), siendo así susceptible de la unión a pVHL permitiendo su reclutamiento por parte de E3 ligasa. Esta subunidad es ubiquitinada para ser degradada por parte del proteasoma. Bajo condiciones de hipoxia las PHDs y FIH están inhibidos, y HIF-1α se estabiliza. De esta forma se desplaza hacia el núcleo celular y se une a HIF-1β formando el heterodímero que se une a los HRE transcribiendo un gran número de genes (Singh et al., 2012).

El óxido nítrico (NO) es una molécula que participa activamente en la regulación de HIF-1. Esto es debido a que es capaz de bloquear a este factor de transcripción mediante la nitrosilación del residuo de cisteína (Cys800) presente en su estructura (Yasinska y Sumbayev, 2003); y por otro lado también tiene la capacidad de regular la actividad transcripcional a través del control de la actividad de las enzimas PHDs y el factor inhibidor de HIF (FIH) (Berchner-Pfannschmidt et al., 2010), como se ha apuntado anteriormente. Estos efectos que provoca el NO sobre la actividad de HIF-1 reflejan la importancia del papel de esta molécula en los procesos hipóxicos.

El NO es un neurotransmisor gaseoso que se encuentra ampliamente distribuido en el organismo comportándose como un radical libre debido a la presencia de un electrón desapareado. Esta molécula juega un papel crucial en la respuesta a la hipoxia hipobárica del sistema nervioso central (SNC), de manera que dependiendo de la concentración en la que se encuentre esta molécula, y particularmente de su capacidad para nitrar proteínas, se

puede desencadenar una acción neuroprotectora o una acción neurotóxica (Serrano et al., 2003; Encinas et al., 2004; Rodrigo et al., 2005; Cañuelo et al., 2007). Uno de los mecanismos de actuación del NO es a través de la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble, la cual genera GMP cíclico (GMPc) como segundo mensajero que es capaz de activar una serie de quinasas, las cuales al fosforilarse pueden modular la expresión génica de diferentes rutas de señalización intracelular (Francis et al., 2010). En determinadas circunstancias, el NO puede ser sintetizado en cantidades elevadas y de forma no controlada, dando lugar al efecto neurotóxico mencionado anteriormente. Esta sobreproducción tiene como consecuencia la inhibición de la fosforilación oxidativa, lo cual conlleva que la producción de ATP se encuentre disminuida (Almeida y Bolaños, 2001). De este modo, cuando el NO se produce en elevadas concentraciones o durante largos períodos de tiempo no solo actúa como un mensajero intra- e intercelular, sino que también lo hace ejerciendo efectos deletéreos (Barer et al., 2006). Por otro lado, el NO también puede actuar directamente sobre proteínas que están implicadas en diferentes vías de señalización debido a que reacciona con los grupos tioles de dichas proteínas alterando así su actividad (Peinado et al., 2003). Mediante esta vía, el NO es capaz de autorregular su propia producción influyendo directamente sobre la activación de las enzimas encargadas de su síntesis. El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) de entre 130-160 KDa. Estas enzimas pertenecen a diferentes subtipos dependiendo del tipo tisular en el que se expresan, aunque todas ellas comparten una homología en su secuencia del 50-60% (Alderton et al., 2001). Se encargan de convertir L-arginina en L-citrulina con la consiguiente producción del NO (Figura 2).

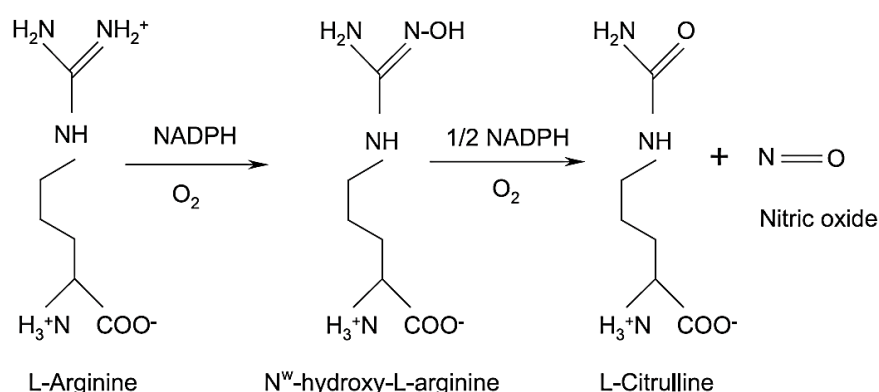


Figura 2. Reacción de la síntesis de NO desde L-arginina. El NO es sintetizado endógenamente por la conversión de L-arginina en L-citrulina. Durante esta reacción una molécula y media de NADPH son usadas como donador de electrones y se genera como intermediario NOH-arginina (Aktan, 2004).

Existen tres isoformas diferentes de NOS: eNOS o isoforma endotelial, iNOS o isoforma inducible, y nNOS o isoforma neuronal. La nNOS, descrita por primera vez en neuronas, es soluble y se expresa habitualmente de forma constitutiva en las células, de forma que su actividad se encuentra regulada por los niveles de calmodulina y calcio intracelulares (Bredt y Snyder, 1990; Alderton et al., 2001). La segunda isoforma considerada de forma habitual como constitutiva es la eNOS. Esta se expresa principalmente en las células endoteliales, encontrándose unida a la membrana por parte de sus extremos N-terminales miristolados (Liu et al., 1995; Aktan, 2004). Al igual que la nNOS, la calmodulina activada por el calcio es necesaria para regular su actividad. Esta isoforma sintetiza NO de forma intermitente cuando los niveles de calcio intracelular aumentan. Por último, la iNOS, no está presente en las células de forma constitutiva pero puede ser inducida en cualquier tejido por la presencia de lipopolisacáridos y citoquinas, productos bacterianos o infecciones (Aktan, 2004; Kleinert et al., 2004). Una vez inducida, su actividad es constante y no se encuentra regulada por las concentraciones de calcio intracelular (Alderton et al., 2001; Mayer y Hemmens, 1997). Además, dicha isoforma participa en la respuesta inmune y está asociada a patologías neurodegenerativas inflamatorias (Moncada y Higgs, 1991; Trojanowski y Lee, 2003). Los procesos hipóxicos activan una gran cantidad de factores de transcripción sensibles al oxígeno, como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Taylor y Cummins, 2009), el cual induce la síntesis de la iNOS (Palmer y Johns, 1998; Peyssonnaud et al., 2005) que sintetiza NO en grandes cantidades, siendo la principal responsable del efecto tóxico del NO (Siles et al., 2002; Pannu y Singh, 2006; Blanco et al., 2010).

Después de la inducción de la iNOS se detectan altos niveles de NO. Este NO (Figura 3) puede reaccionar fácilmente con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produciendo una molécula fuertemente oxidante; el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (Koppenol et al., 1992; Pryor et al., 1995; Beckman y Koppenol, 1996; Thompson et al., 2012). El peroxinitrito es una molécula altamente soluble en lípidos y tiene una amplia gama de dianas, lo cual desencadena la oxidación de -SH, la peroxidación de lípidos y la ruptura de cadenas de ADN y ARN (Beckman y Ames, 1997; Lipton, 1999; Pacher et al., 2007). El $ONOO^{\cdot-}$ puede romperse además en dióxido de nitrógeno (NO_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). El radical $\cdot OH$ es un potente oxidante, y como tal contribuye fuertemente al daño oxidativo en las células (Halliwell, 2001). Por su parte, el $ONOO^{\cdot-}$ puede actuar por sí mismo desencadenando la ruta apoptótica intrínseca (Paixao et al., 2011) o induciendo la nitración de proteínas.

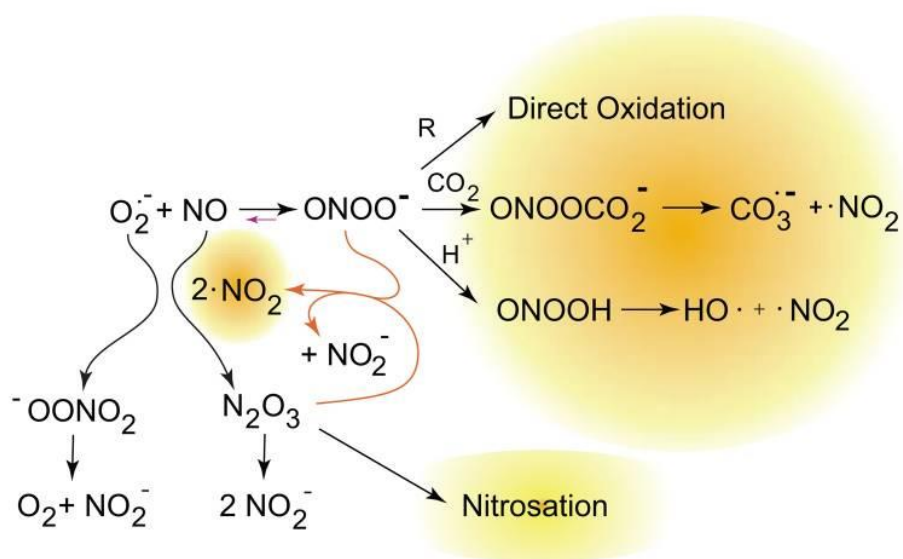


Figura 3. Interacción entre óxido nítrico, superóxido, peroxinitrito y dióxido de nitrógeno. Cuando el NO y el anión O_2^- están presentes en la célula se forma peroxinitrito. Estas dos moléculas también pueden reaccionar con el dióxido de nitrógeno para formar N_2O_3 y peroxinitrato. El peroxinitrato se descompone para dar lugar a nitrito y oxígeno, mientras que el N_2O_3 puede reaccionar con tioles formando nitrosotioles, o con el anión hidróxido para dar nitrito (Pacher et al., 2007).

La nitración de proteínas es una modificación post-traducciona que se lleva a cabo de forma más incrementada cuando la célula se encuentra bajo condiciones de estrés oxidativo (Lu et al., 2010). Este tipo de modificación transforma los residuos de tirosina proteicos en 3-nitro-L-tirosina (n-Tyr) (Castro et al., 2011). En este sentido, la nitración de los residuos de tirosina se considera como un marcador para la degradación de proteínas (Castegna et al., 2003). Este mecanismo no es un proceso inespecífico pero si selectivo, ya que afecta a proteínas concretas alterando su actividad (Gow et al., 2004; Peinado et al., 2014). En este sentido, la modificación de proteínas dependiente de peroxinitrito puede modular los eventos de señalización mediante la alteración del equilibrio fosforilación/desfosforilación (Klotz et al., 2002). Según esto, se puede decir que las situaciones de isquemia o hipoxia inducen la producción elevada de NO, que tiene como consecuencia la formación de $ONOO^-$ (López et al., 2005) lo cual conlleva, por extensión, la nitración de diversas proteínas.

El estrés oxidativo y nitrosativo del tejido también está implicado en el papel dual que tiene el NO en los procesos hipóxicos (Dweik, 2005). En relación a las tres isoformas de NOS, es importante destacar que la nNOS parece ser la primera de ellas implicada en los daños neuronales producidos tras un accidente cerebral. Esto es debido a la rápida formación de $ONOO^-$, la cual tiene lugar por los elevados niveles de NO y O_2^- (Lizasoain y Moro, 1998; Pacher et al., 2007). Estos daños neuronales se ven aumentados por la actuación de la iNOS, la cual sigue incrementando los niveles de NO celulares (Pacher et al., 2007, Terpolilli

et al., 2012). Por otro lado, la eNOS, tal y como se menciona anteriormente, ejerce un papel neuroprotector tras el daño cerebral producido debido a sus propiedades hemodinámicas. Esta isoforma estimula la vasodilatación y la angiogénesis, e inhibe procesos tales como la agregación plaquetaria y adhesión de leucocitos al endotelio (Iadecola, 1997). En el momento inicial del episodio hipóxico tiene lugar un incremento de NO producido por las células endoteliales gracias a la acción de la eNOS; así ejerce su efecto neuroprotector a través de la vasodilatación de urgencia que se produce para evitar y/o reducir el daño cerebral (Zhang et al., 1993; Terpolilli et al., 2012; Zhang et al., 2013). El NO producido por esta isoforma tiene también la capacidad de inhibir la apoptosis y estimular la neurogénesis, siendo partícipe de ese modo de los mecanismos de reparación dentro del SNC (Huang et al., 1994). Esta dualidad del NO, que depende de la actividad de las isoformas y del estado oxidativo de la célula, determina en gran medida el destino final de las células tras un episodio de hipoxia (Figura 4).

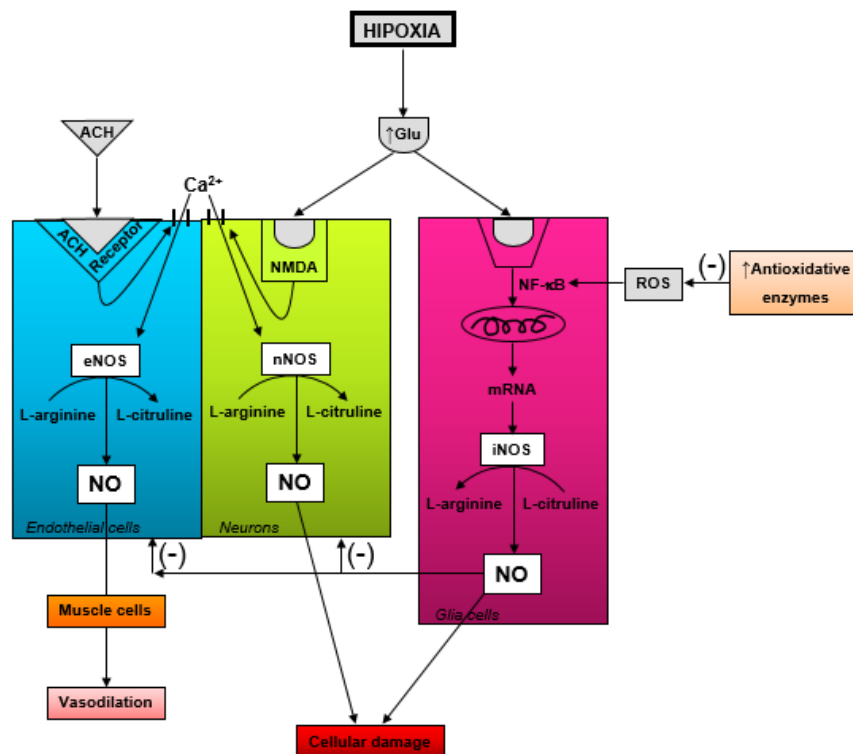


Figura 4. Papel del NO en el daño hipóxico. La hipoxia permite la estimulación de eNOS, la cual aumenta la generación de NO endotelial que está asociado a la acción vasodilatadora. En la hipoxia se desencadena la liberación de glutamato, que es responsable de saturar los niveles de calcio neuronal tanto extracelular como intracelular. Esta sobrecarga conlleva la síntesis de NO debido a la estimulación de la nNOS. La generación de NO también depende de la iNOS en varios tipos de células inflamatorias donde se da lugar a diferentes rutas de señalización en respuesta a la hipoxia (HIF.1, NF-κB) (Adaptada de Blanco et al., 2007)

Cuando hay un daño cerebral o una neuropatología, la presencia de astrocitos con cambios morfológicos (astrocitos reactivos) es un hecho de importancia destacable. Estos cambios

morfológicos que dan lugar a la hiperplasia y la hipertrofia astrocítica están mediados por un incremento en la expresión de genes tales como los de las proteínas glial fibrilar ácida (GFAP), nestina o VEGF (Mucke y Eddleston, 1993; Pekny y Pekna, 2004; Pekny y Nilsson, 2005). Además, los astrocitos también tienen la capacidad de sintetizar moléculas tales como factores de crecimiento, citoquinas, neuropéptidos y NO, las cuales están implicadas en los efectos neuroprotectores y neurotóxicos que se desencadenan tras un episodio de hipoxia e isquemia (Pekny et al., 2014; Na et al., 2015). Cuando hay daño en el SNC se pierden algunas de las comunicaciones neuronales y gliales, lo cual conlleva a un estado de inflamación persistente que induce o exacerba la neurodegeneración y neurotoxicidad cerebral (Streit, 1996; Bruce-Keller, 1999; Hanisch, 2002; Gibson et al., 2005). Esta excitotoxicidad es debida al incremento de producción del NO a través de la ruta metabólica NO-GMPc por parte de los astrocitos reactivos (Swanson et al., 2004). Por otro lado, cuando tiene lugar este daño cerebral, los astrocitos reactivos también ejercen una función neuroprotectora captando el glutamato que es potencialmente tóxico (Rothstein et al., 1996; Swanson et al., 2004) y liberando tras ello glutatión con el fin de contrarrestar el estrés oxidativo y nitrosativo producido por las ERO y las ERN (Chen et al., 2001; Shih et al., 2003; Vargas et al., 2008), al mismo tiempo que limitan la difusión de células inflamatorias y agentes infecciosos (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004; Voskuhl et al., 2009; Guillamón-Vivancos et al., 2013)

Con el fin de frenar los daños producidos por los radicales libres, se está explorando una vía centrada en los donadores de óxido nítrico como agentes neuroprotectores en los daños producidos por hipoxia e isquemia, en base al papel dual que tienen el NO. El mecanismo protector que lleva a cabo eNOS-NO sugiere que la intervención del NO puede ser efectiva siempre y cuando este se proporcione en la cantidad óptima y justo en el momento necesario para su completo desarrollo, regulando así su propio metabolismo (Willmot y Bath, 2003; Godínez-Rubí et al., 2013). Además, los donadores de NO abren el campo a posibles tratamientos complementarios en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer, donde el estrés oxidativo y nitrosativo son importantes promotores del daño a nivel cerebral (Godínez-Rubí et al., 2013). Los donadores de NO son un grupo heterogéneo de drogas cuya característica común es la habilidad de producir NO o especies relacionadas con el ion nitrosonio (NO^+) o el anión nitroxilo (NO^-), tanto *in vivo* como *in vitro*, independientemente de las formas endógenas (Miller y Megson, 2007). Uno de estos donadores es el nitrato orgánico mononitrato de isosorbida (ISMN). Este donador es utilizado con mucha frecuencia en el tratamiento y la prevención de enfermedades cardiovasculares y pulmonares debido a su capacidad para dilatar los vasos sanguíneos, haciendo que la sangre circule con mayor facilidad. Además también presenta una serie de

ventajas, como son su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y su fácil administración (Oelze et al., 2013). A pesar de su importancia en el tratamiento de patologías cardiopulmonares, se conoce que el ISMN también mejora la adaptación de los individuos a las condiciones hipóxicas ejerciendo efectos beneficiosos también a nivel del sistema nervioso (Erzurum et al., 2007; Fan et al., 2015).

Si bien se sabe que existe una estrecha relación entre la hipoxia y el estrés oxidativo/nitrosativo a nivel del SNC y a pesar de que las alteraciones neurológicas y fisiopatológicas asociadas a la hipoxia son bien conocidas, (Sarkar et al., 2003; West, 2003; LaManna et al., 2004; Rodrigo et al., 2005) el mecanismo molecular que subyace a estos procesos necesita un estudio más profundo.

2. OBJETIVOS

Los fenómenos hipóxicos se encuentran presentes en multitud de situaciones fisiológicas (parto o adaptación a elevada altitud) y patológicas (cáncer, accidentes cerebrales, enfermedades pulmonares y cardiovasculares, traumas físicos e inflamaciones).

Está demostrado, que las situaciones de hipoxia conllevan: (1) La producción de ERO y ERN, (2) el aumento en la expresión de proteínas nitradas, (3) la puesta en marcha de una respuesta de adaptación a la hipoxia mediante HIF-1 α y otros factores de transcripción relacionados, y (4) la inducción de daño tisular.

Por otra parte, se ha demostrado que la administración de donadores de NO disminuye las lesiones hipóxicas, aunque no está clara la vía mediante la cual el NO ejerce esta acción.

Los objetivos planteados en este trabajo han sido: 1) analizar la respuesta del sistema NO/NOS en el cerebro de ratas sometidas a un modelo de hipoxia hipobárica aguda, seguido de dos períodos de reoxigenación (0 y 2 horas), y 2) estudiar el efecto producido por el donador de NO ISMN en dicho modelo.

Para conseguir dichos objetivos se realizará un análisis de las rutas NOS y NF- κ B-iNOS y de la expresión de factores de transcripción de respuesta a la hipoxia como HIF-1 α .

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

3.1.1. Bioética

Todos los individuos fueron alimentados *ad libitum* con pienso comercial, y estabulados en condiciones estándar de luz y temperatura con disponibilidad de agua continua. Todos los experimentos se desarrollaron conforme a la directiva 2010/63/EU, revisada por el Comité de Bioética del Consejo Español de Investigaciones Científicas, y han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Jaén.

3.1.2. Distribución de los animales en grupos experimentales

Para la realización y desarrollo de este trabajo se utilizaron un total de 60 ratas macho de la cepa Wistar cuyo peso medio era de 250-300g. La distribución y número de los animales utilizados se muestra representado en la tabla 1. Los animales hipóxicos fueron divididos en dos grupos experimentales: 1) Animales sin administración del donador de NO (ISMN) y 2) Animales con administración del donador de NO (ISMN). Dentro de cada grupo de tratamiento los individuos fueron sacrificados sin haber sido sometidos a un evento hipóxico (control), inmediatamente tras la hipoxia (0h) y tras 2 horas de reoxigenación (2h).

TRATAMIENTO	GRUPO EXPERIMENTAL	N
Sin ISMN	Control	10
	HH 0h	10
	HH 2h	10
ISMN	Control	10
	D+HH 0h	10
	D+HH 2h	10

Tabla 1. Esquema de distribución y número de animales en los grupos experimentales y el tratamiento empleado (ISMN). Control: animales sacrificados sin hipoxia; HH 0h: animales sacrificados a tiempo 0 tras la hipoxia; HH 2h: animales sacrificados dos horas después de la hipoxia; D+HH 0h: animales tratados con ISMN y sacrificados a tiempo 0; D+HH 2h: animales tratados con ISMN y sacrificados dos horas después de la hipoxia.

3.2. Administración de mononitrato de isosorbida y modelo de hipoxia

El ISMN (0,38 mg/ml) fue administrado a través del agua de bebida durante siete días, controlando la cantidad diaria de agua que ingerían las ratas. Una vez pasado dicho tiempo se procedió a realizar los experimentos de hipoxia.

3.2.1. Hipoxia hipobárica

Los experimentos de hipoxia hipobárica aguda se realizaron en una cámara hipobárica (Figura 5) instalada en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén, diseñada y puesta a punto por miembros del grupo de investigación “Estrés Celular y Edad” (BIO-0184).

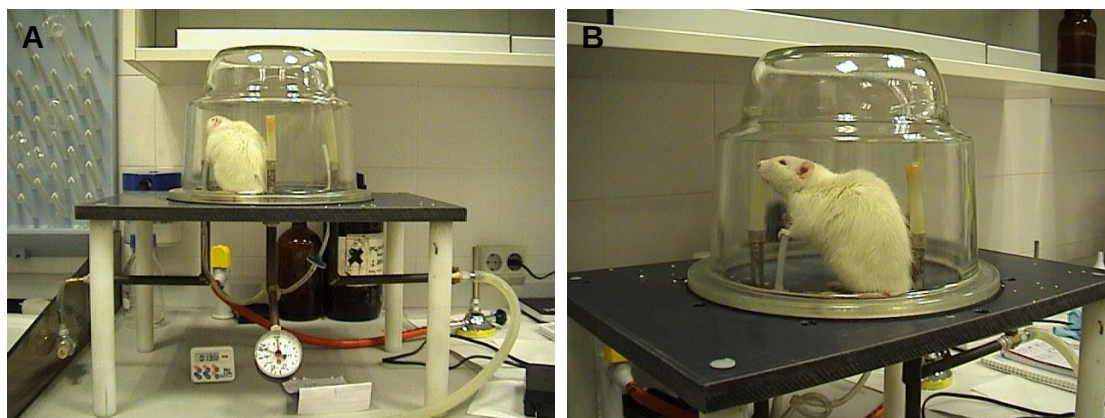


Figura 5. Fotografías pertenecientes a la cámara hipobárica experimental diseñada por miembros del grupo de investigación “Estrés celular y Edad” (BIO-0184). **A)** Cámara hipobárica con manómetro y llaves reguladoras de entrada de aire. **B)** Rata macho *Wistar* introducida en la cámara hipobárica durante el proceso de hipoxia.

Los episodios de hipoxia hipobárica se realizaron introduciendo a los animales en la cámara mostrada anteriormente. La presión se controló por medio de una bomba de vacío y con flujo ajustable. Esta cámara fue provista de un manómetro que permitía controlar la presión del interior a lo largo de todo el episodio experimental. Para obtener las condiciones hipóxicas necesarias dentro de la cámara se redujo la presión parcial de oxígeno (pO_2) hasta que se alcanzó una presión de aprox. 300 hPa (Peinado et al., 2014) donde se mantuvo a los animales durante 1 hora. Dichas condiciones emulan una altitud que corresponde aproximadamente a 30.000 pies (9.114 m) (Peinado et al., 2014). Las velocidades de ascenso y descenso fueron controladas y mantenidas en 1.000 pies/min. Una vez finalizado el episodio hipóxico, los animales correspondientes al grupo 0h de reoxigenación fueron sacrificados inmediatamente, mientras que los animales

correspondientes al grupo 2h de reoxigenación fueron sacrificados dos horas después de la salida de la cámara hipobárica (Figura 6).

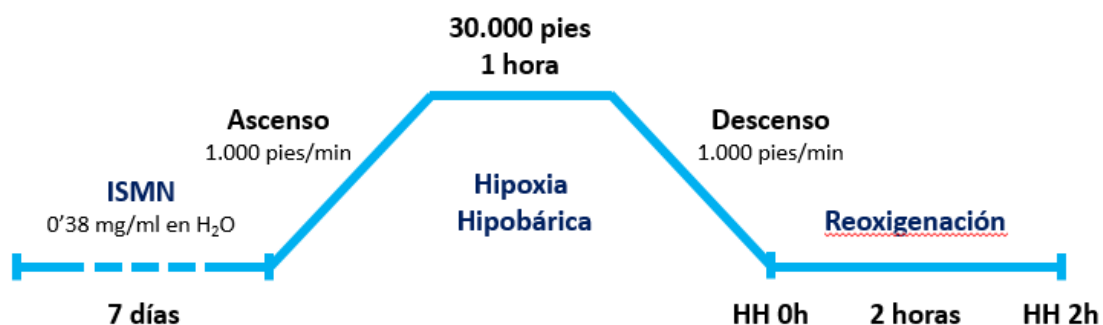


Figura 6. Resumen del protocolo de administración del donador ISMN, realización del episodio de hipoxia y su posterior reoxigenación.

En este caso como grupo control se tomaron individuos sometidos a condiciones normobáricas y normóxicas dentro de la cámara durante el mismo período de tiempo que los animales hipóxicos.

3.3. Técnicas bioquímicas

3.3.1. Extracción y procesamiento de las muestras destinadas a técnicas bioquímicas

Los animales de los cuales se extrajeron muestras para la realización de técnicas bioquímicas fueron sacrificados mediante dislocación cervical instantánea. A continuación, se les extrajo el cerebro y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido.

En primer lugar se homogenizó el hemisferio cerebral en frío mediante la utilización de unas tijeras. La alícuota de cerebro destinado a la técnica de *Western Blot* se homogeneizó 1:3 (p/v) en el tampón correspondiente (Tabla 4) a 4° C con la ayuda de un homogeneizador (Ultra-turrax T8. IKA ® Werke, Staufen, Alemania). El homogenado resultante se centrifugó durante 1 h a 42.000 rpm en una ultracentrífuga (OPTIMA IL-90K. Rotor TY 50TI. Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.) a 4° C. Tras la centrifugación se separó el sobrenadante y se almacenó a -80° C.

TAMPÓN DE HOMOGENIZACIÓN

Tris-HCl 30 mM, pH 7,4
SDS 1%
Mezclar y ajustar el pH a 7,4
Añadir a 10 ml de la mezcla anterior 12,5 µl de metil sulfonil fluoruro (PMSF) 0,1 M
Añadir a 10 ml de la mezcla anterior media pastilla de Cocktail de inhibidores de proteasas (Ref.: 1836153. Roche, Basilea, Suiza)

Tabla 4. Composición y preparación del tampón de homogenización para las muestras destinadas a la técnica de Western Blot.

Para la realización la técnica de determinación de metabolitos de óxido nítrico (NOA) se llevó a cabo el homogeneizado de las muestras mantenidas a -80°C, con el homogenizador *Ultra-Turrax T8* en los tampones de desproteinización NaOH 0.5N (*Sodio Hidroxido. Panreac, Ref. 131687*) y ZnSO₄ 10% (*Zinc sulfate heptahydrate. Sigma Aldrich, Ref. Z4750*) en proporción 1/2/2 (p/v/v). Los homogenados resultantes se sometieron a un proceso de sonicación mediante el uso del sonicador *Sonopuls HD 2070-MS 72 (Bandelin)*. Tras 15 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 13.500 rpm durante 5 min.

3.3.2. Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) (Albumin fraction V (pH 7,0). Ref.: A1391. AppliChem, Darmstadt, Alemania) a concentraciones conocidas para elaborar la recta patrón. Se realizaron dos diluciones de cada muestra con un volumen final de 10 µl a las que se añadieron 200 µl del reactivo comercial (Protein assay reagent. Ref.: 500-0006. BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). Tras 5 minutos se determinó la absorbancia de las muestras mediante el empleo de un espectrofotómetro (Infinite® F500. Tecam, Suiza) a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco que contenía 10 µl de agua destilada y cuyo procesamiento siguió el mismo protocolo experimental que el resto de muestras.

3.3.3. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot

Se realizaron los cálculos para obtener los volúmenes que eran necesarios para cargar 20 µg de proteína por pocillo. Una vez cargados los pocillos, las muestras se calentaron a 70° C durante 10 minutos.

Para el fraccionamiento electroforético se utilizaron 800 ml del tampón de electroforesis. (Invitrogen NP0001).

Para esta técnica se usaron geles *NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 10 well* (Invitrogen NP0321BOX) y el equipo de electroforesis empleado fue un *XCell SureLock™ Mini-Cell* (Invitrogen EI0001). Cada uno de los respectivos geles se corrió durante 1 hora y 5 minutos a 200 V.

A continuación, se procedió a la transferencia mediante el uso de *iBlot® Gel Transfer Device*. *Life technologies* (Invitrogen IB1001EU).

Posteriormente, se lavó la membrana con agua destilada y se bloqueó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo agitación moderada utilizando tampón de bloqueo al 5% (Tablas 5 y 6).

TBS 5X

	Concentración	Mezclar y ajustar pH a 7,6 con HCl (Panreac 141020, Mr 36,46)
Sodio Cloruro (Panreac 141659, Mr: 58,44)	0,68 M	
Potasio Cloruro (Fluka 60130, Mr: 74,56)	0,013 M	
TRIZIMA® Base (Sigma T6066, Mr 121,1)	0,123 M	
Agua destilada	-	

Tabla 5. Composición y preparación del tampón de TBS 5x para el tampón de bloqueo.

TAMPÓN DE BLOQUEO 5%

	Concentración
TBS 5X	1X
Leche desnatada en polvo sin calcio	5%
Tween 20 (Bio-Rad 170-6531)	0,1 %
Agua destilada	-

Tabla 6. Composición y preparación del tampón de bloqueo.

Una vez finalizado el bloqueo, se incubó la membrana toda la noche a 4°C (en cámara fría) con agitación suave en una solución de contenía el antisuero primario (Tabla 7) frente al antígeno de interés diluido en el tampón de bloqueo correspondiente (8-10 ml por membrana).

ANTICUERPOS PRIMARIOS

Antisuero 1º	Carácter	Dilución	Procedencia
Anti-GFAP	Policlonal	1/50.000	Cow glial fibrilar acidic protein. Ref.: Z0334. Daki, Glostrup, Dinamarca
Anti-n-Tyr	Policlonal	1/2.000	Cedido por el Dr. Rodrigo. Insitituto Cajal, CSIC, Madrir, España
Anti-eNOS	Monoclonal	1/800	Purified mouse anti-eNOS. Type III MAb. Ref.: 610327. Transduction, Lexington, KY, EE.UU.
Anti-nNOS	Policlonal	1/3.000	Cedido por Dra. V. Riveros-Moreno. Wellcome Res. Laboratories, Beckenham, RU
Anti-iNOS8	Policlonal	1/500	Cedido por el Dr. L.O. Uttenthal. Instituto Cajal, Madrid, España (Uttenthal et al., 1998)

Tabla 7. Características, concentraciones y procedencias de los anticuerpos primarios utilizados en la realización del Western Blot.

Una vez terminada la incubación, se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente y agitación fuerte usando tampón de lavado (Tabla 8).

TAMPÓN DE LAVADO

	Concentración
TBS 5X	1X
Leche desnatada en polvo sin calcio	5%
Tween 20 (Bio-Rad 170-6531)	0,1 %
Agua destilada	-

Tabla 8. Composición y del tampón de lavado.

Posteriormente, se incubaron las membranas de nuevo pero en este caso con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave (Tabla 9).

ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Antisuero 1°	Antisuero 2° (Denominación y Procedencia)	Dilución
Anti-GFAP	Anti-Rabbit IgG (whole molecule) - Peroxidase antibody produced in goat (Sigma A-0545)	1/10.000
Anti-n-Tyr	Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat (Sigma A-0545)	1/10.000
Anti-eNOS	Anti-Mouse IgG (FC specific)-peroxidase antibody produced in goat. Ref.: A-0168. Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.	1/2.000
Anti-nNOS	Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat. Ref.: A-0545. Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.	1/10.000
Anti-iNOS8	Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat (Sigma A-0545)	1/10.000

Tabla 9. Características, concentraciones y procedencias de los anticuerpos secundarios utilizados en el Western Blot en función del anticuerpo primario.

Finalmente, tras la segunda incubación se realizaron seis lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente y agitación suave con el mismo tampón de lavado que se había usado anteriormente.

El procedimiento de revelado se realizó íntegramente en cámara oscura. En primer lugar las membranas fueron incubadas con solución de revelado *ECL Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare RPN2132) durante 5 minutos. Tras ello, las membranas fueron situadas en un sistema de exposición *Hypercassette Neutral* (GE Healthcare RPN11643), sobre las cuales se puso una película fotográfica *X-OMAT UV film 100 NIF* (Kodak 3260552). Se realizaron exposiciones a tiempo variable, de acuerdo a la intensidad de la señal. Tras la impresión de la película, esta se sumergió, en el siguiente orden, en revelador (AGFA G150), agua, fijador (AGFA G354) y agua. Por último, se dejó secar la película revelada a temperatura ambiente.

Finalmente, las placas fueron escaneadas y densitometradas haciendo uso del software TotalLab v1.11 (Phoretix 1DPro).

3.3.4. Determinación de metabolitos de óxido nítrico (NOA)

La producción de NO de las muestras de cerebro se determinó indirectamente a través de la cantidad de nitratos, nitritos y otros compuestos S-nitrosos. Para ello se ha llevado a cabo el procedimiento descrito por Braman y Hendrix (Braman y Hendrix, 1989) mediante el empleo del analizador de NO NOATM 280i (Sievers Instruments), ubicado en los Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de la Universidad de Jaén.

El NOATM detecta metabolitos derivados del NO basándose en la reacción que tiene lugar en fase gaseosa entre dicha molécula y el ozono (O₃) para producir dióxido de nitrógeno (NO₂) y oxígeno (O₂). Un fotomultiplicador enfriado termoeléctricamente detecta la cantidad de NO₂, lo cual permite obtener una estimación indirecta de la cantidad de NO existente en el tejido. En la ampolla del NOATM donde tiene lugar la reacción se añade una solución saturada de cloruro de vanadio (VCl₃) en HCl 1M. Este analizador dispone de suministro de nitrógeno y está equipado con un circuito de agua caliente que aumenta la temperatura de los reactivos a 90°C para favorecer la cinética de la reacción. El vapor de HCl es retirado a través de otra ampolla que contiene NaOH 1M.

Una vez estabilizada la señal en el analizador, los sobrenadantes (40µL) fueron inyectados por triplicado en la ampolla del NOATM. De esta forma se produce una reacción en el medio redox proporcionado por el cloruro de vanadio, transformándose los NO_x en NO, el cual es detectado por la quimioluminiscencia producida al reaccionar con el ozono. Durante todo el análisis se mantuvieron unas condiciones constantes de temperatura y presión (-12 °C y 7 Torr).

El NOATM está acoplado a un ordenador con un software específico con el que se obtuvieron las estimaciones de la concentración de NO_x (los valores de concentración de NO_x fueron interpolados en una recta de calibración realizada con una solución de nitrato sódico). Por último, los valores de NO_x fueron referidos a la concentración total de proteína del extracto inicial de cada muestra, analizada espectrofotométricamente por el método de Bradford.

3.3.5. Medición de sustancias activas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La determinación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se llevó a cabo mediante el método descrito por Buege y Aust (1978). La homogeneización de las muestras fue realizada en 3 volúmenes (p/v) de PBS 0,01 M pH = 7,4 en tubos eppendorf sumergidos en hielo. A continuación, las muestras se sonicaron con 2 ciclos de 5 segundos. Seguidamente, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 40 minutos a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se repartieron en alícuotas de 0,3 ml con una concentración de 18 mg proteína/ml. Las mismas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego

de lo cual se le agregaron 0,7 ml de reactivo (15% ácido tricloroacético, Sigma Ultra, Ref.: T9159; 0,38% ácido tiobarbitúrico, Sigma, Ref.: T5500; 2% ácido clorhídrico 37%, Sigma, St Louis, MO, EE.UU, Ref.: H1758) y se incubaron durante 15 minutos a 95°C en tubos de vidrio. Finalmente, se procedió a la lectura espectrofotométrica de los sobrenadantes a 535 nm en un equipo Sunrise TECAN.

3.3.6. Determinación del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α)

HIF-1 α Transcription Factor Assay Kit de Cayman Chemical (Ann Arbor, Minnesota, USA; 10006910) es un método sensible para la detección de la actividad de unión específica al ADN de factores de transcripción en extractos nucleares. Previamente a la utilización del Kit, es necesario extraer la fracción nuclear donde se encuentra el factor de transcripción HIF-1 α (Cayman Chemical 10007889)

En una placa de 96 pocillos se encuentra inmovilizada una secuencia específica de ADN de doble cadena (dsDNA) que contiene el elemento de respuesta de HIF-1 α (5'-ACGTG-3'). De esta forma, el factor HIF-1 α que se encuentre en los extractos nucleares, se unirá de forma específica al elemento de respuesta de HIF-1 α . El complejo del factor de transcripción HIF se detecta añadiendo un anticuerpo primario específico dirigido contra HIF-1 α . Se añade un anticuerpo secundario conjugado con HRP para obtener una lectura específica a 450 nm.

3.3.7. Determinación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras de las células B activadas (NF κ B)

NF- κ B (p65) Transcription Factor Assay Kit de Cayman Chemical (Ann Arbor, Minnesota, USA; 10007889) es un método sensible para la detección de la actividad de unión específica al ADN de factores de transcripción en extractos nucleares. Previamente a la utilización del Kit, es necesario extraer la fracción nuclear donde se encuentra el factor de transcripción HIF-1 α (Cayman Chemical 10007889)

Al igual que en el caso de HIF-1 α , en una placa de 96 pocillos se encuentra inmovilizada una secuencia específica de ADN de doble cadena (dsDNA) que contiene el elemento de respuesta de NF- κ B. De esta forma, el factor NF- κ B que se encuentre en los extractos nucleares, se unirá de forma específica al elemento de respuesta de NF- κ B. El complejo del factor de transcripción NF- κ B (p65) se detecta añadiendo un anticuerpo primario específico dirigido contra NF- κ B (p65). Se añade un anticuerpo secundario conjugado con HRP para obtener una lectura específica a 450 nm.

3.4. Análisis estadístico

Se aplicó el test t de Student para datos apareados o no apareados a fin de comparar las medias entre grupos. Los valores se expresaron como media aritmética $\pm$ desviación estándar, aceptándose un p-valor menor de 0,05 como nivel de significación.

4. RESULTADOS

4.1. Técnicas bioquímicas

4.1.1. Western Blot

Tras la realización del análisis de las bandas obtenidas mediante el empleo de la técnica Western Blot y en relación a la isoforma nNOS (Figura 7), se observó que la propia administración del donador ISMN provoca un aumento significativo en los niveles basales de expresión. Del mismo modo se aprecia un incremento significativo en la expresión de dicha isoforma tras haber sometido a los animales al evento hipóxico, tanto en presencia como en ausencia del donador de NO.

La nNOS también aumenta de forma significativa tras el período de reoxigenación cuando se ha administrado ISMN a los animales, observándose así en este punto el máximo del nivel de expresión.

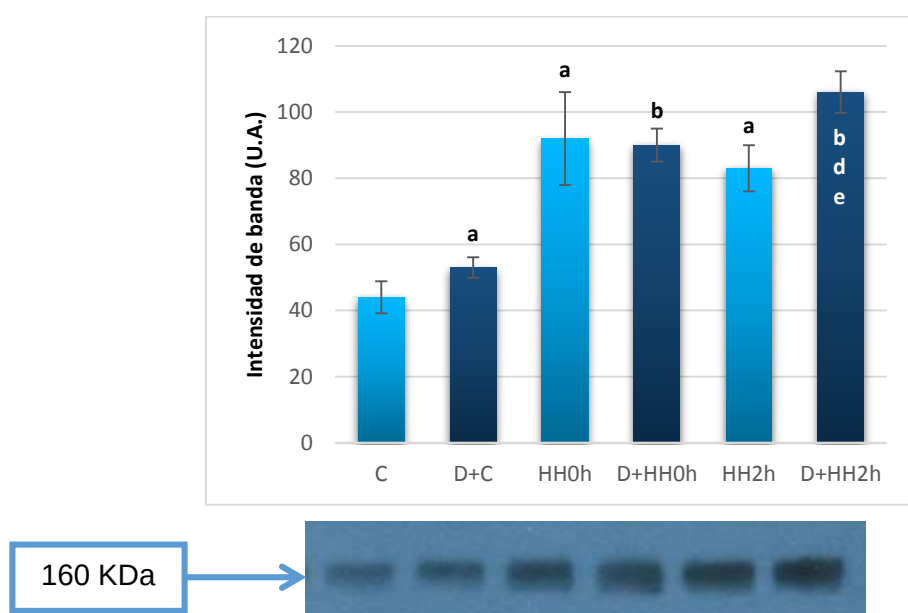


Figura 7. Análisis Western Blot de la expresión de nNOS en cerebro de rata. En la gráfica se expresa la cuantificación densitométrica de la isoforma nNOS en el cerebro de ratas en presencia o ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Bajo la gráfica aparecen las bandas correspondientes a dicho Western Blot. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control ($44 \pm 4,8$); D+C: Control + Donador ISMN ($53 \pm 3,1$); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas (92 ± 14); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas (90 ± 5); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas (83 ± 7); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica

Respecto a los niveles de la eNOS (Figura 8), según los datos recogidos se puede observar que en presencia del donador de NO, los niveles basales no se ven alterados significativamente. Inmediatamente después de la hipoxia, los niveles de expresión de esta isoforma aumentan de forma significativa tanto en el grupo sin tratamiento como en el grupo tratado. Sin embargo, tras el período de reoxigenación, los niveles de expresión de la eNOS se ven disminuidos significativamente en ambos grupos experimentales (con y sin ISMN).

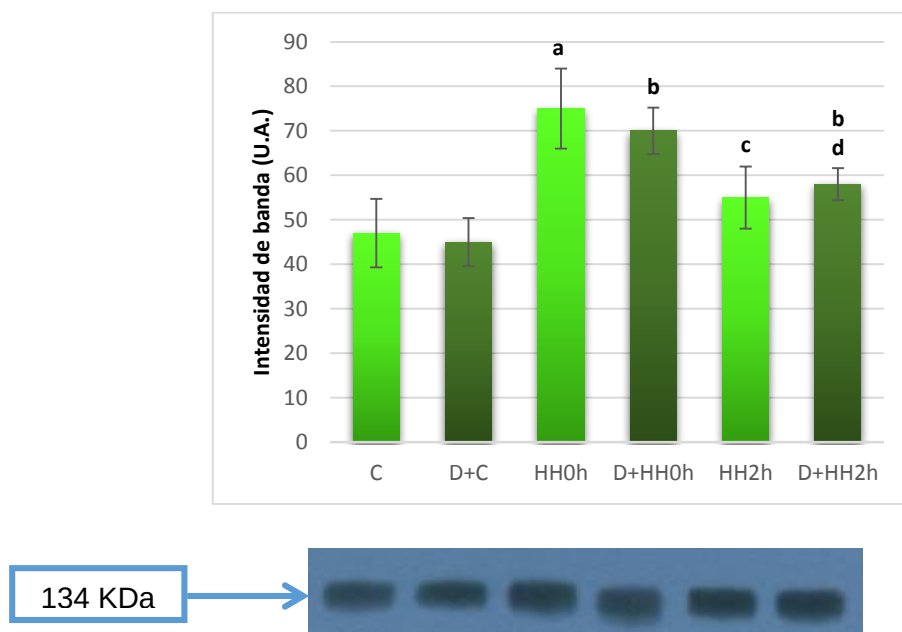


Figura 8. Análisis Western Blot de la expresión de eNOS en cerebro de rata. En la gráfica se expresa la cuantificación densitométrica de la isoforma eNOS en el cerebro de ratas en presencia o ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Bajo la gráfica aparecen las bandas correspondientes a dicho Western Blot. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control ($47 \pm 7,7$); D+C: Control + Donador ISMN ($45 \pm 5,4$); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas (75 ± 9); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas ($70 \pm 5,2$); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas (55 ± 7); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 2 horas ($58 \pm 3,6$).

Por último, en referencia a la iNOS (Figura 9), al igual que ocurre con la isoforma neuronal, la mera presencia del donador de NO incrementa de forma significativa los niveles basales. Además, cuando el ISMN es administrado, también se observa un aumento significativo en la expresión de la iNOS tras el transcurso del período de reoxigenación, alcanzándose así los niveles máximos en el punto D+HH2h.

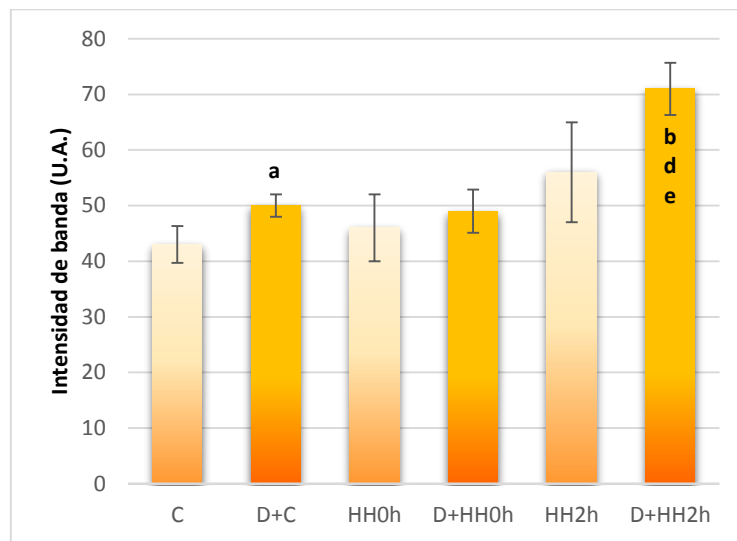


Figura 9. Análisis Western Blot de la expresión de iNOS en cerebro de rata. En la gráfica se expresa la cuantificación densitométrica de la isoforma iNOS en el cerebro de ratas en presencia o ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Bajo la gráfica aparecen las bandas correspondientes a dicho Western Blot. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control ($43 \pm 3,3$); D+C: Control + Donador ISMN (50 ± 2); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas (46 ± 6); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas ($49 \pm 3,9$); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas (56 ± 9); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 2 horas ($71 \pm 4,7$).

Respecto a la GFAP (Figura 10), no se aprecian diferencias significativas en los niveles de expresión basales cuando se administra a los animales el ISMN. Sin embargo, en relación a estos niveles (Control), cuando el donador está presente, si se observa un incremento tras la hipoxia de forma significativa. Por otro lado, cuando se comparan los niveles de expresión obtenidos tras la hipoxia con los pertenecientes al grupo hipoxia y reoxigenación, se observa un descenso significativo de los mismos, independientemente de que el donador esté o no presente.

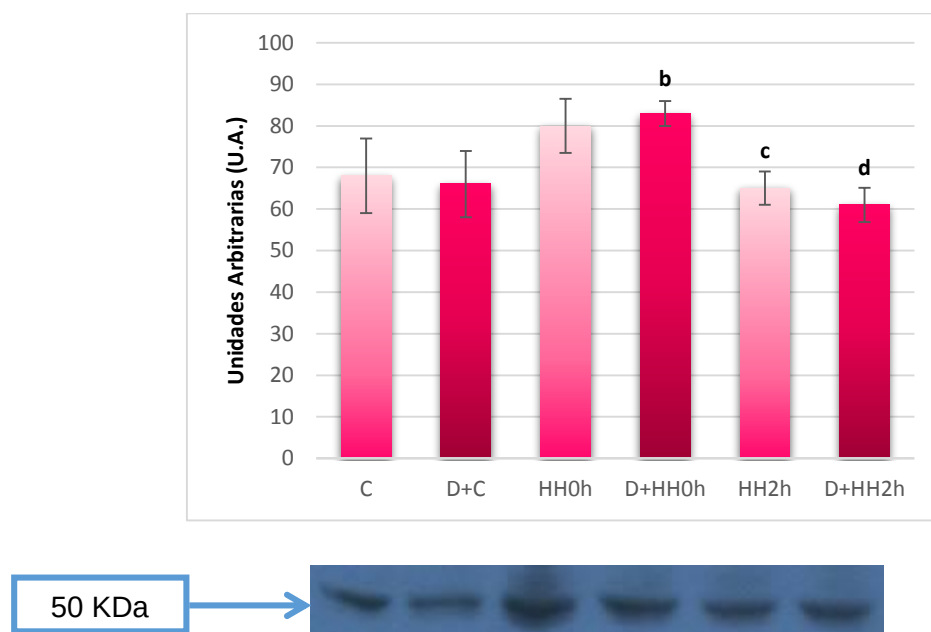


Figura 10. Análisis Western Blot de GFAP en cerebro de rata. En la gráfica se expresa la cuantificación densitométrica de GFAP en el cerebro de ratas en presencia o ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Bajo la gráfica aparecen las bandas correspondientes a dicho Western Blot. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control (68 ± 9); D+C: Control + Donador ISMN (66 ± 8); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas ($80 \pm 6,5$); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas (83 ± 3); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas (65 ± 4); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 2 horas ($61 \pm 4,1$).

También se detectaron 7 bandas inmunorreactivas empleando el antisuero anti-n-Tyr, las cuales pertenecen a proteínas nitradas con diferentes pesos moleculares. En la gráfica (Figura 11), se reflejan los valores correspondientes al total de dichas proteínas, observándose que los niveles basales de expresión no se ven alterados por la presencia del donador. Sin embargo, cuando el ISMN es administrado, los niveles de expresión proteica aumentan de forma significativa tras la hipoxia, e incrementan nuevamente tras el período de reoxigenación.

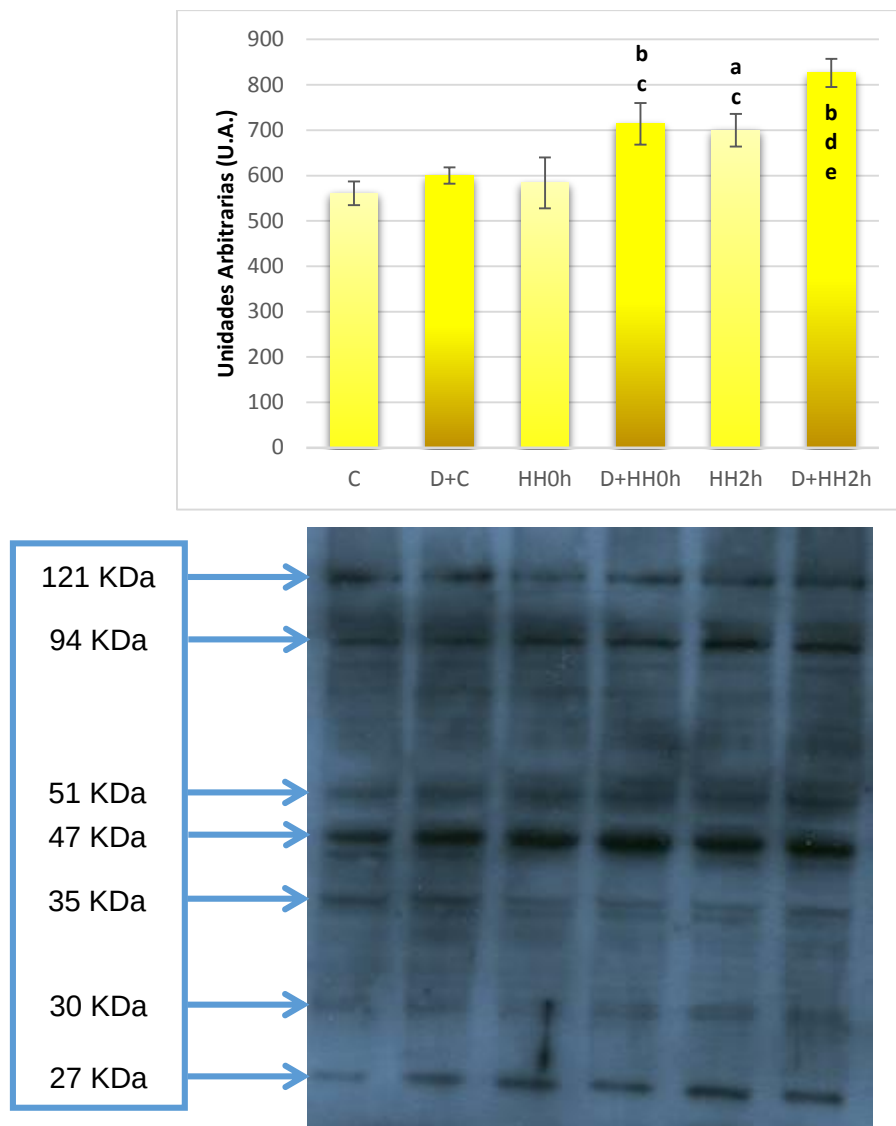


Figura 11. Estudio de las proteínas nitradas en cerebro de rata. Análisis de Western Blot de las proteínas modificadas por la nitrotirosina en presencia o ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Bajo la gráfica aparecen las bandas correspondientes a dicho Western Blot. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control (561 ± 26); D+C: Control + Donador ISMN (600 ± 18); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas (584 ± 56); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas (714 ± 46); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas (700 ± 36); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 2 horas (826 ± 31).

4.1.2. NOA

Tras analizar la producción de NO (Figura 12), se observó que cuando se administra el ISMN, incrementan de forma significativa los niveles del grupo control. Tras someter a los animales a hipoxia hipobárica, se aprecia que la producción de NO aumenta significativamente y de manera progresiva cuando el donador no está presente. Por otro lado, cuando se aplica el tratamiento con ISMN, los niveles de NO se elevan de forma

significativa en el grupo correspondiente a los animales que han sido sometidos a hipoxia y reoxigenación.

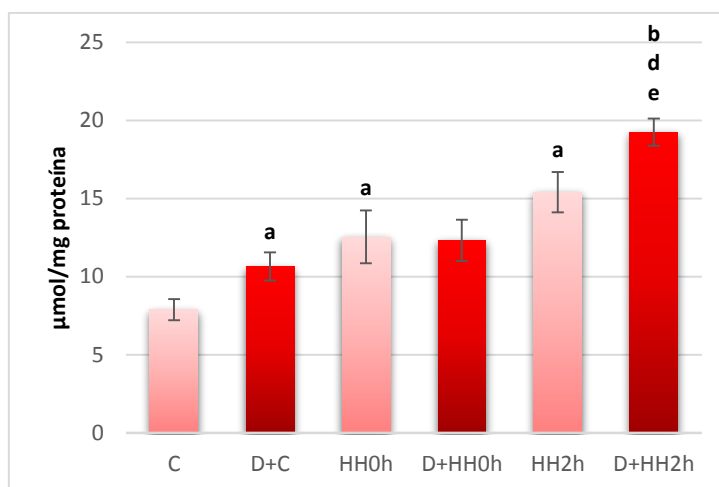


Figura 12. Determinación de la producción de NO en cerebro de rata en presencia o ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en $\mu\text{mol/mg}$ proteína. Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control ($7,88 \pm 0,68$); D+C: Control + Donador ISMN ($10,65 \pm 0,91$); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas ($12,54 \pm 1,69$); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas ($12,32 \pm 1,32$); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas ($15,40 \pm 1,29$); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 2 horas ($19,25 \pm 0,87$).

4.1.3. TBARS

En relación a la producción de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (Figura 13), en presencia del ISMN, no existen diferencias significativas entre los dos grupos control. Tanto en presencia como en ausencia del donador de NO, los niveles de TBARS incrementan significativamente tras el evento hipóxico y tras la reoxigenación.

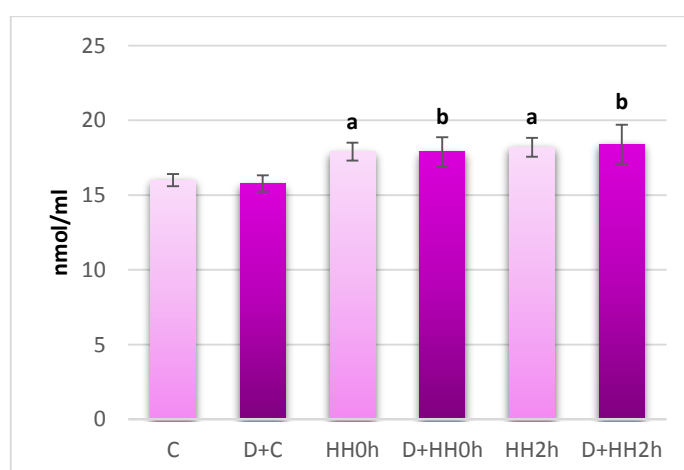


Figura 13. Influencia de la hipoxia en la peroxidación lipídica en cerebro de rata (TBARS) en presencia y ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en nmol de malonaldehído (MDA) formado por ml. Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control ($16 \pm 0,4$); D+C: Control + Donador ISMN ($15,78 \pm 0,55$); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas ($17,9 \pm 0,6$); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas ($17,88 \pm 1$); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas ($18,2 \pm 0,63$); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 2 horas ($18,4 \pm 1,3$).

4.1.4. HIF-1 α

En relación a los resultados de HIF-1 α (Figura 14), se observó que cuando se administraba el donador de NO, los niveles de expresión de este factor de transcripción disminuían de forma significativa en el grupo control. Tras la hipoxia, y en presencia del ISMN, los niveles de expresión de HIF-1 α aumentan de forma significativa. Por el contrario, tras la reoxigenación, los niveles de expresión caen significativamente tanto en presencia como en ausencia del donador, alcanzando niveles inferiores a los basales.

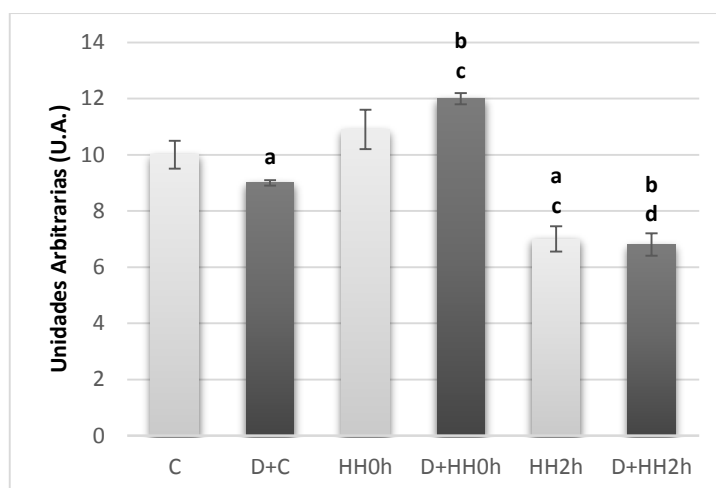


Figura 14. Determinación de HIF-1 α en cerebro de rata en presencia y ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control ($10 \pm 0,5$); D+C: Control + Donador ISMN ($9 \pm 0,1$); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas ($10,9 \pm 0,7$); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas ($12 \pm 0,2$); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas ($7 \pm 0,45$); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 2 horas ($6,8 \pm 0,4$).

4.1.5. NF- κ B

En relación a la inflamación y NF- κ B (Figura 15), se observó que los niveles de expresión de este factor de transcripción no variaban significativamente a nivel basal cuando el ISMN era administrado. Sin embargo, si se observa un aumento significativo de los niveles de expresión respecto al control tras haber sometido a los animales a la hipoxia, tanto en presencia como en ausencia del donador. Del mismo modo, la expresión de NF- κ B también incrementa significativamente tras el período de reoxigenación independientemente de que el grupo haya sido tratado con ISMN o no.

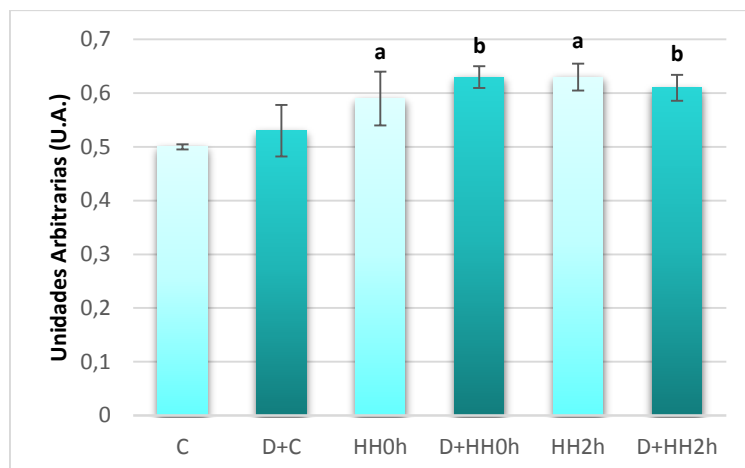


Figura 15. Determinación de NF-κB en cerebro de rata en presencia y ausencia de ISMN en un modelo de hipoxia hipobárica. Los resultados corresponden a la media ($\pm$ desviación estándar) de los datos obtenidos expresados en unidades arbitrarias (U.A.). Las columnas marcadas con letras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). C: Control ($0,5 \pm 0,005$); D+C: Control + Donador ISMN ($0,53 \pm 0,048$); HH0h: Hipoxia hipobárica 0 horas ($0,59 \pm 0,05$); D+HH0h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 0 horas ($0,63 \pm 0,02$); HH2h: Hipoxia hipobárica 2 horas ($0,63 \pm 0,025$); D+HH2h: Donador ISMN + Hipoxia hipobárica 2 horas ($0,61 \pm 0,024$).

5. DISCUSIÓN

La exposición a un evento hipóxico provoca daños neurológicos en el SNC debido al estrés oxidativo y nitrosativo al que es sometido el tejido, afectando especialmente al cerebro debido a su alto metabolismo energético. Es conocido que el NO, en función de su concentración puede tener un doble papel neuroprotector/neurotóxico. Por ello, la administración controlada de NO por parte de un donador, podría ayudar a mejorar la respuesta del organismo ante un episodio hipóxico cerebral.

El malonaldehído, como producto de la peroxidación lipídica, es considerado como un indicador del nivel de estrés oxidativo (Freeman y Crapo, 1981; Fan et al., 2015). Nuestros resultados acerca de los niveles de peroxidación lipídica mediante la técnica de TBARS, han mostrado un incremento del grado de peroxidación lipídica tras la hipoxia en ausencia del donador de NO ISMN, de forma similar a lo descrito por otros autores (Fan et al., 2015). Sin embargo, en nuestro caso, los animales tratados con ISMN muestran unos resultados de TBARS similares a los no tratados (Figura 13); de igual forma, otros autores han descrito resultados similares en condiciones hipóxicas y en presencia de donadores de NO (Wainwright et al., 2007) mientras otros estudios reportan un descenso en estos niveles con la hipoxia y con tratamiento con donadores de NO (Khan et al., 2006; Godínez-Rubí et al., 2013; Fan et al., 2015). Estos resultados pueden deberse bien a las diferencias en el modelo de hipoxia o al tipo de donador empleados, bien a alteraciones del sistema antioxidante de las células, que se ve afectado durante la hipoxia. En concreto, se han descrito diferencias significativas en la actividad de diversas enzimas antioxidantes como las SOD GSH-Px y CAT con la hipoxia (Fan et al., 2015).

Tras un fenómeno de tipo hipóxico, se desencadena en el cerebro un proceso de activación glial que implica entre otras acciones, un incremento de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), la cual se ha utilizado como marcador de astrocitos activados (Mucke y Eddleston, 1993; Pekny y Nilsson, 2005). Nuestros resultados sobre la expresión de GFAP tras la hipoxia varían en función del tratamiento, ya que mientras que en los animales no tratados no se aprecian diferencias significativas tras la HH, en los animales a los que se les administró ISMN sí se observa un aumento de la reactividad glial inmediatamente tras la hipoxia, aunque estos valores recuperan los valores basales conforme transcurre el período de reoxigenación (Figura 10). Estos datos indican por un lado, que si bien el modelo de hipoxia elegido es capaz de producir cierto daño, como se ha comprobado con los resultados referentes al estudio de los niveles de TBARS, no es lo suficientemente agresivo como para desencadenar una respuesta glial significativa. Sin embargo, la alteración del sistema redox de las células tras este modelo de hipoxia sí parece ser suficiente para

afectar de alguna manera al mecanismo de respuesta de activación de los astrocitos ante la hipoxia en presencia de un donador de NO. Esto se puede deber a la compleja relación que hay entre la reactividad glial y el sistema NO/NOS. De hecho, se ha descrito que los astrocitos, que pueden expresar las tres isoformas NOS, secretan NO que puede tener tanto efectos citotóxicos como protectores sobre las células cercanas, dependiendo dicho efecto de factores como la cantidad de NO suministrado o del estado redox de las células diana (Gibson et al., 2005). Además, los astrocitos también pueden influenciar el estado antioxidante neuronal y servir como un sumidero de NO, que sucesivamente reduce el estrés oxidante neuronal durante la hipoxia (Chen y Swanson, 2003). Estos antecedentes permiten sugerir que cambios en la expresión de GFAP podrían acabar afectando al sistema NO/NOS en el cerebro sometido a hipoxia y viceversa. Así, la expresión de la GFAP expone la fina regulación existente entre el sistema NO/NOS y la reactividad glial, ya que la presencia del donador pone de manifiesto el hecho de que pequeñas variaciones de NO pueden afectar a la respuesta astrocítica.

Respecto a la expresión de la nNOS, se observa un aumento de la expresión de la misma tras la hipoxia, independientemente de si los animales han sido tratados o no con ISMN (Figura 7), aunque este aumento es mantenido durante la reoxigenación en el caso de los animales no tratados y se ve incluso aumentado tras 2 horas de reoxigenación en los animales tratados con ISMN (D+HH2h). En contraposición, existen estudios que exponen que dicha isoforma ve limitada su acción o incluso inhibida cuando tiene lugar un evento hipóxico, reduciendo así su excitotoxicidad y el estrés oxidativo y nitrosativo producido (Yu et al., 2008; Ito et al., 2010; Godínez-Rubí et al., 2013). El efecto del NO derivado de nNOS en la hipoxia ha sido clásicamente definido como negativo, sin embargo, el hecho de que un donador de NO aumente la expresión de dicha isoforma como respuesta a un modelo moderado de daño hipóxico nos hace replantearnos este papel de la nNOS, como también se ha indicado por parte de otros autores (Nandagopal et al., 2001; Feng et al., 2009). En este sentido, el NO producido por nNOS tras el tratamiento con ISMN podría estar promoviendo el efecto beneficioso del NO. Todas estas informaciones vienen a sugerir la complejidad en la regulación de la isoforma neuronal.

En relación a la eNOS, los resultados obtenidos en este trabajo muestran un aumento de los niveles de expresión de la misma tras la hipoxia, independientemente de la administración del donador. Esta respuesta respondería en un principio al papel característico de la eNOS que se ha descrito como el principal agente responsable del aumento de la vasodilatación que se produce bajo condiciones hipóxicas con el fin de incrementar el aporte de O₂ a la zona hipóxica, por lo que el NO derivado de esta isoforma se considera que posee efectos

beneficiosos (Bolaños y Almeida, 1999). A medida que progresa la reoxigenación, los valores de expresión de eNOS en ambas situaciones (animales tratados y no tratados con ISMN) comienzan a decaer, aunque no llegan a alcanzar los niveles basales (Figura 8). En definitiva, nuestros datos no muestran cambios en la expresión de eNOS después de la administración de ISMN.

Se considera que el NO producido por la isoforma inducible de la NOS posee efectos neurotóxicos (Huang et al., 1994). En relación a la expresión de la iNOS, en nuestro estudio sólo hemos observado variaciones destacables en el punto de 2 horas de reoxigenación en los animales tratados con ISMN, donde se aprecia un incremento significativo, mientras que los animales no tratados con ISMN no muestran diferencias significativas (Figura 9). Algunos autores destacan el incremento de la expresión de la iNOS tras el período de reoxigenación en un modelo de hipoxia, pero sin embargo exponen que los niveles de esta isoforma se ven atenuados cuando se administra un donador de NO (Iadecola et al, 1995; Khan et al., 2005).

La determinación de los valores de NO realizada en este trabajo indica un incremento progresivo en los niveles de NO como consecuencia de la hipoxia y posterior reoxigenación en los animales no tratados. Aunque en los animales a los que se les administró ISMN sólo se observa un incremento tras 2 horas de reoxigenación (D+HH2h), este es muy destacado (Figura 12). De forma similar, otros trabajos también han demostrado que los niveles de NO incrementan drásticamente cuando se administran donadores como el ISMN o la nitroglicerina (GTN) y la presión parcial de oxígeno se encuentra en niveles inferiores a los que se consideran normales (Agvald et al., 2001). Es destacable que el aumento que hemos detectado en el punto de D+HH2h corre paralelo a la inducción de la expresión de nNOS e iNOS, y al descenso en la expresión de eNOS que también hemos observado en este trabajo. Además, el comportamiento de los niveles de NO en los animales tratados es muy similar al descrito para la iNOS.

Como se ha apuntado anteriormente, otro evento importante que sucede en un episodio hipóxico es la nitración de proteínas. Este fenómeno suele aumentarse a medida que avanza la reoxigenación, pues en ese punto es cuando el tejido se encuentra en un estado redox más adecuado para la formación de peroxinitrito (López et al., 2005). De esta forma, nuestros resultados muestran que la nitración de residuos de tirosina se ve incrementada en presencia del ISMN tras la hipoxia y tras la reoxigenación, mientras que en los animales no tratados, sólo se aprecia un incremento en los niveles de nitración en el punto de HH2h (Figura 11). Por lo tanto, nuestros resultados parecen sugerir que el donador de NO facilita la formación de ONOO^- y la consecuente nitración proteica, muy probablemente debido al efecto de la iNOS o incluso a la nNOS tras la reoxigenación, mientras que el aumento en el

punto D+HH0h podría relacionarse con las isoformas constitutivas. De hecho, algunos estudios han demostrado que la eNOS podría estar involucrada en la formación de ONOO^- (Han et al., 2006; Mitchell et al., 2007). Además, la producción excesiva de NO por parte de la eNOS puede ser perjudicial ya que puede conducir al desarrollo de edema vasogénico y daño cerebral secundario (Thiel y Audus, 2001). Estos datos vienen a poner de manifiesto que el NO proveniente de la eNOS, también puede ejercer efectos neurotóxicos ante fenómenos que cursan con déficit de oxígeno (Han et al., 2006).

Respecto a la nitración hay que indicar que los resultados presentados corresponden a los valores de nitración total, teniendo en cuenta todas las proteínas detectadas. Sin embargo, resultados previos en otras zonas cerebrales y los obtenidos por otros autores en diversas zonas del SNC (Serrano et al., 2006; Cañuelo et al., 2007; Peinado et al., 2014) parecen indicar que el análisis individual de las proteínas nitradas puede ofrecer una información más detallada que el estudio de la nitración total.

El factor de transcripción NF- κ B es inductor de la síntesis de iNOS aumentando los niveles de NO (Siles et al., 2002; Pannu y Singh, 2006; Blanco et al., 2010). Nuestros resultados siguen esta línea, ya que niveles aumentados de NF- κ B se corresponden con incrementos en la expresión de la iNOS y con aumento de la producción de NO tras 2 horas de reoxigenación (HH2h, D+HH2h) (Figura 15). Sin embargo, la expresión de NF- κ B ofrece unos valores elevados también en los puntos de 0h (HH0h, D+HH0h), de forma similar a lo observado al analizar los valores de expresión de las isoformas constitutivas. Respecto a esto, se ha descrito que no sólo la actividad de las iNOS, sino también la de la nNOS puede desencadenar la activación de NF- κ B (Cummins et al., 2006; Greco et al., 2011), dando lugar a un complejo mecanismo de retroalimentación. Sin embargo, el donador ISMN no parece ejercer un efecto directo sobre NF- κ B, aunque otros estudios sí han descrito que éste puede verse inhibido cuando se administran donadores de NO (Godínez-Rubí et al., 2013).

Bajo presiones bajas de oxígeno, HIF-1 α puede escapar de la prolin-hidroxilación y a la posterior degradación en el proteasoma y asociarse con HIF-1 β (Greer et al., 2012). Respecto a esto, aunque hay evidencias sólidas que sugieren que el NO contribuye a la estabilización de este factor a través de la inhibición de la prolin-hidroxilasas (PHD) (Greer et al., 2012), también se sabe que el NO puede ejercer el efecto opuesto, ya que varios donadores de NO reducen la estabilización de HIF-1 α y la activación transcripcional de genes aguas abajo (Huang et al., 1999; Berchner-Pfannschmidt et al., 2010), siendo esto último congruente con nuestros resultados que muestran disminución de la expresión de HIF-1 α después de 2 horas de reoxigenación en los animales no tratados. Por otro lado, el

donador parece inducir HIF-1 α inmediatamente tras la hipoxia (D+HH0h) (Figura 14). En este sentido, otros autores han demostrado que los donadores de NO son capaces de inhibir las enzimas PHD, bloqueando la hidroxilación de HIF-1 α , lo que conlleva a la acumulación del mismo y por lo tanto a un incremento de sus niveles (Yum et al., 2011). Esto pone de manifiesto la complejidad del mecanismo de regulación del factor de transcripción HIF-1 α .

En conjunto, los resultados del presente estudio muestra en primer lugar la respuesta del sistema NO/NOS tras la administración del ISMN en un modelo moderado de hipoxia. De este modo, nuestro trabajo permite cuestionar el papel clásico de las isoformas NOS en la respuesta frente a la hipoxia y destaca la complejidad del delicado equilibrio existente entre ellas.

6. CONCLUSIONES

- 1) El modelo de hipoxia estudiado se podría catalogar como moderado ya que afecta al estado redox de las células pero no desencadena una reactividad glial.
- 2) Debido a la complejidad de los mecanismos de acción involucrados, no se podría atribuir un papel meramente neurotóxico al NO proveniente de las isoformas nNOS e iNOS frente a un proceso hipóxico. Del mismo modo, el NO producido por la eNOS tras la hipoxia podría no ejercer una función exclusivamente neuroprotectora.
- 3) En este modelo de hipoxia, el donador de NO parece que altera la expresión de las isoformas nNOS y la iNOS, pero no la expresión de la eNOS.
- 4) No se puede atribuir un papel neuroprotector al donador ISMN en el modelo experimental propuesto.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agani FH, Pichiule P, Chavez JC and LaManna JC (2000). The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem*, 275: 35863-35867.

Agvald P, Adding LC, Artlich A, Persson MG and Gustafsson LE (2001). Mechanisms of nitric oxide generation from nitroglycerin and endogenous and sources during hypoxia in vivo. *Br J Pharmacol*, 135: 373-382.

Akatan F (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*, 75: 639-653.

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

Almeida A and Bolaños JP (2001). A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem*, 77: 676-690.

Aso T, Yamazaki K, Aigaki T and Kitajima S (2000). Drosophila von Hippel-Lindau tumor suppressor complex possesses E3 ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 276: 355-361.

Barer GR, Fairlie J, Slade JY, Ahmed S, Laude EA, Emery CJ, Thwaites-Bee D, Oakley AE, Barer DH and Kalara RN (2006). Effects of NOS inhibition on the cardiopulmonary system and brain microvascular markers after intermittent hypoxia in rats. *Brain Res*, 1098: 196-203.

Beckman JS and Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271:1424-1437.

Beckman KB and Ames BN (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, 272: 19633-19636.

Berchner-Pfannschmidt U, Tug S, Hu J, Reyes BD, Fandrey J and Kirsch M (2010). Role of N-acetyl-N-nitroso-tryptophan as nitric oxide donor in the modulation of HIF-1-dependent signaling. *Biol Chem*, 391: 533-540.

Berchner-Pfannschmidt U, Tug S, Kirsch M and Fandrey J (2010). Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cell Signal*, 22: 349-356.

Blanco S, Castro L, Hernández R, Del Moral ML, Pedrosa JA, Martínez-Lara E, Siles E and Peinado MA (2007). Age modulates the nitric oxide system response in the ischemic cerebellum. *Brain Res*, 1157: 66-73.

Blanco S, Molina FJ, Castro L, Del Moral ML, Hernández R, Jiménez A, Rus A, Martínez-Lara E, Siles E and Peinado MA (2010). Study of the nitric oxide system in the rat cerebellum during aging. *BMC Neuroscience*, 11: 78.

Bolaños JP and Almeida A (1999). Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta*, 1411: 415-436.

Bonicalzi ME, Groulx I, de Paulsen N and Lee S (2001). Role of exón 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, 276: 1407-1416.

Braman RS and Hendrix SA (1989). Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem*, 61: 2715-2718.

Bredt DS and Snyder SH (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 682-685.

Bruce-Keller AJ (1999). Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res*, 58: 191-201.

Bruick RK and McKnight SL (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 294: 1337-1340.

Buege JA and Aust SD (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52: 302-310.

Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostensfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH and Sofroniew MV (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23: 297-308.

Cañuelo A, Siles E, Martínez-Romero R, Peinado MA and Martínez-Lara E (2007). The nitric oxide system response to hypoxia/reoxygenation in the aged cerebral cortex. *Exp Gerontol*, 42: 1137-1145.

Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR and Butterfield DA (2003). Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 85: 1394-1401.

Castro L, Demicheli V, Tortora V and Radi R (2011). Mitochondrial protein tyrosine nitration. *Free Radic Res*, 45: 37-52.

Castro-Blanco S, Encinas JM, Serrano J, Alonso D, Gómez MB, Sánchez J, Ríos-Tejada F, Fernández-Vizarra P, Fernández AP, Martínez-Murillo R and Rodrigo J (2013). Expression of nitrergic system and protein nitration in adult rat brains submitted to acute hypobaric hypoxia. *Nitric Oxide*, 8: 182-201.

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC and Schumacker PT (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 11715-11720.

Chen Y and Swanson RA (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23: 137-149.

Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan PH, Koistinaho J and Swanson RA (2001). Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem*, 77: 1601-1610.

Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J and Taylor CT (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 18154-18159.

Dweik RA (2005). Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax*, 60: 265-267.

Encinas JM, Fernández AP, Salas E, Castro-Blanco S, Muñoz P, Rodrigo J and Serrano J (2004). Nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase after acute hypobaric hypoxia in the rat caudate putamen. *Exp Neurol*, 186: 33-45.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ and Ratcliffe PJ (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107: 43-53.

Erzurum SC, Ghosh S, Janocha AJ, Xu W, Bauer S, Bryan NS, Tejero J, Hemann C, Hille R, Stuehr DJ, Feelisch M and Beall CM (2007). Higher blood flow and circulating NO products offset high-altitude hypoxia among Tibetans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 17593-17598.

Fan PC, Ma HP, Jiang W, Li L, Ren J, Jing LL and Jia ZP (2015). Anti-hypoxia activity of the novel NO donor acetyl ferulic isosorbide mononitrate in acute high-altitude hypoxia mice. *Biol Pharm Bull*, 38: 1280-1289.

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB and Sofroniew MV (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24: 2143-2155.

Feng RF, Hu YY, Li WB, Liu HQ, Li QJ and Zhang M (2009). The role of NO resulted from neuronal nitric oxide synthase in the metabotropic glutamate receptor2/3 mediated-brain ischemic tolerance. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 25: 182-185.

Francis SH, Busch JL, Corbin JD and Sibley D (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*, 62: 525-563.

Freeman BA and Crapo JD (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem*, 256: 10986-10992.

Gibson CL, Coughlan TC and Murphy SP (2005). Glial nitric oxide and ischemia. *Glia*, 50: 417-426.

Godínez-Rubí M, Rojas-Mayorquín AE and Ortuño-Sahagún D (2013). Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid Med Cell Longev*, 2013: 297357-297373.

Goldberg MA, Dunning SP and Bunn HF (1998). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, 242: 1412-1415.

Görlach A (2009). Regulation of HIF-1 alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des*, 15: 3844-3852.

Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA and Ischiropoulos H (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: 262-268.

Greco R, Mangione AS, Amantea D, Bagetta G, Nappi G and Tassorelli C (2011). IkappaB-alpha expression following transient focal cerebral ischemia is modulated by nitric oxide. *Brain Res*, 1372: 145-151.

Greer SN, Metcalf JL, Wang Y and Ohh M (2012). The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J*, 31: 2448-2460.

Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U and Matías-Guiu J (2013). Astrocytes en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*, 30: 119-129.

Halliwell B (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18: 685-716.

Han F, Shirasaki Y and Fukunaga K (2006). Microsphere embolism-induced endothelial nitric oxide synthase expression mediates disruption of the blood-brain barrier in rat brain. *J Neurochem*, 99: 97-106.

Hanisch UK (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40: 140-155.

Hernández R, Blanco S, Peragón J, Pedrosa JA and Peinado MA (2013). Hypobaric hypoxia and reoxygenation induce proteomic profile changes in the rat brain cortex. *Neuromolecular Med*, 15: 82-94.

Hodkinson PD (2011). Acute exposure to altitude. *J R Army Med Corps*, 157: 85-91.

Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA and Bunn HF (1999). Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J Biol Chem*, 274: 9038-9044.

Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC and Moskowitz MA (1994). Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science*, 265: 1883-1885.

Iadecola C, Zhang F and Xu X (1995). Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol*, 268: 286-292.

Iadecola, C (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Neuroscience*, 20: 132-139.

Ito Y, Ohkubo T, Asano Y, Hattori K, Shimazu T, Yamazato M, Nagoya H, Kato Y and Araki N (2010). Nitric oxide production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and nNOSknockout mice. *Curr Neurovasc Res*, 7: 23-31.

Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC and Conaway JW (2000). Activation of HIF-1 alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 10430-10435.

Khan M, Jatana M, Elango C, Paintlia AS, Singh AK and Singh I (2006). Cerebrovascular protection by various nitric oxide donors in rats after experimental stroke. *Nitric Oxide*, 15: 114-124.

Khan M, Sekhon B, Giri S, Jatana M, Gilg AG, Ayasolla K, Elango C, Singh AK and Singh I (2005). S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25: 177-192.

Kleinert H, Pautz A, Linker K and Schwarz PM (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*, 500: 255-266.

Klotz LO, Schroeder P and Sies H (2002). Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic Biol Med*, 33: 737-743.

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H and Beckman JS (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*, 5: 834-842.

LaManna JC, Chavez JC and Pichiule P (2004). Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J Exp Biol*, 207: 3163-3169.

Lipton SA (1999). Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ*, 6: 943-951.

Liu J, García-Cárdena G and Sessa WC (1995). Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or-26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry*, 34: 12333-12340.

Lizasoain I and Moro MA (1998). Simultaneous measurement of mitochondrial function and NO. *Methods Mol Biol*, 100: 273-279.

López CJ, Qayyum I, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (2005). Effect of nitration on protein tyrosine phosphatase and protein phosphatase activity in neuronal cell membranes of newborn piglets. *Neurosci Lett*, 386: 78-81.

López-Ramos JC, Martínez-Romero R, Molina F, Cañuelo A, Martínez-Lara E, Siles E and Peinado MA (2005). Evidence of a decrease in nitric oxide-storage molecules following acute hypoxia and/or hypobaria, by means of chemiluminescence analysis. *Nitric Oxide*, 13: 62-67.

Lu N, Zhang Y, Li H and Gao Z (2010). Oxidative and nitrative modifications of alpha-enolase in cardiac proteins from diabetic rats. *Free Radic Biol Med*, 48: 873-881.

Masson N, William C, Maxwell PH, Pugh CW and Ratcliffe PJ (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*, 20: 5197-5206.

Mayer B and Hemmens B (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*, 22: 477-481.

Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J and Brune B (2003). Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell*, 14: 3470-3478.

Michiels C, Minet E, Michel G, Mottet D, Piret JP and Raes M (2001). HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life*, 52: 49-53.

Miller MR and Megson IL (2007). Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol*, 151: 305-321.

Mitchell BM, Cook LG, Danchuk S and Puschett JB (2007). Uncoupled endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens*, 20: 1297-1304.

Moncada S and Higgs EA (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eu J Clin Invest*, 21: 361-374.

Mucke L and Eddleston M (1993). Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *FASEB J*, 7: 1226-1232.

Na JI, Na JY, Choi WY, Lee MC, Park MS, Choi KH, Lee JK, Kim JK, Park JT and Kim HS (2015). The HIF-1 inhibitor YC-1 decreases reactive astrocyte formation in a rodent ischemia model. *Am J Transl Res*, 7: 751-760.

Nandagopal K, Dawson TM and Dawson VL (2001). Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*, 297: 474-478.

Oelze M, Knorr M, Kröller-Schön S, Kossmann S, Gottschlich A, Rummeler R, Schuff A, Daub S, Doppler C, Kleinert H, Gori T, Daiber A and Münzel T (2013). Chronic therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction, oxidative stress, and a marked increase in vascular endothelin-1 expression. *Eu Heart J*, 34: 3206-3216.

Pacher P, Beckman JS and Liaudet L (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*, 87: 315-424.

Paixao J, Dinis TC and Almeida LM (2011). Dietary anthocyanins protect endothelial cells against peroxynitrite-induced mitochondrial apoptosis pathway and Bax nuclear translocation: an in vitro approach. *Apoptosis*, 16: 976-989.

Palmer LA and Johns RA (1998). Hypoxia upregulates inducible (Type I) nitric oxide synthase in an HIF-1 dependent manner in rat pulmonary microvascular but not aortic smooth muscle cells. *Chest*, 114: 33-34.

Pannu R and Singh I (2006). Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem Int*, 49: 170-182.

Peinado MA, Del Moral ML, Martínez-Lara E, Siles E, Hernández R; López JC, Blanco S, Cañuelo A, Rodrigo J and Esteban FJ (2003). Role of nitric oxide system in the aged brain. *Recent Res Devel Biochem*, 4: 181-192.

Peinado MA, Hernández R, Peragón J, Ovelleiro D, Pedrosa JA and Blanco S (2014). Proteomic characterization of nitrated cell targets after hypobaric hypoxia and reoxygenation in rat brain. *J Proteomics*, 109: 309-321.

Pekny M and Nilsson M (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50: 427-434.

Pekny M and Pekna M (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*, 204: 428-437.

Pekny M, Wilhelmsson U and Pekna M (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*, 565: 30-38.

Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V and Johnson RS (2005). HIF-1 alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest*, 115: 1806-1815.

Pryor WA and Squadrito GL (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*, 268: 699-722.

Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA and Martínez A (2005). The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med*, 39: 26-50.

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP and Welty DF (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16: 675-686.

Sarkar S, Banerjee PK and Selvamurthy W (2003). High altitude hypoxia: an intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Mol Cell Biochem*, 253: 287-305.

Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3: 721-732.

Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, and Antonarakis SE (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5680-5684.

Serrano J, Encinas JM, Fernández AP, Rodrigo J and Martínez A (2006). Effects of acute hypobaric hypoxia on the nitric oxide system of the rat cerebral cortex: Protective role of nitric oxide inhibitors. *Neuroscience*, 142: 799-808.

Serrano J, Encinas JM, Salas E, Fernández AP, Castro-Blanco S, Fernández-Vizarra P, Bentura ML and Rodrigo J (2003). Hypobaric hypoxia modifies constitutive nitric oxide synthase activity and protein nitration in the rat cerebellum. *Brain Res*, 976:109-119.

Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA and Murphy TH (2003). Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci*, 23: 3394-3406.

Siles E, Martínez-Lara E, Cañuelo A, Sánchez M, Hernández R, López-Ramos JC, Del Moral ML, Esteban FJ, Blanco S, Pedrosa JA, Rodrigo J and Peinado MA (2002). Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. *Brain Res*, 956: 385-392.

Singh N, Sharma G, Mishra V and Raghubir R (2012). Hypoxia Inducible Factor-1: Its potential role in cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol*, 32: 491-507.

Streit WJ (1996). The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology*, 17: 671-678.

Swanson RA, Ying W and Kauppinen TM (2004). Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*, 4: 193-205.

Taylor CT and Cummins EP (2009). The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Ann N Y Acad Sci*, 1177: 178-184.

Terpolilli NA, Moskowitz MA and Plesnila N (2012). Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32: 1332-1346.

Thiel VE and Audus KL (2001). Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal*, 3:273-278.

Thompson JW, Narayanan SV and Pérez-Pinzón MA (2012). Redox signaling pathways involved in neuronal ischemic preconditioning. *Curr Neuropharmacol*, 10: 354-369.

Trojanowski JQ and Lee VM (2003). Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies are brain amyloidoses. *Ann N Y Acad Sci*, 991: 107-110.

Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A and Johnson JA (2008). Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 28: 13574-13581.

Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S and Sofoniew MV (2009) Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci*, 29: 11511-11522.

Uttenthal LO, Alonso D, Fernández AP, Campbell RO, Moro MA, Leza JC, Lizasoain I, Esteban FJ, Barroso JB, Valderrama R, Pedrosa JA, Peinado MA, Serrano J, Richart A, Bentura ML, Santacana M, Martínez-Murillo R and Rodrigo J (1998). Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc Res Tech*, 43: 75-88.

Wainwright MS, Grundhoefer D, Sharma S and Black SM (2007). A nitric oxide donor reduces brain injury and enhances recovery of cerebral blood flow after hypoxia-ischemia in the newborn rat. *Neurosci Lett*, 415: 124-129.

Wang GL and Semenza GL (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 4304-4308.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA and Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514.

West JB (2003). Survival following severe acute hypoxia and cold. *High Alt Med Biol*, 4: 485-487.

Willmot MR and Bath PMW (2003). The potential of nitric oxide therapeutics in stroke. *Expert Opin Investig Drugs*, 12: 455-470.

Yasinska IM and Sumbayev VV (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett*, 549: 105-109.

Yu HM, Xu J, Li C, Zhou C, Zhang F, Han D and Zhang GY (2008). Coupling between neuronal nitric oxide synthase and glutamate receptor 6-mediated c-Jun N-terminal kinase signaling pathway via S-nitrosylation contributes to ischemia neuronal death. *Neuroscience*, 155: 1120-1132.

Yum S, Choi J, Hong S, Park MH, Lee J, Ha NC and Jung Y (2011). Hyperoxia attenuates the inhibitory effect of nitric oxide donors on HIF prolyl-4-hydroxylase-2: Implication on discriminative effect of nitric oxide on HIF prolyl-4-hydroxylase-2 and collagen prolyl-4-hydroxylase. *Biochem Pharmacol*, 82: 485-90.

Zhang RL, Zhang ZG and Chopp M (2013). Targeting nitric oxide in the subacute restorative treatment of ischemic stroke. *Expert Opin Investig Drugs*, 22: 843-851.

Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS and Forstermann U (1993). Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 24: 2016-2021.

ANEXO I: RESUMEN DE LOS CURSOS DE MÁSTER

Seguridad en el Laboratorio y Experimentación Animal

Esta asignatura proporciona los conocimientos necesarios sobre las normas de seguridad básicas para trabajar en un laboratorio. Para ello se proporcionó información acerca de los diferentes riesgos a los que un científico puede enfrentarse en el laboratorio, ya sean físicos, químicos o biológicos, del mismo modo que las herramientas y medidas necesarias para su prevención. Para no caer en el desconocimiento o en una posible negligencia, también se revisó la normativa y legislación actual con la cual se rige tanto la seguridad en el puesto de trabajo como aquella que corresponde a la experimentación con seres vivos, ya sea para el trabajo con animales o con seres humanos.

Proteómica y Dinámica de Proteínas

Esta asignatura tiene como punto principal el análisis y el estudio de los aspectos más importantes de proteínas. Para ello se ha profundizado en los procesos que las mismas llevan a cabo tales como plegamiento, recambio, modificaciones post-traduccionales, degradación, maduración, transporte e interacción con diferentes moléculas. Del mismo modo, se estudiaron los principios, la metodología, los equipos y software habituales en esta disciplina y sus aplicaciones como herramienta fundamental y en auge de la investigación básica, la biotecnología y la biomedicina.

Genómica, Bioinformática y Biología de sistemas

Con el avance de las disciplinas conocidas como “-ómicas”, las herramientas bioinformáticas se han convertido en un elemento esencial para la investigación debido a su utilidad para analizar y almacenar información relevante sobre genes, proteínas, redes metabólicas... En relación con esto, en dicha asignatura se utilizaron las principales técnicas de genómica estructural y genómica funcional a través de la bioinformática.

El curso de bioinformática aportó una visión generalizada sobre algunas de las aplicaciones y bases de datos más utilizadas actualmente en el ámbito de la investigación. También se realizaron estudios de asociación genética, se conocieron las mejores estrategias para identificar genes candidato y estudiaron datos de expresión génica.

En esta asignatura, también se revisaron los conceptos básicos y generales necesarios para el diseño, la modelización y el análisis de estudios experimentales en biomedicina a partir de casos prácticos.

Regulación de la Expresión Génica y Desarrollo.

En esta asignatura se profundizó en primer lugar en los procesos de transcripción y traducción de ADN, con una especial mención a los diferentes tipos de ARN polimerasas y sus características. En segundo lugar se realizó sin embargo un estudio de los mecanismos de regulación específica de determinados genes como PITX2, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Mientras que por último se llevó a cabo un análisis del papel que tiene el ADN repetitivo y los elementos móviles en la regulación de diferentes genes en el organismo.

Microscopia Avanzada y Análisis de Imagen

En este curso se estudiaron los diferentes fundamentos para el manejo de distintos microscopios, ópticos y electrónicos, y su uso en los diferentes campos de la investigación. Para ello también fue necesario como conocer como hay que tratar las diferentes muestras biológicas en función del microscopio de destino. Por otro lado, también se estudiaron los métodos más habituales para la captura de imágenes al microscopio y el posterior tratamiento digital con las aplicaciones informáticas necesarias.

Cultivos Celulares, Diferenciación y Terapia Celular

En esta asignatura se conocieron las técnicas relacionadas con el uso de cultivos celulares animales, así como sus aplicaciones en el campo de la investigación biomédica y biotecnológica, y las ventajas y desventajas de su uso. También se estudió la importancia del uso de células cultivadas en la investigación y su utilidad en la clínica y la industria. Además de esto se conocieron los procesos de diferenciación “in vitro” de células madre embrionarias, que actualmente son de interés e importancia notoria.

Dado que el curso fue en gran medida práctico, destacar que llevaron a cabo cultivos con diferentes líneas celulares, en la cuales se estudió por un lado el ciclo celular y por otro, el índice de proliferación celular tras la transfección celular.

Citogenética Molecular y Clínica

En esta asignatura se estudió la organización de los cromosomas así como las técnicas habituales para el estudio de los cromosomas metafásicos. Por otro lado también se analizaron los diferentes tipos de mutaciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales con el fin de reconocer las alteraciones presentes en un cariotipo de forma más frecuente entrando así en el campo de la citogenética humana y clínica.

Biotecnología Diagnóstica

Esta asignatura centra su contenido en el diagnóstico de diferentes patologías valiéndose de los avances biotecnológicos más novedosos. Estas técnicas se usan rutinariamente para la detección de mutaciones, de marcadores que indiquen la presencia de alguna enfermedad o incluso para el marcaje de poblaciones celulares concretas. Además, con el desarrollo de poderosas técnicas de secuenciación masiva se están llevando a cabo proyectos cuyo fin es definir los genes implicados en diferentes patologías con gran influencia en la sociedad y la respuesta del organismo a los diferentes fármacos que puedan usarse como tratamiento, dándole un gran importancia al análisis genético como técnica para el diagnóstico.

Según esto, en esta asignatura hemos estudiado las técnicas moleculares de última generación aplicadas en este nuevo tipo de diagnóstico, tales como la PCR en tiempo real, secuenciación masiva de ADN, genotipado de SNPs, microarrays, CGH y microRNAs, en función de lo que se busque en cada momento, sin dejar de lado las técnicas tradicionales de citología e histología molecular, que se siguen usando habitualmente en los laboratorios clínicos de manera combinada con las técnicas de biología molecular.

Estrés Celular

En esta asignatura se realizó una revisión de forma integrada de los principales mecanismos implicados en los procesos de defensa celular, los cuales están mediados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Se estudiaron los procesos metabólicos en los cuales se conoce que están implicadas estas especies reactivas o radicales libres. Actualmente también se sabe que estos radicales libres son los principales responsables de algunos mecanismos de daño molecular tanto en animales y plantas como en seres humanos, participando en diferentes patologías y en las situaciones de estrés. Del mismo modo, también se estudiaron los sistemas de defensa a través de antioxidantes que tienen lugar en los tejidos afectados por el estrés celular.

Patología Molecular y Celular

En esta asignatura, sabiendo que el desarrollo de la biología molecular ha ayudado a conocer el origen de ciertas enfermedades, se nos ha dado a conocer la etiología molecular de algunas patologías tales como el cáncer y la hipoxia, así como dicha etiología se usa para el diagnóstico y tratamiento de las mismas.

También se estudió que es la terapia génica, los vectores usados para el desarrollo de la misma y las principales enfermedades tratadas, donde encontramos las distrofias musculares, la infección por VIH-1 y de nuevo el cáncer debido a su actual importancia. Además se puso de manifiesto la aplicación terapéutica que tiene en este momento el uso de las células IPS en este tipo de terapia.

Biología Molecular y Celular del Envejecimiento

En esta asignatura se dio a conocer el envejecimiento como un proceso multifactorial mediante el cual se sufre un deterioro progresivo en la capacidad para mantener la homeostasis, para a partir de ahí estudiar los mecanismos moleculares y las bases genéticas que están implicados en el mismo. Al mismo tiempo se estudiaron diferentes patologías neurodegenerativas asociadas al envejecimiento tales como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, observando los eventos fisiológicos y moleculares que las caracterizan, los modelos animales usados para su estudio y las posibles terapias con células madre para su tratamiento.

También se estudiaron las principales causas que desencadenan el envejecimiento, la degeneración y la muerte celular, y en relación con esto como está implicado el estrés oxidativo y las especies reactivas de nitrógeno en este proceso. Por último, se analizó el papel de los sistemas antioxidantes y su implicación en el proceso de envejecimiento.

Neuroendocrinología.

En esta asignatura se estudiaron las bases funcionales de los dos principales sistemas de comunicación interna que son el sistema nervioso y el sistema endocrino, y cómo ambos interactúan para mantener la homeostasis. Para ello se vieron las generalidades correspondientes a ambos sistemas, de forma que posteriormente se pudo estudiar la biosíntesis, liberación, los tipos de receptores y los mecanismos de acción de las neurohormonas. También se conocieron los diferentes ritmos biológicos en relación con la

asimetría neuroendocrina. Posteriormente se estudió concretamente el sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-hipofisis, responsable de la liberación de distintos tipos hormonales.

Por otro lado, se vio el control que tiene el sistema neuroendocrino sobre la ingesta de alimentos y el balance energético, lo cual está también implicado directamente sobre el envejecimiento y la inmunología.

ANEXO II: CURRÍCULUM VITAE

Almudena PÉREZ CAMACHO

23 años

Av. Madrid nº50, 3ºB, Jaén-España

Tel: 627671742

apc00034@red.ujaen.es // Almupc.14@gmail.com

ESTUDIOS

2008 Educación Secundaria Obligatoria

Bailén-España *Colegio Sagrado Corazón*

2010 Bachillerato

Jaén-España *Colegio Santa María de la Capilla-HH Maristas.*

2014 Grado en Biología

Jaén-España *Universidad de Jaén*

2015 Máster en Biotecnología y Biomedicina

Jaén-España *Universidad de Jaén*

Programas manejados: Paquete Microsoft Office, Image J, Adobe Photoshop CS6, Microsoft ICE, Ecollumina, Statgraphics, Mathematica, TotalLab v1.11, Bases de datos científicas.

Movilidad: Permiso de circulación B2.

IDIOMAS

Español: Natal

Inglés: Nivel B1 – Preliminary English Test, Cambridge English.

Nivel B2

FORMACIONES ADICIONALES E INTERESES

Cursos:

- Manejo y Mantenimiento de Mamíferos Marinos en Selwo Marina Delfinarium (2014).
- Monitor de Tiempo Libre y Animador Sociocultural. Especialidad Monitor de grupos juveniles. Escuela Champagnat (2014).

Proyectos Humanitarios:

- Voluntaria en el Colegio Santa María de la Capilla, HH. Maristas (desde 2010 hasta la actualidad).
- Voluntaria en la iniciativa solidaria Con Otra Marcha, Jaén (desde 2010 hasta la actualidad).
- Voluntaria en la planta de pediatría del Hospital Materno-Infantil, Jaén (2008-2009).
- Voluntaria en la residencia de mayores FOAM, Jaén (2010).
- Voluntaria en el Dispositivo de Inmigrantes de Cáritas, Jaén (2011-2014).