



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**ROL DEL COMPLEJO FORMADO POR EL
INTERCAMBIADOR $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3 Y LA ANHIDRASA
CARBÓNICA XIV EN PROCESOS PATOLÓGICOS
CARDÍACOS**

Lorena Alejandra Vargas

Dr. Bernardo Víctor Álvarez
Director

Prof. Dr. Alejandro Rebolledo
Asesor Científico

2014

AGRADECIMIENTOS

La lista de agradecimientos sería demasiado larga si nombrara a cada una de las personas que han dejado algo de ellos para que hoy llegue hasta este lugar. Voy a tratar de mencionar a algunos de ellos de manera resumida.

A Evangelina, mi amada hija, le dedico este trabajo. Porque mami no está con vos casi doce horas al día, pero sé que cuando llego a casa te voy a encontrar. Tu sonrisa es suficiente para mi felicidad. Espero que sea un buen ejemplo para vos, que aprendas que podés seguir tus sueños, que siempre va a haber gente a tu lado dispuesta a ayudarte, esas personas que parecen como angelitos puestos por Dios, como las que yo nombro aquí, para sostenerte, para abrigarte, para dibujarte un día de sol, para prestarte sus alas para volar.

A mi querido papá, a quien extraño cada día de mi vida desde que se fue. Gracias porque tu vida fue la cuna de mi vida. Porque diste todo para que yo cumpliera mis anhelos y mis sueños. Porque si estuvieras vivo, en este momento sé que vendrías a darme un beso y una palmadita para que siga adelante. Desde esos pequeños detalles hasta los hechos más grandes, quedan guardados en mi corazón y dieron, dan y seguirán dando sus frutos. Gracias papá porque viste lo mejor que había en mi...

A mi mamá, la luz de mis ojos, le agradezco y dedico este trabajo. El cierre de una etapa. A ella, mi combustible. Ella que dice admirarme porque voy en busca de mis objetivos, yo también la admiro porque su capacidad de amar es increíble. Es ese amor, a través de sus enseñanzas, de sus correcciones, de su compañía, de su incesante ayuda, que me impulsa cada día para que siga caminando.

A mis hermanas, Daniela y Yanina, y a mi abuela Rosa les agradezco porque también me han ayudado a que lleve a cabo este trabajo de tesis. Su incondicional ayuda desde que comencé a recorrer este camino ha sido esencial para mí. Gracias por su paciencia y compañía.

Gracias a mis amigas y ex compañeras de la facultad, Silvana Arroyo, Valeria Cappa, Cintia Lobo, Érica Pereyra, Débora Colman, Cecilia Mourellos y Marina Acosta. Cuánto extraño nuestros largos días de facultad junto a Uds. Si bien ya no nos vemos tan a menudo, que cada una tiene nuevas responsabilidades y ocupaciones, sabemos que estamos juntas. Uds estuvieron presentes desde aquellos días intensos de estudio, pasando por esa etapa tan difícil de mi vida y hoy siguen estando con su alegría, su apoyo, su confianza, su compasión, su dulzura. Las amo con todo mi corazón. Han trabajado tanto junto a mi que esta tesis también es parte de Uds.

Gracias a quien me abrió las puertas de este camino, mi Director, Dr. Bernardo Álvarez. Agradezco su plena confianza desde el día que me entrevistó, por confiar en mí, en

mi capacidad, en mi persona. Siempre voy a tener presente que desde el momento en que me aceptó como becaria, dos meses antes de dar a luz a mi hija, demostró su calidad humana. Su vocación por la ciencia me ha inspirado a querer ser mejor profesional cada día. Su paciencia, tranquilidad y confianza me han permitido disfrutar de este camino. Si tuviera que darle una explicación mística a la presencia de Bernardo en mi vida laboral, diría que fue mi papá, allá en el cielo, quien le pidió a Dios que él fuera mi director. Con carácter sencillo, pasión por la ciencia, amor por su familia.

Dios siempre se las ingenia para poner a mi lado a una persona con cualidades de mamá para que me acompañe. En mi etapa como becaria doctoral fue la Dra. Verónica Correa. Gracias Vero, por ayudarme en todo. Por estar ahí, como mi guardaespaldas, cuidando mi camino, corriendo las piedras para que no tropezara. Un gracias de todo corazón para vos.

A Monica Rando, Jéscica Rodríguez, Gisel Díaz y Omar Velez Rueda, infinitamente gracias porque bien saben que mi primer tiempo en el laboratorio no fue nada fácil debido a problemas personales. Uds. me han escuchado, acompañado, aconsejado, abrazado, animado. Gracias por ayudarme a avanzar, por ayudarme a no caer, por haber sido esos rayitos de sol que en invierno entibian el alma. Son personas realmente valiosas, agradezco semejante tesoro en mi vida.

A mis compañeros de laboratorio: Patricio Morgan, Mariela Nolly, Leandro Somesse, María Soledad Brea, Gabriela Mazzochi, Luciana Sapia, Ezequiel Harnichar, Mara De Martino, Manuela Santalla, Paola Ferrero, Julieta Palomeque. Gracias porque entre experimentos, análisis de datos, papers, mates y ocurrencias hacen que los días sean hermosos. Completamente agradecida por el privilegio de tener que compartir mis días laborales con personas tan maravillosas como uds. Hacen que cada día tenga un matiz especial. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme, por su compañerismo, por sus risas.

Agradezco a la Dra. Alicia Mattizzi y al Dr. Martin Vila Petroff por permitirme desarrollar mi trabajo de tesis en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares.

Al Prof. Dr. Alejandro Rebolledo, por aceptar ser mi Asesor Académico.

A los integrantes del CIC, gracias a cada uno de ellos por su predisposición.

Y desde el comienzo hasta el final, a mi amado Dios le doy infinitas gracias. Porque fue Él quien ha puesto cada una de estas personas en mi vida, porque me ha amado, ayudado, enseñado, recibido en cada uno de ellos. A Dios que da más de lo que pedimos o imaginamos, hoy cumple una vez más Sus Promesas en mi vida. Gracias por la Tierra que me has confiado.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	7
<i>Importancia de la Regulación del pH intracelular en el Corazón</i>	8
<i>Transportadores de HCO₃⁻ en el Corazón.....</i>	8
<i>Intercambiadores de Cl⁻/HCO₃⁻ en el Corazón.....</i>	10
<i>Intercambiador de Cl⁻/HCO₃⁻ AE3.....</i>	12
<i>Anhidrasas Carbónicas.....</i>	14
<i>Anhidrasa Carbónica XIV.....</i>	16
<i>Anhidrasas Carbónicas en el Corazón.....</i>	17
<i>Metabolones de Transporte Iónico.....</i>	18
<i>Algunas Condiciones Fisiopatológicas Cardiovasculares.....</i>	19
Hipertensión Arterial.....	19
Isquemia/Reperusión Miocárdica.....	20
Insuficiencia Cardíaca.....	21
Hipertrofia Cardíaca.....	21
Activación de la vía de señalización intracelular iniciada por estimulación de receptores acoplados a proteína G en la respuesta hipertrófica.....	22
<i>Participación de los AE en Condiciones Fisiopatológicas.....</i>	25
<i>Anhidrasas Carbónicas e Hipertrofia Cardíaca Patológica.....</i>	27
<i>Metabolones de Transporte Iónico e Hipertrofia.....</i>	28
OBJETIVOS.....	30
<i>Hipótesis de Trabajo.....</i>	31
<i>Objetivo General.....</i>	31
<i>Objetivos Específicos.....</i>	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Animales.....	34
Extracción de Corazones.....	34
Preparación de Lisados de Corazón de Rata y Ratón.....	35
Células HEK 293.....	35
Preparación de Lisados de Células HEK 293.....	35
Transfección de Células HEK 293.....	36
Aislamiento de Cardiomiocitos de Ratas.....	37
Determinación de pH intracelular en Cardiomiocitos de Ratas.....	38
Determinación del pH intracelular en Células HEK 293.....	39
Aislamiento de Membranas Celulares de Corazón de Ratas.....	40
Co-inmunoprecipitación.....	41
Doble Inmuno-marcación de Miocitos Cardíacos de Ratón.....	41
Análisis de Imágenes por Microscopio Confocal.....	42
Determinación de la Concentración de Proteínas.....	43
Inmunodetección (Western Blot).....	43
RESULTADOS.....	46
Asociación Física del Intercambiador Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ AE3 y la ACXIV.....	47
Expresión y Co-localización de AE3 y ACXIV en Secciones de Ventrículo Izquierdo y en Cardiomiocitos Aislados de Ratones Adultos.....	53
Expresión de Anhidrasas Carbónicas en el Miocardio Hipertrófico.....	57
Rol Funcional del Complejo formado por AE3/ACXIV en el Miocardio de SHR.....	59
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	68
Rol de AE3, ACXIV y el Complejo AE3/ACXIV en Procesos Patológicos Cardíacos.....	75
Conclusiones.....	77
ABREVIATURAS.....	80

BIBLIOGRAFÍA..... 81

INTRODUCCIÓN

Importancia de la Regulación del pH intracelular en el Corazón

El metabolismo de las células genera ácidos intracelulares. El CO_2 , el cual es producido por el metabolismo aeróbico, se hidrata formando HCO_3^- y liberando H^+ . Los cuerpos cetónicos, producidos por el metabolismo anaeróbico a partir de la ruptura de ácidos grasos y desaminación de aminoácidos, son otra fuente de acidez (Stryer 2002; Stryer 2002). Debido a esta producción constante de ácidos, las células poseen diversos mecanismos reguladores para mantener el pH intracelular (pHi) en valores adecuados.

Los cambios en el pHi del miocardio pueden afectar una variedad de funciones celulares básicas, tales como la conductancia iónica (Kohlhardt, Haap et al. 1976; Fry and Poole-Wilson 1981), rutas metabólicas (Schaffer, Safer et al. 1978), la homeostasis del Ca^{+2} (Orchard and Kentish 1990; Kusuoka, Backx et al. 1993) y la contractilidad que se evidencia por cambios en la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{+2} (Fabiato and Fabiato 1978). Por lo tanto, el corazón es un órgano que requiere un estricto control del pHi para su correcto funcionamiento contráctil y eléctrico. Esta regulación del pHi depende del balance entre transportadores que permiten la carga ácida y transportadores que expulsan la acidez al medio extracelular. En miocitos ventriculares de mamíferos han sido identificados al menos 5 tipos de transportadores de membrana que participan en la regulación del pHi (Poole, Halestrap et al. 1989; Lagadic-Gossmann, Buckler et al. 1992; Xu and Spitzer 1994; Sun, Leem et al. 1996; Leem, Lagadic-Gossmann et al. 1999): el intercambiador de Na^+/H^+ (NHE, del inglés Na^+/H^+ Exchanger) y el co-transportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC, del inglés $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter) son los mecanismos alcalinizantes y los intercambiadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (CBE, del inglés $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Exchanger o AE, del inglés Anion Exchanger) y de Cl^-/OH^- (CHE, del inglés Cl^-/OH^- Exchanger) son los mecanismos acidificantes (Dart and Vaughan-Jones 1992; Karmazyn and Moffat 1993). El co-transportador de lactato (MCT, del inglés Mono-Carboxilate Transporter) puede operar en modo de eflujo o influjo de protones dependiendo de los niveles de concentración de oxígeno y el gradiente de protones (de Hemptinne and Marrannes 1979; Poole, Halestrap et al. 1989). En condiciones de hipoxia, cuando los niveles de lactato son altos, la influencia del MCT sobre el pHi se torna significativa (Vandenberg, Metcalfe et al. 1993; Halestrap, Wang et al. 1997).

Transportadores de HCO_3^- en el Corazón

El HCO_3^- es el principal buffer de nuestro cuerpo y, en su forma deshidratada como CO_2 , el principal producto primario de desecho del metabolismo celular. El movimiento de

INTRODUCCIÓN

base, en forma de HCO_3^- , hacia adentro o fuera de la célula produciría un cambio en el pH_i hacia la alcalinización o acidificación, respectivamente. En el corazón, el transporte de HCO_3^- es responsable de al menos el 50% de la regulación de pH_i (Vandenberg, Metcalfe et al. 1993; Vandenberg, Metcalfe et al. 1994) y es requerido, además, para el metabolismo del CO_2 y el control del volumen celular. Las moléculas de HCO_3^- son impermeables a la membrana, por ello, para regular el flujo de HCO_3^- a través de la membrana se requieren transportadores de HCO_3^- . De esta manera, las células controlan la concentración y el movimiento de HCO_3^- a través de la membrana plasmática mediante proteínas transportadoras de HCO_3^- y anhidrasas carbónicas (AC) que catalizan rápidamente el movimiento transmembrana de HCO_3^- (Sterling and Casey 2002; Romero, Fulton et al. 2004; Casey 2006).

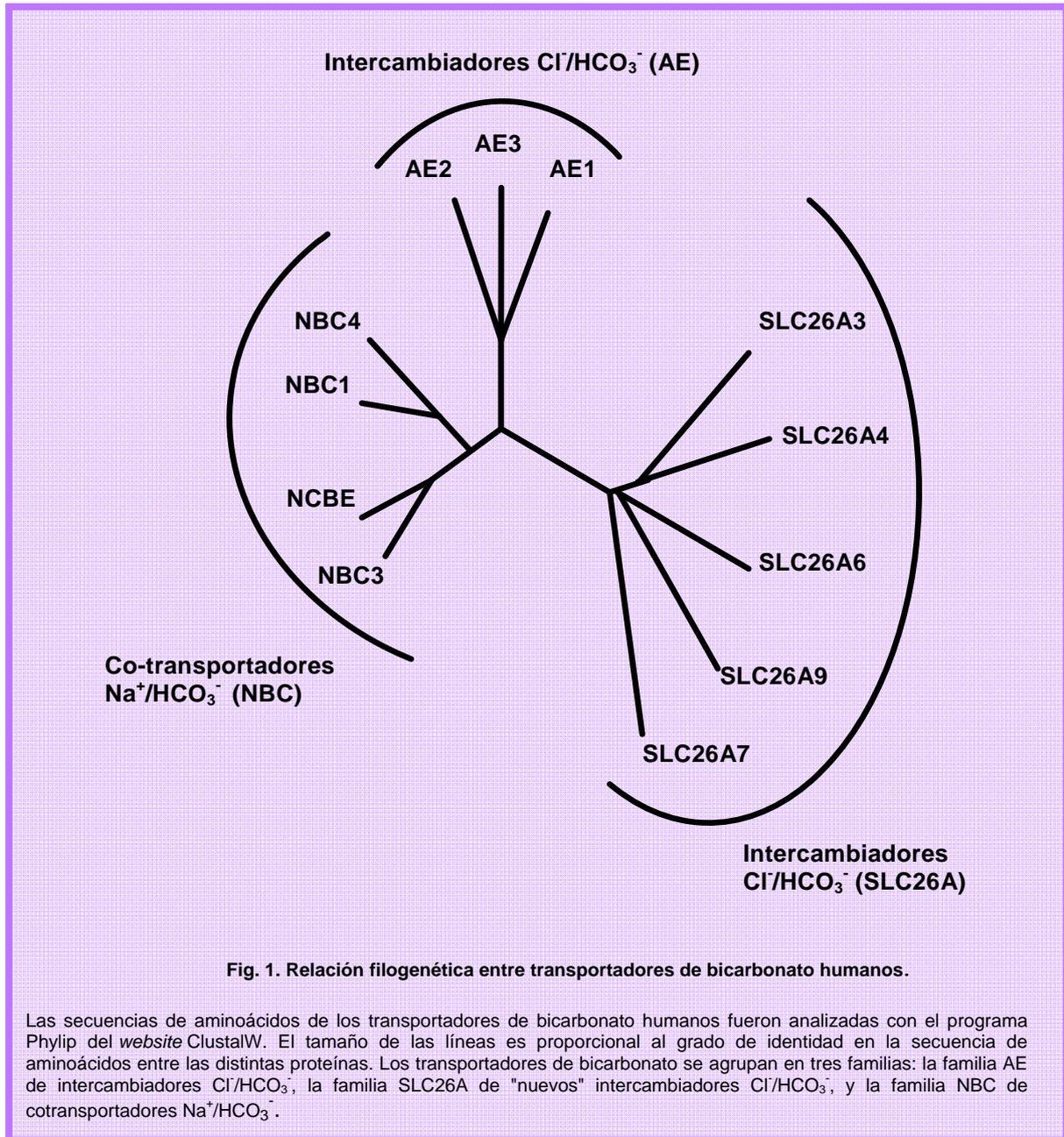
Los transportadores de HCO_3^- son esenciales en un amplio rango de condiciones fisiológicas y fisiopatológicas en el corazón como la hipertrofia cardíaca (Cingolani 1999; Alvarez, Fujinaga et al. 2001), hipertensión (Perez, Alvarez et al. 1995), insuficiencia cardíaca (IC) (Al Moamen, Prasad et al. 2011); (Khandoudi, Albadine et al. 2001; Al Moamen, Prasad et al.) y el daño causado durante procesos de isquemia/reperfusión (Vandenberg, Metcalfe et al. 1993; Vandenberg, Metcalfe et al. 1993).

Existen 13 genes identificados en mamíferos como proteínas transportadoras de HCO_3^- las cuales comparten una cierta identidad en sus secuencias aminoacídicas. De acuerdo a su árbol filogenético, los transportadores de HCO_3^- se agrupan en tres familias (**Fig. 1**) comprendidas por:

- Intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ independientes de Na^+ (AE)
- Transportadores de HCO_3^- acoplados al Na^+ (NBC)
- Transportadores de HCO_3^- noveles y miembros de la familia SLC26A.

El mecanismo por el cual estas proteínas transportan HCO_3^- , su localización celular y subcelular y los procesos que regulan el transporte difieren en gran medida (Sterling and Casey 2002). Se ha sugerido un papel preponderante para algunos de estos transportadores de HCO_3^- en el miocardio y para su mecanismo regulador, las AC.

INTRODUCCIÓN



Intercambiadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en el Corazón

Los AE catalizan el intercambio electroneuro, a través de la membrana, de una molécula de Cl^- por una molécula de HCO_3^- . Esta familia está compuesta por AE1 (también conocido como SLC4A1), AE2 (o SLC4A2) y AE3 (o SLC4A3) (Kopito 1990) y comparten aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos de sus dominios transmembrana. Aunque se encuentran en diferentes tejidos, la familia de los AE comparte, además, un patrón estructural de tres dominios (Steck, Ramos et al. 1976):

INTRODUCCIÓN

- Un dominio citoplasmático amino-terminal (Nt) de 400 a 700 aminoácidos. Este dominio participa en interacciones proteína-proteína en el citosol, une el citoesqueleto con la membrana y posee sitios de unión para enzimas glicolíticas (Reithmeier, Lieberman et al. 1989).
- Un dominio carboxi-terminal (Ct) de 500 aminoácidos que posee 12 a 14 segmentos transmembrana (Popov, Tam et al. 1997) y es el responsable de la función de intercambio.
- Una cola Ct citosólica que posee de 30 a 100 aminoácidos. Puede considerarse como un tercer dominio ya que se pliega de manera independiente y posee una función separable. La cola Ct es el dominio que contiene el sitio de unión para la AC citosólica ACII, lo cual forma parte de las bases para el Metabolón de Transporte de HCO_3^- (MTB) intracelular que se explicará con mayor profundidad más adelante.

El primer AE fue identificado en eritrocitos (Cabantchik and Rothstein 1974), donde facilita la eliminación de CO_2 como producto de desecho celular del cuerpo (Sterling and Casey 2002). Actualmente, esta glicoproteína de 911 aminoácidos (Reithmeier, Lieberman et al. 1989) es conocida como AE1. El AE1 full length ha sido detectado en corazón (Kudrycki, Newman et al. 1990) y, también, se ha reportado una isoforma truncada (Puceat, Korichneva et al. 1995).

En la familia de los AE, AE2 es la isoforma más ampliamente expresada, se encuentra en casi todos los tejidos del cuerpo humano (Wang, Schultheis et al. 1996), incluido el corazón, al menos a nivel del ARN mensajero (ARNm) (Kudrycki, Newman et al. 1990).

El intercambiador AE3, objeto de estudio del presente trabajo de tesis, será explicado con mayor detenimiento en el siguiente apartado.

Los intercambiadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ pertenecientes a la familia SLC26A han sido identificados más recientemente. Éstos poseen sólo un 10% de identidad con los AE. El intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ más abundante en miocitos es miembro de esta familia, el SLC26A6 (Alvarez, Kieller et al. 2004) y podría transportar, además, usando distintos mecanismos, otros iones tales como sulfato, formato, oxalato, nitrato y yoduro (Mount and Romero 2004). El intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y Cl^-/OH^- mediado por SLC26A6 es el más relevante a nivel fisiológico (Ko, Shcheynikov et al. 2002; Alvarez, Kieller et al. 2004; Chernova, Jiang et al. 2005). La estequiometría del transporte de aniones por SLC26A6 es controversial. Algunos estudios han reportado que, en ratones, el SLC26A6 facilita el intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, por un mecanismo electrogénico (1 molécula de Cl^- por 2 moléculas de HCO_3^-) (Ko, Shcheynikov et al. 2002; Xie, Welch et al. 2002); mientras que

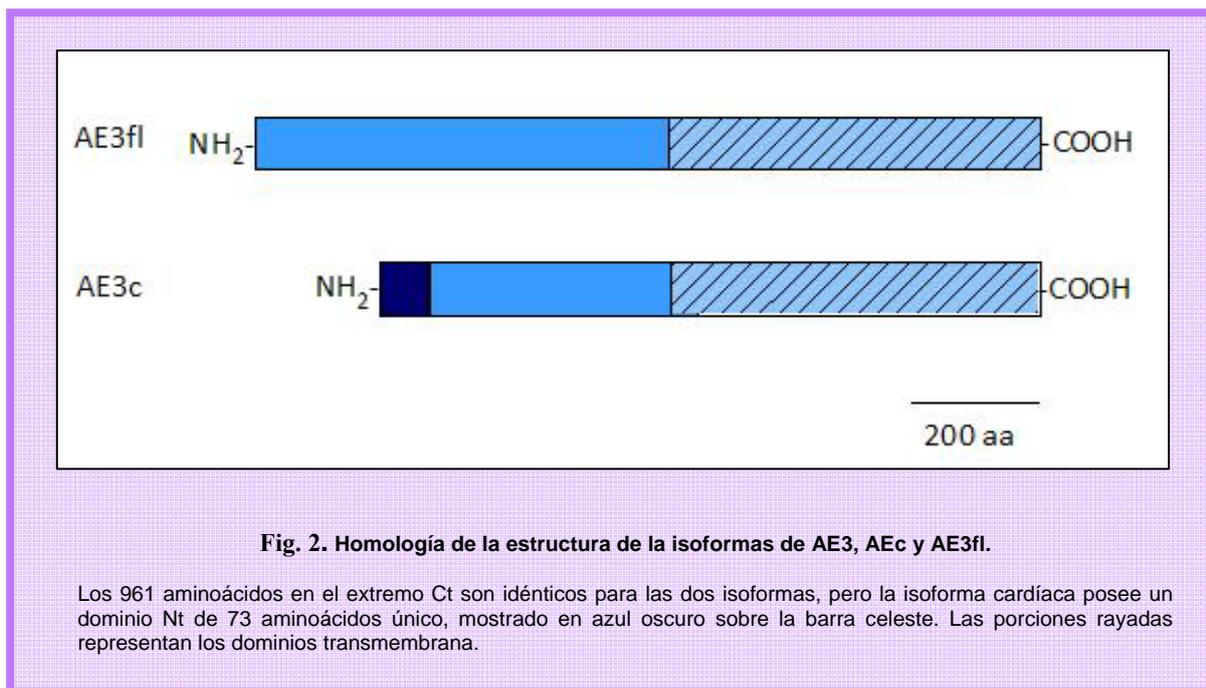
más recientemente, en otros estudios se ha reportado que el SLC26A de ratones y su ortólogo en humanos permiten el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ electroneutro (1 molécula de Cl^- por 1 molécula de HCO_3^-) (Chernova, Jiang et al. 2005).

La actividad de intercambio de aniones en el miocardio está sujeta a regulación por Angiotensina II (Ang II), entre otros factores. Esta hormona, como se explicará con mayor detalle más adelante, activa una cascada de señalización de segundos mensajeros (incluyendo a la proteína kinasa C, PKC), la cual provoca un efecto inotrópico positivo en el corazón (Ishihata and Endoh 1993), estimulando la movilización de Ca^{+2} e induciendo la hipertrofia cardíaca (Schunkert, Sadoshima et al. 1995). Se ha podido observar que tanto la Ang II como la endotelina (ET) incrementan la actividad de intercambio aniónico en ventrículos de felinos a través de la vía regulatoria dependiente de PKC (Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1998; de Hurtado, Alvarez et al. 2000). Los agonistas adrenérgicos y purinérgicos estimulan la actividad de intercambio aniónico cardíaca. También, se ha sugerido un rol para las tirosinas kinasas cuando en un estudio se observó que los inhibidores de tirosina kinasas inhibieron la activación purinérgica de la actividad de intercambio aniónico en cardiomiocitos (Puceat, Roche et al. 1998).

Intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3

De la familia de los AE, la isoforma AE3 es de particular interés debido a que se encuentra en los tejidos excitables: cerebro (Kopito, Lee et al. 1989), retina (Kobayashi, Morgans et al. 1994) y corazón (Linn, Kudrycki et al. 1992). El corazón y la retina co-expresan dos isoformas diferentes del AE3, resultado del uso alternativo de un mismo promotor, el AE3 *full length* (AE3fl) y el AE3 cardíaco (AE3c) (Linn, Kudrycki et al. 1992; Kobayashi, Morgans et al. 1994). La secuencia 5'-no traducida y la secuencia 5'-codificante del ARNm de la isoforma AE3fl están contenidas entre los exones 1-6 y la correspondiente secuencia del ARNm de la isoforma AE3c está contenida dentro del intrón 6. Los exones 7-23 codifican secuencias comunes para ambas isoformas AE3fl y AE3c. A nivel de proteína, el AE3fl de humano posee 1232 aminoácidos y el AE3c contiene 1034 aminoácidos en su secuencia, incluyendo un único dominio Nt de 73 aminoácidos que caracteriza a esta última isoforma (**Fig. 2**) (Linn, Kudrycki et al. 1992).

INTRODUCCIÓN



El AE3c es la isoforma más expresada de las proteínas AE en el corazón, mientras que en la retina el AE3c y el AE3fl se expresan en iguales niveles, pero en diferentes capas celulares (Kobayashi, Morgans et al. 1994; Alvarez, Gilmour et al. 2007).

Como se explicó anteriormente, AE3 comparte el mismo patrón estructural que el resto de las isoformas de la familia de los AE: un dominio citosólico Nt, seguido de un dominio Ct transmembrana y de un dominio Ct citosólico. El dominio terminal Nt de AE3 expresado en cerebro y corazón juega un rol regulatorio en la actividad de AE3 (Kudrycki, Newman et al. 1990). En la **Fig. 3** se muestra el modelo topológico para AE3, realizado a partir del modelo reportado por (Zhu, Lee et al. 2003), para AE1 (Chiappe de Cingolani, Ennis et al. 2006), donde pueden observarse dos grandes loops extracelulares, nombrados como loop 3 y loop 4.

Tanto AE3 como SLC26A6 localizan en el sarcolema de los miocitos y estarían también expresados en estructuras membranosas del retículo sarcoplásmico (RS) y en túbulos-T (Alvarez, Kieller et al. 2004; Alvarez, Kieller et al. 2007).

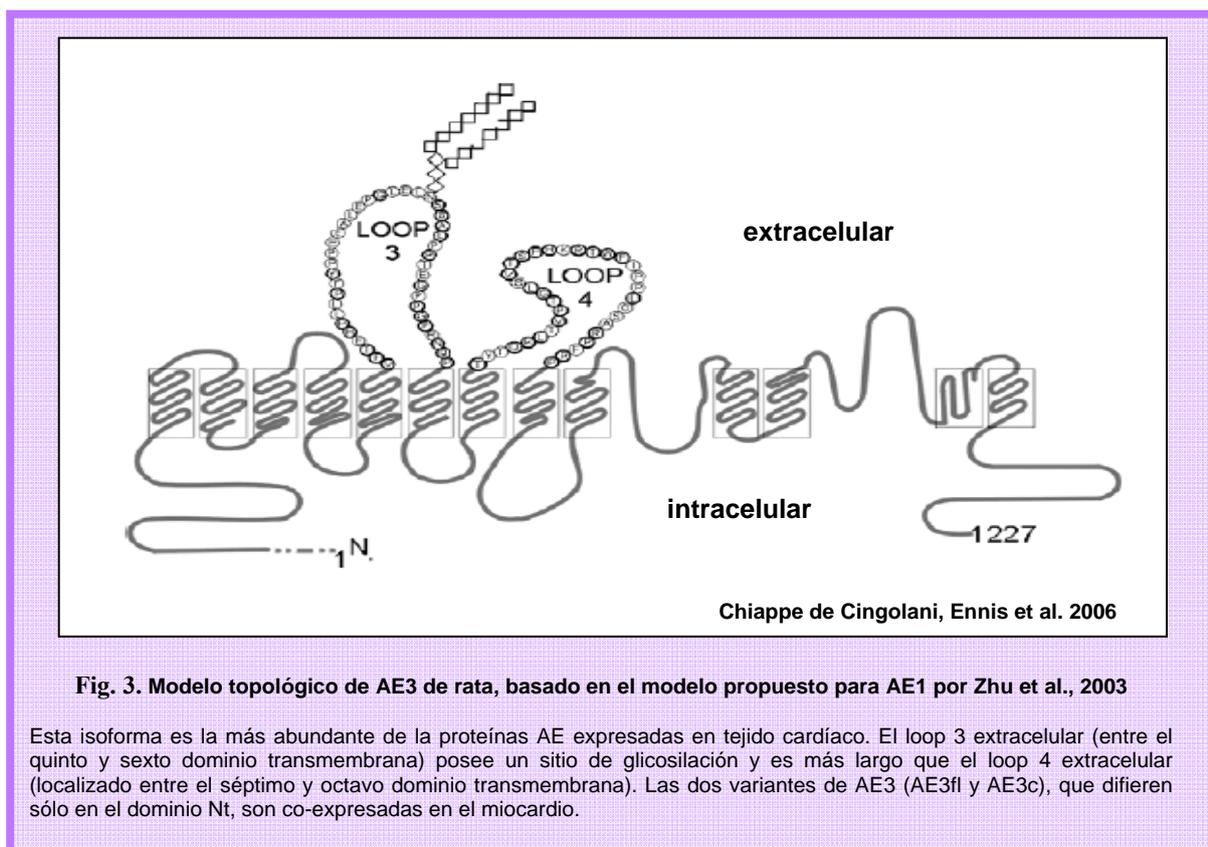
En músculo cardíaco, el AE3 puede ser un importante mecanismo para el mantenimiento de la $[Cl^-]$ por encima de los niveles que se alcanzarían sólo de acuerdo a su equilibrio electroquímico (Hume and Harvey 1991; Yannoukakos, Stuart-Tilley et al. 1994).

AE3 se asocia a las diferentes isoformas de AC: ACII, ACIV y ACIX para formar un MTB. Como se explica con mayor detenimiento en el apartado “Metabolón de transporte

INTRODUCCIÓN

iónico”, esta asociación permite un aumento en el flujo de HCO_3^- a través de la membrana plasmática (McMurtrie, Cleary et al. 2004; Morgan, Pastorekova et al. 2007).

La isoforma AE3 de los músculos cardíacos contiene varios sitios consenso potenciales para la fosforilación por PKC (Yannoukakos, Stuart-Tilley et al. 1994). Asimismo, en estudios previos, ha sido demostrado que Ang II exógena induce la activación de AE3 por fosforilación dependiente de PKC en el residuo serina 67 (Ser67) de AE3fl (Alvarez, Fujinaga et al. 2001).



Anhidrasas Carbónicas

Las AC son metaloenzimas de Zinc que catalizan la hidratación reversible de CO_2 para formar HCO_3^- y protones de acuerdo a la siguiente reacción (Vince and Reithmeier 1998; Vince and Reithmeier 2000):



La primera reacción es catalizada por AC y la segunda reacción ocurre en forma espontánea.

INTRODUCCIÓN

A partir de diversos estudios se han encontrado 16 AC diferentes en mamíferos (Lindskog and Nyman 1964; Johnson and Lindskog 1971) que difieren en sus propiedades enzimáticas, secuencias aminoacídicas y sitios de expresión (Esbaugh and Tufts 2006; Supuran 2008; Supuran 2008). Los dominios catalíticos de las AC de humano poseen secuencias aminoacídicas y estructuras tridimensionales altamente conservadas y la longitud de las secuencias varía entre 260 a 459 aminoácidos. El Zn^{+2} es el cofactor de estas enzimas, el cual interactúa cercanamente con 3 residuos de histidina conservados (His94, His96 y His119) y con una molécula de H_2O/OH^- . (Stams, Nair et al. 1996; Avvaru, Kim et al. 2010) Otro de los residuos conservados es His64, el cual está involucrado activamente con la movilidad de protones para convertir las moléculas de H_2O unidas al Zn^{+2} en el ión OH^- antes de la catálisis. Este residuo se encuentra conservado en las isoformas ACI, ACII, ACIV (Stams, Nair et al. 1996), ACVI, ACVII (Boriack-Sjodin, Heck et al. 1995) y ACXII (Ulmasov, Waheed et al. 2000). Dentro de la familia de las AC, existen tres isoformas no catalíticas y son llamadas proteínas relacionadas con las AC (CARPs, del inglés Carbonic Anhydrase Related Proteins): ACVII, ACX Y ACXI. La inactividad de estas AC se debe a la ausencia de uno o más residuos de histidinas que unen a los átomos de Zn^{+2} . Por ello, no están involucradas en la actividad de hidratación del CO_2 (Okamoto, Fujikawa-Adachi et al. 2001; Picaud, Muniz et al. 2009).

Las AC se encuentran involucradas en diversos procesos fisiológicos tales como regulación del pH, transporte de iones, resorción ósea y secreción de fluidos gástricos, cerebrospinales y de jugos pancreáticos (Woolley 1975; Chegwidan, Dodgson et al. 2000), secreción de electrolitos, homeostasis de CO_2 y pH, fijación de CO_2 y reacciones biosintéticas como gluconeogénesis y ureagénesis (Gay, Schraer et al. 1984; Henry 1984; Dodgson and Forster 1986; Esbaugh and Tufts 2006). Las funciones más importantes están relacionadas con la respiración y el transporte de CO_2/HCO_3^- .

Las isoenzimas de AC poseen diferentes propiedades cinéticas y se encuentran en diversos tejidos (Sly and Hu 1995) y compartimentos celulares:

- ACI, ACII (29 kD), ACIII y ACVII son citosólicas
- ACV es mitocondrial (Dodgson and Forster 1986; Dodgson and Forster 1986)
- ACVI se encuentra en secreciones salivales
- ACIV, ACIX, ACXII y ACXIV (38 kD) son proteínas de membrana: ACIV es una proteína anclada a membrana a través de un anclaje de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Okuyama, Sato et al. 1992; Waheed, Zhu et al. 1992; Fleming, Crouch et al. 1993) y ACIX,

INTRODUCCIÓN

ACXII y ACXIV son proteínas con un dominio transmembrana (Purkerson and Schwartz 2005; Scheibe, Gros et al. 2006)

Estas 3 últimas AC, ACIX, ACXII y ACXIV, poseen 3 dominios distintivos (Imtaiyaz Hassan, Shajee et al. 2012):

- _ Un dominio topológico extracelular de 377 aminoácidos de longitud (Gln38-Asp414).
- _ Un dominio transmembrana de 21 aminoácidos de longitud (Ile415-Met435)
- _ Un dominio citoplasmático de 24 aminoácidos de longitud (Arg436-Ala459)
- _ Además, la ACIX presenta una región similar a proteoglicanos de 75 aminoácidos (Gln38-Asp112).

La amplia expresión de las diferentes isoformas de las AC en los diferentes tejidos del cuerpo es similar a la amplia expresión de los transportadores de HCO_3^- (Sterling, Alvarez et al. 2002). Existen tejidos en donde se expresan múltiples formas de AC y otros en los cuales sólo se expresa una única isoforma (Sterling, Alvarez et al. 2002).

Las AC forman parte del MTB mediante la unión a transportadores de HCO_3^- . Este tema será abordado en la sección titulada “Metabolones de Transporte Iónico”.

Anhidrasa Carbónica XIV

La ACXIV es el miembro más recientemente descubierto de la familia de las AC por dos diferentes grupos de investigación (Fujikawa-Adachi, Nishimori et al. 1999; Mori, Ogawa et al. 1999). La ACXIV humana es un polipéptido de 337 aminoácidos (Nishimori, Vullo et al. 2005). Posee un 29-46% de similitud con otras AC activas (Fujikawa-Adachi, Nishimori et al. 1999) y se encuentra en forma monomérica (Ponstingl, Henrick et al. 2000).

Los estudios de comparaciones filogenéticas de secuencias de aminoácidos con otras AC la ubican en el grupo de las AC extracelulares, y posee una mayor relación de identidad con ACXII, seguida por ACIX, ACVI y ACIV. Posee una topología similar a la de las AC de membrana, tal como se explicó en la sección anterior: un único dominio transmembrana y dos dominios topológicos: un dominio catalítico extracelular, al igual que ACIX y ACXII, y un pequeño segmento polipeptídico intracelular (Fujikawa-Adachi, Nishimori et al. 1999; Whittington, Grubb et al. 2004); (Pastorek, Pastorekova et al. 1994; Pastorekova, Parkkila et al. 2004); (Tureci, Sahin et al. 1998). El dominio α -hélice posee un motivo GXXXG para favorecer las interacciones hélice-hélice en las membranas (Senes, Gerstein et al. 2000). Su sitio de glicosilación se encuentra en el residuo Asn213 (Imtaiyaz Hassan, Shajee et al.).

INTRODUCCIÓN

ACXIV se expresa en retina, distintas partes del sistema nervioso, cerebro, hígado, intestino delgado, colon, riñón, vejiga urinaria, músculo esquelético y corazón (Mori, Ogawa et al. 1999; Tong, Cammer et al. 2000; Imtaiyaz Hassan, Shajee et al.). Está involucrada en funciones de regulación de pH intra y extracelular, en la regulación de volumen celular, (Nagelhus, Mathiisen et al. 2005; Imtaiyaz Hassan, Shajee et al.), reabsorción de HCO_3^- (Kaunisto, Parkkila et al. 2002) y en la modulación de la transmisión sináptica excitatoria (Parkkila, Parkkila et al. 2001).

El patrón de expresión de las diferentes AC en diversos tejidos y los reportes publicados sobre la interacción entre estas AC con los AE, formando metabolones de transporte iónico (MTI), sugerirían que ACXIV y AE3 podrían asociarse en el corazón.

Las drogas más estudiadas para la inhibición de la isoenzima humana ACXIV son las de los grupos de sulfonamidas y sulfamatos, las cuales incluyen unas 30 tipos de derivados diferentes. Las sulfonamidas ejercen su efecto de inhibición mediante su unión al ión Zn^{+2} , el cual es esencial para la actividad catalítica (Bertini, Luchinat et al. 1982). Dentro de este grupo de drogas se encuentra la 5-(benzenosulfonamida)-1,3,4-tiodiazol-2-sulfonamida (Benzolamida, BZ), la cual ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios fisiológicos y farmacológicos, junto con el empleo de las clásicas drogas también pertenecientes a este grupo, acetazolamida (ACTZ), metazolamida (MTZ), etoxizolamida (ETZ) o diclorofenamida (Nishimori, Vullo et al. 2005). Este tipo de drogas inhiben indiscriminadamente todas las isoformas de AC (Supuran, Scozzafava et al. 2003). De todos modos, se conoce que la BZ en concentraciones en el rango nanomolar o micromolar bajo es un inhibidor impermeable a la membrana, o bien, con una permeabilidad muy reducida (Casey, Morgan et al. 2004; Nishimori, Vullo et al. 2005), por lo cual puede ser utilizado como inhibidor de las isoformas de AC transmembrana. De esta manera, BZ es el inhibidor seleccionado para utilizarse en el presente trabajo como bloqueante de la actividad de la ACXIV.

Anhidrasas Carbónicas en el Corazón

El corazón expresa ACII citosólica, ACIV anclada a la membrana plasmática a través de un anclaje de GPI (Okuyama, Sato et al. 1992; Waheed, Zhu et al. 1992; Fleming, Crouch et al. 1993) y ACIX y ACXIV, ambas con un segmento transmembrana (Purkerson and Schwartz 2005; Scheibe, Gros et al. 2006). Mientras que la ACII tiene su sitio catalítico en el citoplasma de las células, la ACIX y ACXIV realizan su actividad catalítica en el medio extracelular. La existencia de AC extracelulares en miocitos ha sido bien documentada. Sin

embargo, la presencia de ACII ha sido objeto de discusión, con sólo un reporte temprano que sugiere la presencia de ACII en el citosol de cardiomiocitos fetales (Vuillemin and Pexieder 1997). Recientemente, se identificó a la ACII en miocitos de rata (Alvarez, Johnson et al. 2007) y también en ventrículos de corazón de ratón y humano adulto, tanto a nivel del ARNm como a nivel de proteínas (Sharkey, McCune et al. 2001; Alvarez, Johnson et al. 2007).

Metabolones de Transporte Iónico

Un metabolón es un complejo físico de enzimas metabólicas asociadas débilmente y de manera secuencial (Srere 1987). La identificación de los componentes que integran el metabolón puede resultar muy difícil debido a la débil asociación entre las enzimas. En la literatura se ha descrito la existencia de metabolones en la cadena glicolítica, el ciclo del ácido cítrico y en el ciclo de la urea (Reithmeier 2001). Los metabolones permiten mover metabolitos desde el sitio activo de una enzima a la siguiente de manera optimizada, este proceso es conocido como canalización de sustratos (Miles, Rhee et al. 1999; Reithmeier 2001). La canalización disminuye la pérdida de intermediarios debido a la orientación de los sitios activos de las enzimas que se mantienen relativamente cerca, creando así una cadena de enzimas (Srere 1987; Miles, Rhee et al. 1999; Sterling, Reithmeier et al. 2001). De esta manera, el flujo a través de la vía enzimática es acelerado por la co-localización de enzimas, las cuales aumentan la concentración local de sustrato en el sitio activo de la enzima contigua, por lo tanto el producto de una reacción alimenta a la siguiente. Cuando el producto enzimático es consumido en una reacción, la enzima contigua le provee el sustrato dirigiendo de alguna manera la dirección del flujo.

Las primeras indicaciones del fenómeno del metabolón en el transporte de HCO_3^- es la indicación de la asociación de la ACII con el dominio Ct de los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE1 (Vince and Reithmeier 1998), AE2 y AE3 (Imtaiyaz Hassan, Shajee et al. 2012). La interacción está mediada por un residuo hidrofóbico, seguido por cuatro residuos, con al menos dos residuos ácidos en los AE (Vince and Reithmeier 2000), y una secuencia de residuos de aminoácidos básicos en el extremo Nt de la ACII (Vince, Carlsson et al. 2000). Este tipo de interacción física también tiene un significado funcional, ya que la interacción directa de AE/ACII es esencial para la máxima actividad de transporte mediado por los AE, con una disminución entre 40-60% cuando la ACII está libre en el citoplasma de las células y no asociada a los AE (Sterling, Reithmeier et al. 2001). Esto condujo a la introducción del concepto de MTB ó, de manera más general, MTI, el cual hace referencia al complejo

formado entre un transportador iónico y la enzima que produce y consume el sustrato que se transporta.

El metabolón formado por ACII y AE1 ha sido reportado en eritrocitos (Vince and Reithmeier 1998). En el páncreas también se ha encontrado la presencia de un MTI formado por la interacción de ACII con el transportador SLC26A6 (Alvarez, Vilas et al. 2005). En el sistema nervioso central (SNC), se ha reportado la asociación de ACII y ACIV con ambas isoformas de AE3 (Casey, Sly et al. 2009). También se ha reportado que ACIX interactúa con AE1, AE2 y AE3. En el estómago, ACIX, ACII y AE2 se asocian para maximizar la secreción de ácidos estimulada por las células parietales gástricas con HCl (Morgan, Pastorekova et al. 2007). Los metabolones formados por la unión de AC a transportadores de HCO_3^- maximizan los procesos de catálisis/transporte.

Algunas Condiciones Fisiopatológicas Cardiovasculares

A continuación se describen brevemente algunas condiciones fisiopatológicas cardiovasculares para una mejor comprensión de la participación en las mismas de las proteínas transportadoras de HCO_3^- y las AC.

Hipertensión Arterial

La presión arterial (PA) es la resultante hemodinámica del volumen minuto cardíaco y de la resistencia ofrecida por el sistema vascular, es decir, la resistencia periférica total. Por consiguiente, puede decirse que la hipertensión arterial sistémica es una alteración hemodinámica dependiente de cualquier factor que altere el equilibrio entre las dos variables mencionadas.

La regulación normal de la PA es uno de los mecanismos fisiológicos más complejos y depende de la función integrada de los sistemas cardiovascular, renal, nervioso y endocrino. El nivel de la PA regula la homeostasis corporal total y está vinculada al equilibrio cardiovascular y renal, y cambia a través de las distintas etapas de la vida. La PA aumenta con la edad durante todo el desarrollo de la vida, tanto en modelos experimentales como en el hombre. El aumento es rápido inmediatamente después del nacimiento, más lento hasta la maduración sexual y marcado después de la pubertad. Continúa, en general, durante toda la vida. A partir de la mitad de la vida comienza a detectarse la aparición de hipertensión arterial esencial o primaria en el ser humano. Experimentalmente se han desarrollado modelos de animales hipertensos seleccionados genéticamente. La cepa más conocida, estudiada y que se

INTRODUCCIÓN

utiliza en el presente trabajo, es la de ratas espontáneamente hipertensas (SHR, del inglés, Spontaneously Hypertensive Rats) cuyo fenotipo tiene un cierto grado de similitud con el desarrollo de la hipertensión esencial en el hombre.

La hipertensión arterial es la manifestación de un desequilibrio entre los factores regulatorios de la homeostasis cardiovascular y renal y la normal composición del medio interno. Los factores mencionados son muy complejos y de orígenes diversos pero estrechamente vinculados entre sí.

Isquemia/Reperfusión Miocárdica

La isquemia miocárdica puede ser definida como la insuficiente perfusión sanguínea del tejido miocárdico. Más específicamente como el desbalance entre el aporte de oxígeno y la demanda.

En el corazón humano la isquemia ocurre, entre otros procesos, en situaciones patológicas tales como la angina de pecho o el infarto del miocardio. Además, se produce durante las manipulaciones terapéuticas en la cirugía con circulación extracorpórea, así como tras la obtención y transporte del corazón para el trasplante (Bourdillon and Poole-Wilson 1982)

En la célula miocárdica en condiciones de isquemia el déficit de perfusión sanguínea no sólo condiciona el aporte de oxígeno y nutrientes, sino que además, es incapaz de eliminar productos del metabolismo que le pueden ser tóxicos, tales como el lactato, los protones o el CO_2 . En condiciones fisiológicas, éstos son eliminados vehiculizados por sangre. Mas aún, en esta situación se pueden formar radicales libres de gran reactividad que producen alteraciones funcionales y estructurales y que, en condiciones fisiológicas, su degradación está asegurada mediante reacciones enzimáticas acopladas.

En condiciones fisiológicas los iones Ca^{+2} son esenciales para el acoplamiento excito-contráctil del miocardio. En la isquemia miocárdica se pierde la homeostasis dando lugar a un masivo incremento del Ca^{+2} intracelular (Ca^{+2}_i) (Jennings and Shen 1972), especialmente en las mitocondrias (Clark, Ferguson et al. 1977).

La acumulación de protones durante la isquemia juega un papel importante durante la reperfusión; la sobrecarga de Na^+ no puede ser manejada adecuadamente por la bomba de Na^+/K^+ debido a la ineficiente disponibilidad de ATP. Este exceso de Na^+ intracelular activa su intercambio con el Ca^{+2} extracelular a través del intercambiador Na^+/Ca^+ (NCX), y provoca una sobrecarga de Ca^{+2}_i , responsable de la injuria por isquemia/reperfusión.

Insuficiencia Cardíaca

La insuficiencia cardíaca es un síndrome clínico en el cual anomalías de la estructura o de la función del corazón originan la incapacidad del corazón de expulsar o llenarse de sangre en los volúmenes más adecuados para satisfacer las demandas del metabolismo de los tejidos del cuerpo. Las causas de este síndrome son múltiples y muy variadas. Se caracteriza por cambios estructurales adversos y una inexorable progresión de la enfermedad que, pasado cierto punto de no retorno, continúa a pesar que la injuria causal haya sido eliminada.

Durante el desarrollo de esta patología se pueden describir tres estadios. En el primer estadio, el corazón sufre la injuria o el aumento de las condiciones de carga, lo que produce la disminución del volumen minuto. Se activan mecanismos compensadores que permiten mantener el volumen minuto dentro de valores normales. La función global se encuentra preservada. Las manifestaciones clínicas están ausentes y la mayoría de los pacientes o animales en experimentación progresarán al siguiente estadio.

En el segundo estadio, la persistencia de la injuria o el cambio de la carga ventricular, así como también el agotamiento de los mecanismos compensadores conspiran para que se desarrolle cierto grado de disfunción ventricular. La estructura y forma del ventrículo izquierdo están alterados por la aparición de hipertrofia miocárdica y la posterior dilatación ventricular. La función cardíaca global está alterada y más mecanismos de adaptación negativa son activados. La insuficiencia cardíaca progresa independientemente de las condiciones hemodinámicas.

En el tercer estadio, existe una disfunción ventricular significativa, altamente sintomática y con gran morbilidad y mortalidad. La estructura, forma y tamaño del ventrículo izquierdo están severamente alterados y caracterizados por un afinamiento en la pared, dilatación significativa y esferización. La función cardíaca global está severamente deteriorada.

Hipertrofia Cardíaca

La HC patológica se caracteriza por un aumento del tamaño de los miocitos, como consecuencia de un aumento de la síntesis proteica, y por la inducción de genes fetales y represión de genes que codifican las respectivas isoformas del adulto (Frey, Katus et al. 2004).

Tradicionalmente, el concepto HC se ha basado en el aumento del peso del corazón determinado por el mayor tamaño de los miocitos. Las células musculares cardíacas, si bien representan aproximadamente el 30% del número total de las células del miocardio, dado su

INTRODUCCIÓN

gran tamaño, constituyen aproximadamente un 76% del volumen del órgano y, por ello, su crecimiento impacta significativamente sobre el peso final del corazón. Sin embargo, más recientemente, en trabajos previos se ha evidenciado el desarrollo de hipertrofia de los miocitos y fibrosis sin aumento del peso del corazón (Merkle, Frantz et al. 2007). Esto evidencia que la HC no necesariamente iría acompañada de un aumento del peso del corazón, si no que el determinante de la respuesta hipertrófica puede generar simultáneamente apoptosis disminuyendo, entonces, el número total de miocitos, lo cual posee un efecto en el peso final del corazón. De todas maneras, todavía sigue siendo el peso del corazón normalizado por el peso corporal, la superficie corporal o la longitud de la tibia, según se estudien poblaciones humanas o de animales de laboratorio, la forma más aceptada para definir el aumento del peso del corazón.

La respuesta hipertrófica puede ser desencadenada por situaciones naturales de sobrecarga hemodinámica, como la determinada por el crecimiento, el embarazo y la actividad física intensa y regular, o por situaciones de sobrecarga hemodinámica patológica de presión y/o de volumen secundarias a hipertensión arterial, estenosis o insuficiencias valvulares, miocardiopatía primaria y/o infarto agudo de miocardio (Beltrami, Urbanek et al. 2001; Nadal-Ginard, Kajstura et al. 2003).

En los primeros estadios de algunas patologías, como la estenosis aórtica, la hipertensión arterial o el infarto del miocardio, la hipertrofia es beneficiosa, ya que de no existir un aumento del tamaño de los miocitos sería difícil para el ventrículo mantener un volumen minuto adecuado ante el aumento de carga que estas patologías generan. Por el contrario, también es bien conocido que los corazones con hipertrofia moderada o severa presentan un deterioro gradual que termina en IC.

La hipertrofia miocárdica es, probablemente, un mecanismo adaptativo, diseñado para mejorar la función de bomba del corazón, por aumentar el número de unidades contráctiles dentro de cada miocito, lo que lleva de forma simultánea a una disminución de la tensión parietal por aumento del grosor de la pared ventricular (ley de Laplace). Cuando la hipertrofia de los miocitos es excesiva o prolongada en el tiempo, se transforma en una respuesta mal adaptativa. Son las diferentes vías intracelulares las que pueden conducir de una hipertrofia adaptativa a una mal adaptativa o deletérea.

- **Activación de la vía de señalización intracelular iniciada por estimulación de receptores acoplados a proteína G en la respuesta hipertrófica**

INTRODUCCIÓN

La HC surge como resultado de diversos estímulos tales como el estiramiento del miocardio, la activación neurohumoral y/o liberación de factores de crecimiento y citoquinas. Estos estímulos transmiten sus efectos a las células a través de diversas proteínas que establecen la relación entre los componentes de la matriz extracelular y los elementos intracelulares. Estas proteínas que se activan inicialmente son receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCR, del inglés G Protein Coupled Receptor), receptores con actividad intrínseca de tirosina quinasa (RTyrK), receptores de citoquinas y las integrinas. De esta manera, la unión de los ligandos específicos a sus correspondientes receptores activa en cada caso vías de señalización intracelular distintas, sin embargo, existe un alto grado de entrecruzamiento e interdependencia entre las distintas rutas de señalización intracelular, conformando una extensa e intrincada red. De esta manera, ninguna cascada de señalización intracelular regula la hipertrofia de los cardiomiocitos de manera aislada. Por el contrario, cada vía intracelular operaría como un componente integrado de una respuesta orquestada. En general, estas señales que inducen el desarrollo de hipertrofia resultan finalmente en una reprogramación genética (Ennis and Escudero 2008).

En nuestro laboratorio, la cascada de señalización de la HC estudiada comienza con la activación del receptor de Ang II tipo 1 (AT1) por unión de su ligando, Ang II. La activación del receptor AT1, produce la liberación/formación de ET que activa al receptor de ET tipo A (ET_A). Tanto el receptor AT1 como el receptor ET_A son receptores acoplados a proteína G, más específicamente, a la proteína G_q. De esta manera, el estímulo hipertrófico promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad G α de la proteína G. Consecuentemente, se produce la disociación de dicha subunidad y de la subunidad G $\beta\gamma$. G α disociada recluta a la isoforma β de la fosfolipasa C (PLC- β) a la membrana la cual hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) dando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El DAG, formado como segundo mensajero, facilita el reclutamiento de proteínas kinasas (PKC). En el paso siguiente aparece la participación de AE3, PKC activa directamente al intercambiador AE3 mediante fosforilación en el residuo Ser67 (**Fig. 4**).

Recientemente, ha sido demostrado que la activación de los GPCR promueven la transactivación del receptor de membrana tirosina quinasa conocido como receptor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés Epidermal Growth Factor Receptor) (Asakura, Kitakaze et al. 2002; Kagiya, Eguchi et al. 2002; Kagiya, Qian et al. 2003; Lemarie, Paradis et al. 2008). De esta manera, luego de la activación de los receptores AT1 y ET_A, se estimula la activación del EGFR. En esta cascada de señalización también se encuentra involucrada la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen

INTRODUCCIÓN

Species), fundamentalmente de origen mitocondrial. Seguidamente, se produce la activación de kinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases). La MAPK ERK1/2 fosforila a la kinasa p90rsk, y esta última activa por fosforilación al NHE-1 (Ganz, Boyarsky et al. 1989; Abuladze, Lee et al. 1998; Cingolani, Chiappe et al. 2003). La activación del intercambiador NHE1 llevaría a la acumulación de Na^+ y, subsecuentemente, a la acumulación de Ca^{+2} , a través de la activación del intercambiador NCX (**Fig. 4**). Esta alteración en la homeostasis iónica activaría el programa de crecimiento hipertrófico de una manera compleja, involucrando la vía de factores de transcripción calcineurina/NFAT5, y los niveles de ROS. Por su parte, el IP_3 podría inducir la liberación de Ca^{+2} desde el RS o desde la envoltura nuclear (Wu, Zhang et al. 2006). El aumento de Ca^{+2} provocaría la activación de fosfatasas y/o kinasas que determinan el aumento de la transcripción y de la síntesis proteica y finalmente el desarrollo de HC (Frey, McKinsey et al. 2000).

Es importante destacar que mediante la activación simultánea de los mecanismos alcalinizantes y acidificantes, NHE1 y AE3, respectivamente, el pH_i se mantiene estable. El NHE1 alcaliniza las células permitiendo el egreso de H^+ de la célula y por su parte, la activación de intercambio de AE3 permite el egreso de HCO_3^- de la célula manteniendo los niveles celulares de H^+ . Sin embargo, la co-activación de NHE1 y AE3 no previene el aumento de Na^+ que resulta de una mayor actividad de estos transportadores. Esto es una señal que subyace la hiperactividad del NHE1 y del AE3 y por la cual, a través del aumento del Ca^{+2} , se desencadenaría la respuesta hipertrófica del miocardio (**Fig. 4**).

Como se explicó anteriormente, la cascada descrita no es el único mecanismo responsable de la respuesta hipertrófica. Otras vías intracelulares que no involucran la activación del NHE1 y AE3 pueden conducir al aumento de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ y al desarrollo de la HC (Hefti, Harder et al. 1997; Schluter and Piper 1999). Es probable también que la HC pueda ocurrir sin aumentos de $[\text{Ca}^{+2}]$ citosólico (Wu, Zhang et al. 2006).

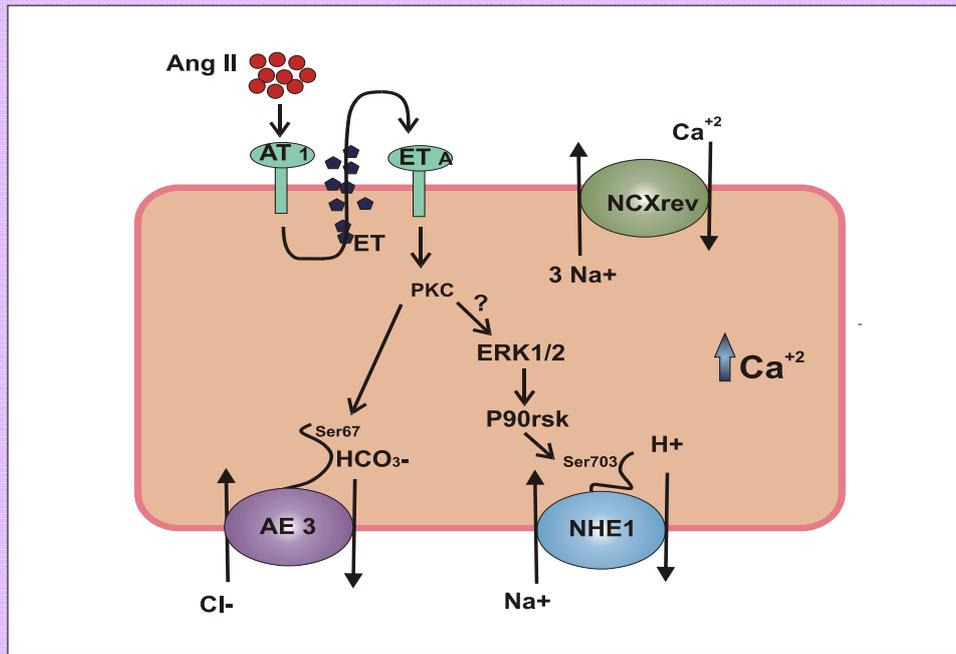


Fig. 4. Modelo que relaciona el aumento de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y la Hipertrofia Cardíaca inducida por Ang II.

Ang II se une y activa a los receptores AT1 de los cardiomiocitos. El estímulo de estos AT1 induce la formación/liberación de ET, la cual simultáneamente activa a los intercambiadores AE3 y NHE1 a través de los receptores ET_A. La activación del AE3 previene la alcalinización esperada por la activación de NHE1 pero no previene el aumento de $[\text{Na}^+]_i$. Este aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ promueve al intercambiador NCX a activarse en su modo reverso, lo cual llevaría a un aumento en el transitorio de Ca^{+2} . Este aumento en la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ podría disparar la hipertrofia cardíaca por activación de diferentes vías de señalización intracelular dependientes de Ca^{2+} .

Participación de los AE en Condiciones Fisiopatológicas

El papel que cumplen los AE en el corazón es a través de la acidificación celular, mediante el eflujo de HCO_3^- (Vaughan-Jones 1986), como puede observarse en la recuperación del pHi luego de la alcalosis.

Como se explicó anteriormente, los episodios isquémicos provocan acidosis intracelular. Experimentos realizados en corazones de hurón demostraron que los mecanismos dependientes de HCO_3^- (intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE, y co-transporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ mediado por NBC) son responsables de por lo menos el 40% de la actividad de recuperación de pH en el período post-isquémico (Vandenberg, Metcalfe et al. 1993; Vandenberg, Metcalfe et al. 1994).

Asimismo, se han observado efectos cardioprotectores en corazones tratados con inhibidores del intercambio aniónico, con derivados del ácido disulfónico estilbene (4-acetamido-4'-isotiocianoestilbene-2,2'-disulfonato, SITS) (Tanaka, Matsui et al. 1996;

INTRODUCCIÓN

Ramasamy, Hwang et al. 2001). Sin embargo, estos compuestos también inhiben el transporte de ácidos grasos (Ramasamy, Hwang et al. 2001) y a la AC (Vaughan-Jones, Villafuerte et al. 2006), lo cual generaría efectos cardioprotectores reduciendo el transporte de ácidos e impidiendo la sobrecarga de Na^+ , respectivamente.

Por otro lado, se demostró que el SITS inhibió la recuperación de un episodio isquémico en el miocardio de conejos, sugiriendo que los AE podrían alcalinizar los miocitos (Nakanishi, Gu et al. 1992). Debido a que el SITS también inhibe a los canales de Cl^- y al cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ NBC1 en el miocardio, estos experimentos son difíciles de interpretar.

En resultados recientes, usando anticuerpos inhibitorios de la función de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediada por AE3, se demostró un aumento del pHi en miocitos de rata, lo cual llevaba a un aumento en la fuerza contráctil (Cingolani, Chiappe et al. 2003; Chiappe de Cingolani, Ennis et al. 2006). Esto sugiere que, bajo condiciones normales, el AE3 acidifica los miocitos a través del eflujo de HCO_3^- , lo cual tendría mayores implicancias en el corazón cuando ese mecanismo está hiperactivo.

Es bien conocido que la Ang II regula la contractilidad y crecimiento del miocardio y es, además, un factor estimulante de la activación de la cascada de HC. En nuestro laboratorio, ha sido demostrado que Ang II genera el aumento de la actividad tanto de los mecanismos de extrusión de protones Na^+ -dependientes, el NHE y NBC, como del mecanismo acidificante mediado por AE3, en el músculo cardíaco (Perez, Alvarez et al. 1995). Asimismo, en el mismo trabajo, se ha encontrado que en condiciones experimentales en las cuales el HCO_3^- está ausente, la activación del NHE1 produce un aumento significativo del pHi . Sin embargo, en condiciones fisiológicas, en las cuales hay abundante HCO_3^- , los procesos reguladores de pHi dependientes de HCO_3^- se activan al mismo tiempo que ocurre la activación del NHE1. Un hecho importante, que es comúnmente ignorado, es que cuando el NHE1 se activa bajo condiciones fisiológicas, no se observa aumento de pHi (Ganz, Boyarsky et al. 1989; Pushkin, Abuladze et al. 2000). Esto puede ser debido a que la alcalinización de las células que se produce cuando se activa el NHE1 tiene un efecto autoinhibitorio sobre el propio NHE1. Por lo tanto, la sobreactivación del NHE1 no puede sostenerse sin la presencia de un mecanismo acidificante de las células que actúe como balance. Es interesante destacar que, bajo condiciones en las cuales ocurre hipertrofia en cardiomiocitos, no se observan cambios en el pHi en condiciones basales, pero sí se pueden observar aumentos en la concentración de Na^+ citosólica (Ganz, Boyarsky et al. 1989). Este fenómeno de sobreactivación del NHE1 sin alcalinización celular, puede ser explicado únicamente por un mecanismo acidificante, como

es el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por el AE3 que es activado en paralelo (Ganz, Boyarsky et al. 1989), y que es regulado además por la PKC. (Sterling and Casey 2002; Yamamoto, Shirayama et al. 2007) (**Fig. 4**).

Anhidrasas Carbónicas e Hipertrofia Cardíaca Patológica

Se ha reportado que el bloqueo de las AC previene la HC. Hasta el momento no se conoce si este efecto inhibitorio es mediado por el bloqueo de una AC presente en el citosol de los miocitos, o bien, presente en la membrana, con su sitio catalítico localizado en el exterior de las células. También se ha encontrado que el tratamiento con inhibidores de la AC, tales como ETZ y MTZ, inhibe la hipertrofia de miocitos cultivados en una relación dependiente de la dosis (10-100 μM), y puede revertir la hipertrofia una vez establecida (Alvarez, Johnson et al. 2007). Datos recientes indican que la estimulación mediante el uso de agonistas adrenérgicos, como la fenilefrina (FE, 10 μM), induce hipertrofia de cardiomiocitos cultivados de neonatos de ratas y miocitos cultivados de ratones adultos. La FE incrementa la expresión de genes marcadores de la HC como el péptido natriurético atrial (ANP), y también de la ACII tanto a nivel del ARNm como a nivel de proteínas. ETZ normalizó la expresión de ANP y ACII, consistente con la normalización de la hipertrofia (Alvarez, Johnson et al. 2007). Además, se ha encontrado que AE3fl se activa por la estimulación adrenérgica, pero no así el transportador de HCO_3^- más abundante en miocardio, SLC26A6, lo cual refuerza la idea de que el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3fl es la isoforma que se activa durante la HC. Otros datos que apoyan al presente modelo están basados en perfiles de genes, los cuales sugieren que la expresión de la ACII está aumentada en el corazón hipertrófico de ratón (Domenighetti, Ritchie et al. 2004) y corazones hipertróficos e insuficientes de humanos (Alvarez, Quon et al.). También el efecto de ETZ sobre la inhibición del crecimiento celular ha sido probado en otros sistemas (Chegwidden and Carter 2000; Takahata, Kumano et al. 2004). La ETZ usada en una dosis de 100 μM inhibe el crecimiento de tres líneas celulares. Sin embargo, no se elucidaron las bases fisiológicas de dicha inhibición. Estos resultados no son inconsistentes con el modelo de inhibición de la actividad del NHE1 que ha sido propuesta, dado que tanto NHE1 como ACII, están universalmente expresados en células de mamíferos (Slepkov and Fliegel 2002; Pastorekova, Parkkila et al. 2004). Un estudio reciente demostró que inhibidores del NHE1 que son comúnmente usados, inhiben además a la ACII, en concentraciones similares a las reportadas como anti-hipertróficas (Villafuerte FC 2007); esto sugeriría que al menos una parte del efecto inhibitorio de ciertos inhibidores del NHE1 sobre la HC, estaría

dado a través de la inhibición de las AC, y no del NHE1. Otros datos preliminares muestran un aumento en los niveles de ARNm de las ACII y ACIV en corazones humanos hipertróficos y corazones humanos con IC, lo cual apoya la idea que la activación de la ACII y quizá otras AC serían un componente de la señal hipertrófica.

Metabolones de Transporte Iónico e Hipertrofia

Estudios recientes sobre el intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ que ocurre en el corazón, en particular el mediado por AE3, conducen a la observación que la activación del AE3 conduciría a la HC. En particular, los estudios mencionan la activación de AE3 por vías intracelulares que activarían PKC. Ambos el NHE1 y el AE3 son activados por PKC. Más recientemente, se demostró que además de los AE (AE1, AE2, y AE3), tanto el NHE1, como los co-transportadores $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC; NBC1, NBC3), los cuales se mencionan junto al NHE1 como mecanismos alcalinizantes del miocardio, interaccionan física y funcionalmente con la ACII (Sterling, Reithmeier et al. 2001; Li, Alvarez et al. 2002; Alvarez, Loisel et al. 2003; Loisel, Morgan et al. 2004; McMurtrie, Cleary et al. 2004; Pushkin, Abuladze et al. 2004; Li, Liu et al. 2006; Alvarez, Johnson et al. 2007) formando un MTI. Recientemente, en nuestro laboratorio, a partir de estudios realizados en papilares aislados de corazón de rata se ha encontrado que la interacción de NHE1 con ACII constituye un componente de la segunda fase de fuerza en respuesta al estiramiento miocárdico y potencia el transporte de H^+ mediado por NHE1. El estiramiento del músculo cardíaco precede a la HC (Vargas, Diaz et al. 2013). Todas estas observaciones permitirían pensar que el AE3fl, el AE principal en el corazón de mamíferos, es esencial para las señales hipertróficas que actúan a través del NHE1.

Otra observación que no puede dejarse de lado es que AE3 también actuaría en contraposición de los NBC, mecanismos alcalinizantes que también han sido implicados en patologías cardíacas (Khandoudi, Albadine et al. 2001). La acción combinada de AE3fl, NHE1 y NBC, resultaría en una carga celular neta de NaCl, sin cambios en el pH_i , lo cual concuerda con los hallazgos de elevación del Na^+_i sin cambios en el pH_i en miocitos estimulados por agentes hipertróficos.

El nexo entre la actividad de transporte mediada por estos transportadores iónicos y la señal hipertrófica podría ser la ACII. La actividad catalítica de la ACII produce $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, sustratos necesarios para los flujos mediados por AE3/NBC y NHE1, respectivamente. De esta manera, ACII, NHE1, NBC y AE3fl estarían asociados. La co-activación de NHE1-

INTRODUCCIÓN

NBC/ACII y AE3 sería patológico debido a que la activación de NHE1 y NBC podría sostenerse en el tiempo sin ser inhibida por pH alcalino, pues la co-activación de mecanismos acidificantes (AE3fl) no cambian el pH_i (Perez, Alvarez et al. 1995; Alvarez, Johnson et al. 2007; Cingolani and Ennis 2007).

OBJETIVOS

Hipótesis de Trabajo

Cuando se activa el MTI formado por NHE1/ACII/AE3fl se estimula la HC. Datos preliminares apoyan la hipótesis que las proteínas que forman este MTI interaccionan funcionalmente. Sin embargo, todavía existen componentes del metabolón que no han sido identificados. Entre estos componentes se encuentran los NBC, ACIV y ACXIV. Se propone, por lo tanto, explorar el rol de una de estas proteínas, la ACXIV, en procesos fisiológicos y fisiopatológicos en el corazón. Se hipotetiza que AE3 interactúa con la isoenzima ACXIV tanto física como funcionalmente, formando un MTI que maximiza el flujo de HCO_3^- a través de la membrana. Se propone, además, que este metabolón es activado en ciertas condiciones patológicas como la HC.

Objetivo General

- ⌘ Proveer información adicional para el modelo del MTI formado por NHE1/ACII/AE3fl en animales, con el fin último de usar la inhibición de la AC para el tratamiento de la HC y la IC.

Objetivos Específicos

- ⌘ Estudiar la asociación física entre AE3 y ACXIV en el miocardio, evaluando la posibilidad de la formación de un complejo proteína-proteína en membranas de células musculares cardíacas.
- ⌘ Examinar la expresión proteica de las diferentes isoformas de AC expresadas en corazón, incluyendo la ACXIV.
- ⌘ Estudiar la posible interacción de ACXIV con el transportador de HCO_3^- predominante en corazón, Slc26A6, de manera de incluir o descartar su participación en los experimentos de transporte de HCO_3^- realizados en el presente trabajo.
- ⌘ Investigar el rol funcional de la asociación de AE3 y ACXIV en el músculo cardíaco normal de mamíferos.

OBJETIVOS

- ⌘ Investigar el rol funcional de la asociación de AE3 y ACXIV en el músculo cardíaco hipertrófico de mamíferos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones de aproximadamente 3 meses de edad. Los ratones knock-out (KO) para *ae3* (*ae3^{-/-}*) fueron producidos por mutagénesis dirigida, como se ha descrito previamente (Shah, Ulmasov et al. 2005; Alvarez, Gilmour et al. 2007).

Se utilizaron ratas machos de las cepas espontáneamente hipertensas SHR y Wistar provenientes de los laboratorios Charles River, Wilmington, Massachusetts, USA. Las ratas Wistar constituyen una cepa de ratas albinas exocriadas pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus*. Esta cepa fue desarrollada en 1906 en el Instituto Wistar de Filadelfia para su utilización en investigación biológica y médica por el fisiólogo Henry Donaldson. Las cepas de la mayoría de los laboratorios descienden de la colonia establecida en el Instituto Wistar, y actualmente es una de las cepas más populares en investigación. En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar como control normal (normotrófico). Las ratas SHR fueron introducidas originalmente en el año 1963 por Okamoto y Aoki (Okamoto and Aoki 1963) mediante seis generaciones de endocria a partir de una pareja de ratas de la cepa Wistar que presentaba PA persistentemente elevada. Constituyen un modelo para el estudio de la progresión natural de hipertrofia ventricular izquierda, producida por un aumento de la poscarga.

Todos los animales fueron mantenidos en el bioterio de la facultad de Ciencias Médicas bajo las mismas condiciones, con libre acceso a alimento balanceado y agua. Todos los protocolos en los que se utilizaron animales se aplicaron de acuerdo a las normas regidas por el Comité de Bienestar Animal de la Facultad de Medicina de La Plata y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Ley de la República Argentina No. 14346)

Extracción de Corazones

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico 35mg/Kg por vía intraperitoneal. Se estableció que se encontraban en fase de anestesia profunda comprobando la ausencia de reflejo tendinoso y corneal. Luego se realizó la toracotomía mediante una incisión a nivel del esternón. Con el tórax abierto, rápidamente se realizó un corte a nivel de la aorta para extraer el corazón y colocarlo en la solución correspondiente según al protocolo a seguir.

Preparación de Lisados de Corazón de Rata y Ratón

Luego de realizar las extracciones como se describió en el apartado anterior, cada corazón fue colocado en 4 ml de una solución en frío de Buffer de Inmunoprecipitación (BIP) compuesta por 1% Igepal, 5 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 0,15 M NaCl, 0,5% deoxicolato, 10 mM Tris-HCl con un pH 7,5, además se le añadieron 2 mg/ml de Suero Albúmina Bovina (SAB) e inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free Tablets, Roche) en la concentración indicada por la empresa, es decir, un comprimido cada 10 ml de solución. Seguidamente, se realizaron tres pasos de homogeneización, utilizando un Polytron (Kinematica GMBH, Suiza), de 10 s cada uno, separados por 30 s. Luego, se incubaron durante 10 min para completar la acción del buffer. Todo el procedimiento se realizó en hielo. A continuación, los homogenatos obtenidos se centrifugaron a 1440 g durante 5 min en una centrífuga Beckman G5-6K para separar los restos de tejido no homogeneizados. Los pellets fueron descartados y se conservaron los sobrenadantes como lisados de corazón que posteriormente se utilizaron en los diferentes protocolos.

Células HEK 293

La línea celular HEK 293 son células embrionarias humanas de riñón (sus siglas provienen del inglés, Human Embryonic Kidney cells) muy comúnmente utilizadas debido a su alta eficacia de transfección. Estas células disponibles actualmente para su comercialización fueron generadas originalmente por el grupo de Graham en el año 1977 mediante la transformación con fragmentos de ADN del adenovirus tipo 5 (Ad5). De esta manera, las células HEK 293 han incorporado Ad5 en su cromosoma 19. En el presente trabajo, considerando su alta eficiencia de transfección y que no expresan de manera endógena los intercambiadores AE, se seleccionaron estas células como herramienta de expresión de proteínas.

Preparación de Lisados de Células HEK 293

Las células HEK 293 fueron crecidas en placas de Petri de 60 mm en estufa a 37°C con 5% CO₂ y 95 % de aire húmedo. Se utilizó medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino y 10% de penicilina/estreptomicina. Cuando llegaron a un 80-90% de confluencia, se eliminó el medio DMEM de las placas y se lavó 2 veces con buffer fosfato salino PBS (del inglés, Saline

Phosphate Buffer) estéril cuya composición es 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 2 mM KH_2PO_4 y pH 7.4. Seguidamente, se añadieron 250 μl de buffer BIP con inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free Tablets, Roche) en una concentración de 1 comprimido cada 10 ml y se cosecharon las células utilizando scraper. Luego fueron lisadas mecánicamente utilizando jeringas. Finalmente, se realizó una incubación en hielo durante 10 min para permitir la acción de los componentes del buffer.

Transfección de Células HEK 293

Las células HEK 293 crecieron como se detalla más arriba y 12 h antes de la transfección se cambió el medio por uno de igual composición pero sin agregado de antibióticos. Cuando se llegó a una confluencia del 90% se procedió a la transfección. Se utilizaron diferentes construcciones para expresión en células de mamífero para: ACXIV de ratón (Parkkila, Parkkila et al. 2001), AE3c de rata (Sterling and Casey 1999), AE3fl de rata (Sterling and Casey 1999), AE3-HA de rata (Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1998; Alvarez, Fujinaga et al. 2001) y SLC26A6 de humano (Alvarez, Kieller et al. 2007). Se realizaron transfecciones individuales con ACXIV, AE3c, AE3fl, AE3-HA o co-transfecciones con plásmidos con ADNc de AE3-HA y ACXIV, AE3-HA y ACXIV V159Y mutante. El método utilizado fue el de lipofectamina (Lipofectamin 2000TM transfection reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se siguieron los pasos de acuerdo al manual. Por cada plato de células se preparó una suspensión A compuesta por lipofectamina 4% v/v en medio con suero reducido Opti-MEM[®] y una suspensión B compuesta por 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADNc en el medio Opti-MEM[®]. Para el caso de las transfecciones individuales en la suspensión B se colocó un 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADNc de interés y para completar la cantidad de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se añadió 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de pADNc. Para las co-transfecciones se utilizó 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cada uno de los dos ADNc. Luego se añadió la suspensión B en la suspensión A en una proporción 1:1 y se incubó durante 5 min para permitir la formación de los complejos ADN-lípidos. Seguidamente, la suspensión final se colocó cuidadosamente en gotas sobre las células. Finalmente, se dejaron crecer durante 24 h bajo las condiciones descriptas anteriormente para permitir la expresión de las proteínas de interés codificadas en las construcciones.

Aislamiento de Cardiomiocitos de Rata

Luego de anestesiar a la rata y realizar la toracotomía como se describió más arriba, el corazón fue inyectado rápidamente con 700 μ l de heparina sódica (200 U/ml) para evitar la formación de coágulos y se lo extrajo realizando un corte en la arteria aorta. Inmediatamente fue canulado en un sistema de Langendorff (**Fig. 5**) para realizar una perfusión retrógrada con diferentes soluciones de manera secuencial:

(1) 5 min de solución de lavado Hepes (146,2 mM NaCl, 4,69 mM KCl, 11 mM Glucosa, 10 mM Hepes, 0,35 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,05 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4 con NaOH) con 1,35 mM de CaCl_2 .

(2) 5 min de solución Hepes con 0,1 mM de EGTA (ácido etilenglicoltetraacético).

(3) 15 min de solución de digestión enzimática (Hepes con 0,06 mM CaCl_2 , 0,5 mg/ml de colagenasa, 1 mg/ml de suero albúmina bovina y 0,1 mg/ml de proteasa).

Todas las soluciones se burbujearon con O_2 al 100% y se mantuvo una temperatura de 37°C.

Finalmente, se desmontó el corazón, se lo colocó en la solución de digestión enzimática y se terminó la disgregación del tejido realizando cortes mecánicos y pipeteos. Los cardiomiocitos aislados se resuspendieron en solución Hepes 0,06 mM de CaCl_2 y, para evitar la muerte celular por recalcificación, se realizaron lavados secuenciales con soluciones de concentraciones de calcio crecientes (solución Hepes con 0,12 mM, 0,24 mM y 0,48 mM de CaCl_2). La resuspensión final se realizó en 1 ml de buffer Hepes 1,35 mM de CaCl_2 .

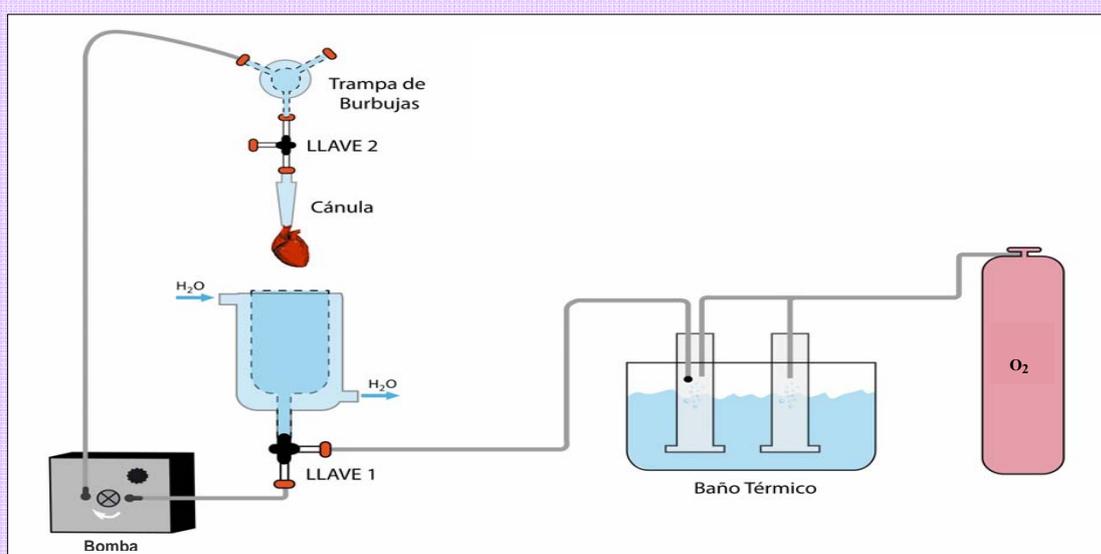


Fig. 5. Esquema de Equipo de Langendorff.

Determinación de pH intracelular en Cardiomiocitos Aislados de Ratas

Para evaluar la actividad del AE3 se realizaron mediciones de pH_i en presencia o ausencia del ión Cl^- con un sistema de epi-fluorescencia utilizando el indicador 2'-7'-bis (2-carboxietil)-5, 6-carboxifluoresceína acetoxi-metil-ester (BCECF-AM). El funcionamiento de este indicador se basa en que en su forma "AM" o acetoxi-metil-ester atraviesa fácilmente la membrana de manera que, una vez en el citosol, las estereasas intracelulares cortan la porción AM para liberar la forma ácida del indicador, que es la que posee la propiedad de fluorescer cuando se combina con el ión H^+ . De esta manera, los cardiomiocitos aislados por el sistema Langendorff descrito más arriba, fueron cargados con 10 $\mu g/ml$ de BCECF-AM e incubados a 37°C durante 20 minutos. Luego se realizó un lavado para eliminar el excedente del indicador y se resuspendieron en 1 ml de solución buffer HCO_3^- con $[Cl^-]$ normal compuesta por: 5 mM KCl, 140 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM gluconato de calcio, 5 mM glucosa, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM Hepes, 2,5 mM NaH_2PO_4 , 1,35 mM $CaCl_2$, pH 7,4, en presencia o ausencia del inhibidor de AC impermeable a membrana, BZ 10 μM .

Los cardiomiocitos cargados fueron colocados en una cubeta ubicada en la platina de un microscopio invertido (Nikon TE 2000-U) y perfundidos con el buffer HCO_3^- con $[Cl^-]$ normal durante 5 min y luego con un buffer libre de Cl^- durante 10 min. El buffer HCO_3^- libre de Cl^- contenía 5 mM gluconato de potasio, 140 mM gluconato de sodio, 1 mM $MgSO_4$, 1,35 mM gluconato de calcio, 5 mM glucosa, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM Hepes, 2,5 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4. Ambos buffers fueron burbujeados continuamente con 5% CO_2 y 95% O_2 . Durante la perfusión los miocitos fueron estimulados con dos electrodos de platino a ambos lados del baño a 0,5 Hz y se excitaron alternativamente a 440 nm y 495 nm con una lámpara de Xenon de 75 watts arc lamp. La fluorescencia emitida de miocitos individuales se colectó con un tubo fotomultiplicador equipado con un filtro a 535 nm. El cociente de fluorescencia a 495 nm y 440 nm se digitalizó a 10 kHz utilizando un software de análisis de fluorescencia, ION WIZARD. Cuando los miocitos son expuestos al buffer libre de Cl^- , el intercambiador AE3 actúa en su forma reversa, es decir, elimina Cl^- hacia el medio extracelular y permite el ingreso HCO_3^- (Boyarsky, Ganz et al. 1988; Jiang, Stuart-Tilley et al. 1994), lo cual produce una alcalinización observada por un aumento del cociente 495/440 de fluorescencia emitida.

Al finalizar cada experimento, se realizó una calibración con el método de alto K^+ -nigericina (Casey, Sly et al. 2009). La solución de alto K^+ contiene 140 mM KCl, 1 mM MgCl, 1,35 mM $CaCl_2$, 5 mM Hepes, 4 mM cianuro de sodio y 20 mM BDM. Además, se añadieron 10 μM de nigericina, un intercambiador de H^+/K^+ que iguala la $[H^+]_e$ con la $[H^+]_i$

cuando el K^+ extracelular e intracelular es el mismo. El pH del buffer se ajustó con KOH o HCl para cuatro diferentes valores entre 6,5 y 7,5. Los valores obtenidos se ajustaron por regresión lineal. Esto permitió transformar las unidades arbitrarias de fluorescencia del cociente 495/440 en unidades de pHi.

La tasa de cambio inicial de pHi provocada por la exposición de las células al buffer libre de Cl^- , se calculó ajustando por regresión lineal los valores de pHi obtenidos durante el primer minuto inmediatamente después de realizar el cambio de buffer $[Cl^-]$ normal a buffer libre de Cl^- . La tasa de HCO_3^- ($J_{HCO_3^-}$ en $mM \cdot min^{-1}$) se calculó con la siguiente ecuación:

$$J_{H^+/HCO_3^-} = \beta_{tot} dpHi/dt$$

donde β_{tot} es la capacidad buffer total que se calcula como la suma de la capacidad buffer intrínseca (β_i) y el poder buffer debido a la relación CO_2/HCO_3^- intracelular (β_{CO_2}). Se consideró que β_{CO_2} es 2,3 veces mayor que la $[HCO_3^-]_i$, asumiendo un sistema abierto con el CO_2 y que sus valores de solubilidad y pK son iguales a ambos lados de la membrana celular. La $[HCO_3^-]_i$ para cualquiera de los valores de pHi se calculó utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch donde:

$$[HCO_3^-]_i = [HCO_3^-]_e \cdot 10^{(pHi - pHe)}$$

β_i se calculó a partir del cambio en la $[HCO_3^-]_i$ producido por la exposición de las células al CO_2 :

$$\beta_i = \Delta[HCO_3^-]_i / \Delta pHi$$

Determinación del pH intracelular en Células HEK 293

Para el estudio del efecto de ACXIV sobre la actividad de AE3 se midieron los cambios de pHi en células HEK 293 transfectadas o sin transfectar (control) en presencia o ausencia del ión Cl^- . Para ello, las células transfectadas o control, mantenidas bajo las condiciones descritas más arriba, se cosecharon y resuspendieron en una solución buffer HCO_3^- con una $[celular] \approx 10 \mu g/ml$. Luego se incubaron con BCECF-AM (10 $\mu l/ml$ de resuspensión celular) durante 20 min a 37°C. Luego se lavaron y se resuspendieron en la solución buffer HCO_3^- con $[Cl^-]$ normal con o sin el inhibidor de AC impermeable a membrana, BZ 10 μm . Seguidamente, en una cubeta que contenía 2 ml de la solución buffer

HCO_3^- libre de Cl^- con o sin BZ ubicada en un espectrofluorómetro, se colocaron 0,1 μg de las células cargadas para inducir la actividad de AE3 en su forma reversa, como se explicó en el apartado anterior. Allí las células se excitaron a 503 nm y 403 nm, y se colectó la fluorescencia emitida a 535 nm a lo largo del protocolo. Las suspensión de células se mantuvo con agitación constante y todas las soluciones buffer fueron burbujeadas continuamente con 5% CO_2 y 95% O_2 .

La actividad de transporte de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de AE3fl-HA se midió durante la alcalinización inducida por la exposición de las células al buffer HCO_3^- libre de Cl^- , en presencia de 30 μM de EIPA (5-(N-etil-N-isopropil) amiloride (Sigma)) para bloquear la actividad de intercambio de NHE1.

El pHi se calculó con el método de alto K^+ -nigericina (Casey, Sly et al. 2009), tal como se explicó en el apartado anterior. La tasa inicial de cambio de pHi por exposición de las células al buffer HCO_3^- libre de Cl^- se calculó por ajuste a una regresión lineal de los valores de pHi durante el primer minuto inmediatamente después de colocar las células en el buffer libre de Cl^- . La tasa de HCO_3^- (JHCO_3^- en $\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$) se estimó como se describe en el apartado anterior. La actividad de transporte de las células control se obtuvo a partir de la tasa total para asegurar que las tasas obtenidas fueron únicamente de la actividad de transporte de AE3-HA. La relación entre la razón de fluorescencia 503 nm/440 nm y el valor de pH obtenido en cada paso fue lineal.

Aislamiento de Membranas Celulares de Corazón de Ratas

Los aislamientos de membranas se prepararon a partir de los ventrículos de corazón de ratas adultas SHR y Wistar. Se procesaron como se explicó anteriormente bajo el subtítulo “preparación de lisados de corazón”. Los homogenatos se centrifugaron a 1.441 x g durante 5 min en una centrífuga Beckman G5-6K. Se tomaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 66.700 x g durante 30 min a 4°C en un rotor Beckman TLA 100.4. La fracción de membrana resultante se resuspendió en 300 μl de PBS.

La concentración de proteínas obtenida se midió en un espectrofluorómetro Qubit (Invitrogen) utilizando el kit Quant-iT protein assay (Molecular Probes/Invitrogen Labeling Detection, Eugene, OR, USA) de acuerdo a las instrucciones del manual.

Co-inmunoprecipitación

Los homogenatos de corazón se centrifugaron a 1.440 x g durante 5 min en una centrífuga Beckman G5-6K. Se tomaron los sobrenadantes y se determinaron las concentraciones de proteínas utilizando el espectrofluorómetro Qubit (Invitrogen). Se tomaron 5 mg de proteínas y se añadieron 50 µl de proteína recombinante G sefarosa (rec-Protein A-Sepharose® 4B Conjugate, Invitrogen) o Proteína A sefarosa (50% slurry). Se incubó durante 3 h a 4°C y, posteriormente, se centrifugó a 8000 x g durante 5 min para eliminar interacciones inespecíficas que pudieran interferir con el experimento. Luego, se incubó el sobrenadante durante toda la noche en agitación a 4°C con 100 µl de proteína G sepharosa o 100 µl de proteína A sefarosa y los siguientes anticuerpos:

- _ anticuerpo policlonal de chivo anti-ACXIV (6 µl, 1.2 µg IgG) ó
- _ suero no inmune (SNI) de chivo (6 µl), ó
- _ anticuerpo policlonal de conejo anti-AE3 (5 µl, 1.5 µg IgG), ó
- _ anticuerpo de conejo anti-AE3c (5 µl, 1.5 µg IgG).

Luego se realizaron lavados secuenciales de la resina con las siguientes soluciones:

- _ Solución 1: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP40, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl.
- _ Solución 2: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.05% SDS
- _ Solución 3: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA.

Finalmente, la resina se resuspendió en igual volumen de SDS/PAGE sample buffer 2X.

Las muestras se corrieron por electroforesis en geles de 7,5% o 10% de poliacrilamida tal como se describe en el apartado “Inmunodetección”. Las membranas de transferencia de PVDF se revelaron con anticuerpo de conejo anti-AE3 (SA8) en una dilución 1:2000, anticuerpo de conejo anti-AE3c de una dilución 1:1000 o con anticuerpo de chivo anti-ACXIV 1:500.

Doble Inmuno-marcación de Miocitos cardíacos de Ratón

Se aislaron miocitos mediante el proceso explicado anteriormente en el apartado “aislamiento de cardiomiocitos de rata”. Luego, las células disociadas se sembraron en portaobjetos de 22x22 mm con laminina (25–50 µg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la adhesión celular. Posteriormente, los miocitos se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% p/vol incubando durante 15 min

a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizó la fijación-permeabilización de los miocitos mediante incubación por 15 min en hielo (-20°C) con metanol al 100% vol/vol. Luego, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con el surfactante no iónico Triton X-100 al 0,1% vol/vol en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS de 5 min cada uno. Luego, se procedió al bloqueo incubando con 5% SAB en PBS durante 20 min (Alvarez, Kieller et al. 2007).

Posteriormente, los miocitos se incubaron con diferentes combinaciones de anticuerpos primarios diluidos 1:100 en una solución de PBS con 0,1% p/vol de gelatina. La incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda para evitar la evaporación de la solución. Los anticuerpos utilizados fueron:

- _ anticuerpo de conejo anti-ACXIV (H-107, Santa Cruz, CA, USA) y anticuerpo de chivo anti-vinculina (N-19, Santa Cruz, CA, USA), ó
- _ anticuerpo de chivo anti-ACXIV y anticuerpo de conejo anti- α -actinina (H300, Santa Cruz, CA, USA), ó
- _ anticuerpo de chivo anti-ACXIV y anticuerpo de conejo anti-AE3 de ratón (AP3).

Luego de la incubación, para eliminar los excedentes de anticuerpos, se realizaron 3 lavados de una duración de 5 min cada uno en PBS 0,2% p/v de gelatina.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpo de pollo anti-conejo conjugado a Alexa Fluor[®] 488 y anticuerpo de pollo anti-chivo conjugado a Alexa Fluor[®] 594 (Life Technologies[™]), ambos en diluciones de 1:200. Estos anticuerpos secundarios poseen la característica de estar conjugados a un fluorocromo fotoestable, brillante y con baja sensibilidad al pH. Finalmente, los miocitos tratados se lavaron 3 veces en PBS 0,2% de gelatina y 2 veces sólo en PBS.

Para el estudio de fluorescencia se montaron y observaron los portaobjetos en microscopio confocal siguiendo los pasos que se explican en el siguiente apartado.

Análisis de Imágenes por Microscopio Confocal

Las células inmunomarcadas fueron montadas utilizando un reactivo ProLong[®] Antifade (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Este reactivo se coloca sobre las muestras ubicadas en portaobjetos para evitar que el indicador fluorescente se disipe durante los experimentos de microscopía de fluorescencia. Además se colocó aceite de inmersión sobre los cubreobjetos y se observaron las muestras con un objetivo X 63 (apertura numérica 1,4, plan Apochromat) con una resolución de 0,5-0,7 μ m de profundidad de campo. Se utilizó un

filtro para integrar las señales colectadas por 4 fotos (7 s/foto) para disminuir el ruido. Las fotos de las muestras se recolectaron con un sistema de imágenes del microscopio confocal Zeiss LSM 510 laser-scanning montado sobre un controlador Axiovert 100M.

Las imágenes se analizaron utilizando el software Image-Pro Plus. El análisis estadístico de co-localización se estudió con el Coeficiente de Correlación de Pearson (Zinchuk, Zinchuk et al. 2007). Este coeficiente es una de las medidas estándar para el reconocimiento de patrones de co-localización y su fórmula es:

$$r = \frac{\sum (S1_i - S1_{prom})(S2_i - S2_{prom})}{\sqrt{\sum (S1_i - S1_{prom})^2 \sum (S2_i - S2_{prom})^2}}$$

Donde S1 representa la intensidad de los pixeles en el canal 1 y S2 representa la intensidad de la señal de los pixeles el canal 2; $S1_{prom}$ y $S2_{prom}$ reflejan el promedio de intensidades de estos respectivos canales. Se utiliza para describir la correlación de las distribuciones de las intensidades entre los canales. Se considera únicamente la similitud de las formas, ignorando las señales de intensidades. Los valores de r entre -0.3 y 0.3 indican poca o ninguna asociación, los valores de r entre 0.3 y 0.7 indican una débil asociación positiva y los valores entre 0.7 y 1.0 indican una fuerte asociación positiva.

Determinación de la Concentración de Proteínas

La concentración de proteínas en las diferentes muestras se midió en un espectrofluorómetro Qubit (Invitrogen) utilizando el kit Quant-iT protein assay (Molecular Probes/Invitrogen Labeling Detection, Eugene, OR, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A partir de diluciones apropiadas de cada una de las muestras se realizaron las determinaciones por triplicado.

Inmunodetección (Western Blot)

— Electroforesis: para la separación electroforética de las proteínas se utilizaron geles de 7,5–12% poliacrilamida (30% acrilamide/Bis Solution, 37,5:1 acrilamide, Bio-Rad), PSA (persulfato de amonio), Buffer Separating (Tris, SDS, pH 8,7) y TEMED. El stacking gel estaba compuesto por Buffer Stacking (Tris, SDS, pH 6,8), acrilamida, TEMED, PSA. Las muestras se prepararon agregando igual volumen de Buffer de Siembra 2X (glicerol, SDS, Tris,

azul de bromofenol, β -mercaptoetanol, pH 6,8). Se sembró un volumen apropiado de las muestras en el gel, más 8 μ L de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad). Para la corrida electroforética se utilizó un Buffer de Corrida (Tris, Glicina) y se realizó a temperatura ambiente a 100 V, suministrados por una fuente de poder PS 251-2 (Sigma-Aldrich).

_ Transferencia: las proteínas separadas por su peso molecular fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore). La transferencia se llevó a cabo empleando un buffer de transferencia (Tris, Glicina, 20% metanol), a 100 V durante 1 h.

_ Bloqueo: las membranas se bloquearon durante 40 min en agitador orbital (Decalab) a temperatura ambiente con solución T-TBS (Tris, NaCl, Tween) con 10% de leche en polvo descremada (Molico) o con 5% SAB, de acuerdo al protocolo.

_ Incubación con anticuerpo primario específico: Las membranas se incubaron con 10 ml de la dilución correspondiente de anticuerpo primario contra la proteína de interés, en T-TBS con 1% de SAB. Este procedimiento se realizó “*over-night*”, a 4°C y con agitación orbital.

_ Lavado del anticuerpo primario: para eliminar el anticuerpo primario que se hubiere adherido inespecíficamente a la membrana, luego de retirar el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con T-TBS a temperatura ambiente en agitador orbital.

_ Incubación con anticuerpo secundario: las membranas se incubaron durante 80 min a temperatura ambiente y con agitación, con 10 ml de la dilución apropiada del anticuerpo secundario correspondiente en T-TBS con 1% de SAB o 5% de leche en polvo descremada. El anticuerpo secundario está acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, del inglés “*Horseradish Peroxidase*”) y está diseñado para reconocer la fracción Fc específica de la especie en la que se obtuvo el anticuerpo primario, haciendo de nexo de esta manera entre la proteína de interés y el sistema posterior de detección.

_ Lavado del anticuerpo secundario: se realizó de la misma manera que el lavado del anticuerpo primario.

_ Revelado: se utilizó el sistema de detección ECL Plus (Amersham) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción se basa en la generación de éster de acridinio a partir de un sustrato, agua oxigenada y la HRP, en las condiciones alcalinas del medio esta sustancia se oxida generando un producto excitado que emite señal quimioluminiscente que puede ser detectada y cuantificada. La detección se realizó mediante la cámara CCD de un equipo Chemidoc XRS (Bio-Rad) que captura y digitaliza las imágenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

_ Cuantificación: se cuantificó la intensidad de las bandas por densitometría utilizando el programa Image J.

RESULTADOS

Asociación Física del Intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ AE3 y la ACXIV

Para estudiar la interacción física entre el intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ AE3 y la ACXIV, primeramente, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP) en homogenatos de corazón de ratón. Como se dijo anteriormente, los mamíferos expresan en el corazón dos isoformas de AE3: AE3fl y AE3c (Linn, Kudrycki et al. 1992). Estas dos isoformas están ampliamente expresadas en la población de miocitos ventriculares y se localizan en el sarcolema, túbulos-T y, en menor medida, en el RS (Alvarez, Kieller et al. 2007). La inmunoprecipitación (IP) se realizó a partir de ventrículos de corazón de ratón utilizando un anticuerpo de chivo anti-ACXIV. Luego, se evaluaron las proteínas inmunoprecipitadas mediante la técnica de Western Blot (WB) utilizando para el revelado un anticuerpo de conejo anti-AE3 Ct. Este último reconoce tanto la isoforma AE3fl como AE3c. **Como resultado se obtuvo que el anticuerpo de chivo anti-ACXIV fue capaz de inmunoprecipitar ambas isoformas, AE3c y AE3fl, de los lisados de corazón de ratón salvaje (Fig. 6).**

Con el objetivo de confirmar que la proteína co-inmunoprecipitada se trataba de AE3, se repitieron las inmunoprecipitaciones a partir de homogenatos de corazón de ratones KO *ae3^{-/-}* (Fig. 6). En los análisis posteriores obtenidos por WB no se detectó la inmuprecipitación de ninguna de las isoformas de AE3 (Fig. 6A). Asimismo, pudo corroborarse la ausencia de expresión de AE3 en el corazón de estos ratones KO *ae3^{-/-}* a partir de resultados de WB realizados con muestras de lisado total de corazón (Fig. 6A).

De manera similar, el SNI de chivo que fue utilizado en reemplazo del anticuerpo de chivo anti-ACXIV, no logró precipitar AE3 de los corazones de ratón (Fig. 6B).

De esta manera, **se demostró la especificidad de la interacción de AE3/ACXIV observada a partir de las inmunoprecipitaciones.**

RESULTADOS

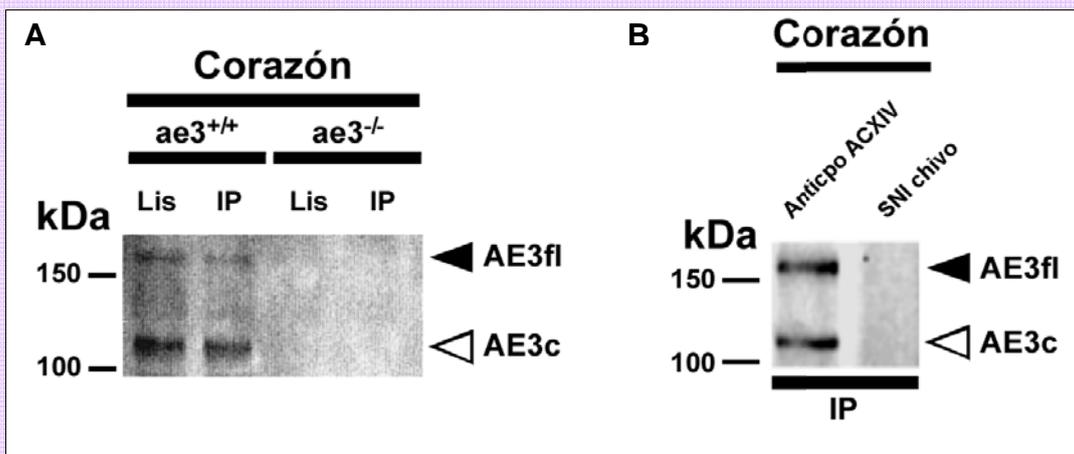


Fig. 6. Asociación física de AE3 y ACXIV en el corazón. CO-IP de lisados de corazón de ratón.

Lisados totales de corazón de ratón (Lis) de $ae3^{+/+}$ o $ae3^{-/-}$ fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpo policlonal contra ACXIV (A). Lisados de corazón de ratón $ae3^{+/+}$ se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra ACXIV o con suero preinmune (B). Luego, se realizó electroforesis de las IP en geles de acrilamida al 7,5%, se transfirieron a membranas de PVDF y se reveló con anticuerpo de conejo policlonal contra AE3 (SA8). En ambas figuras, las isoformas AE3fl y AE3c se indican con una punta de flecha rellena o vacía, respectivamente.

Para descartar que los resultados obtenidos se debían a una diferencia en la expresión de ACXIV entre el corazón de ratón $ae3^{+/+}$ y el corazón de ratón $ae3^{-/-}$ se midió la expresión de ACXIV en lisados de corazón de ambos tipos de ratón a partir de las bandas obtenidas por la técnica de WB. Se **observó una expresión similar de ACXIV en ambos lisados (Fig. 7)**. Se utilizaron lisados de células HEK 293 transfectadas con ADNc de ACXIV como control positivo o con vector vacío, pADNc3, como control negativo (Fig. 7).

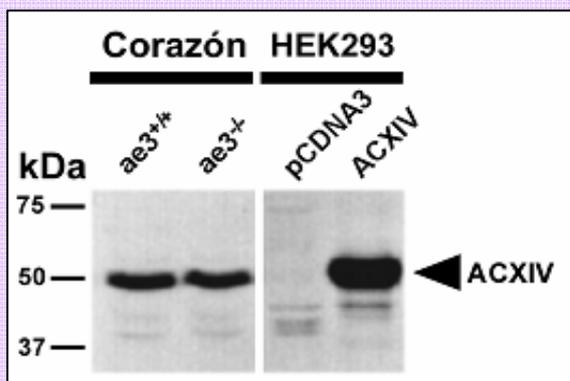


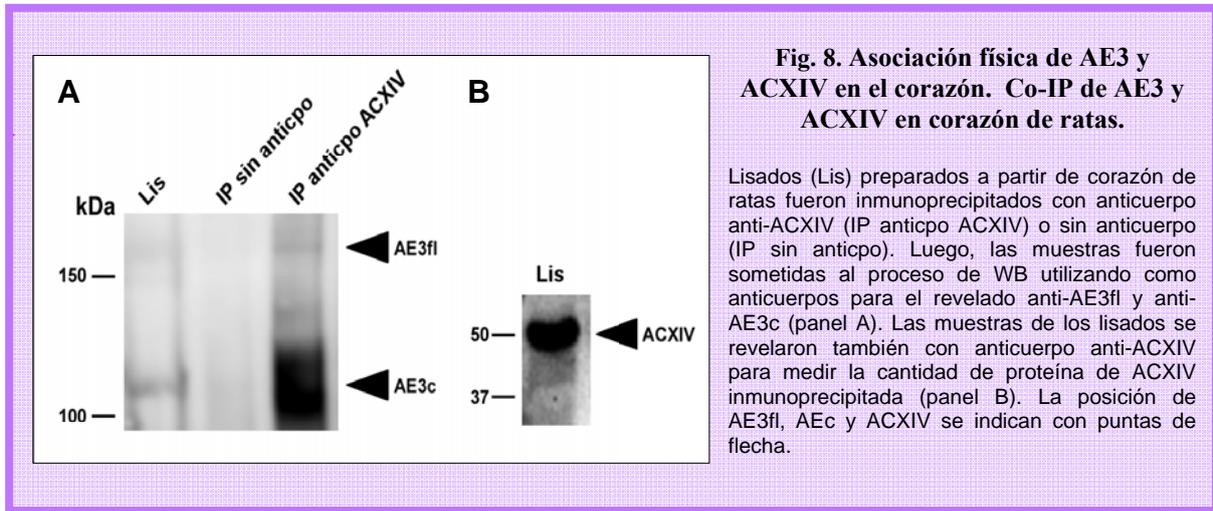
Fig. 7. Asociación física de AE3 y ACXIV en el corazón. Expresión de ACXIV en corazón de ratones $ae3^{+/+}$ y $ae3^{-/-}$.

Lisados preparados a partir de corazón de ratones $ae3^{+/+}$ o $ae3^{-/-}$, o a partir de células HEK 293 transfectadas con vector (pADNc3) o ADNc de ACXIV, fueron analizados en geles de poliácridamida al 10%, transferidos a membrana de PVDF y revelados con anticuerpo contra ACXIV. La posición de ACXIV se indica con una punta de flecha.

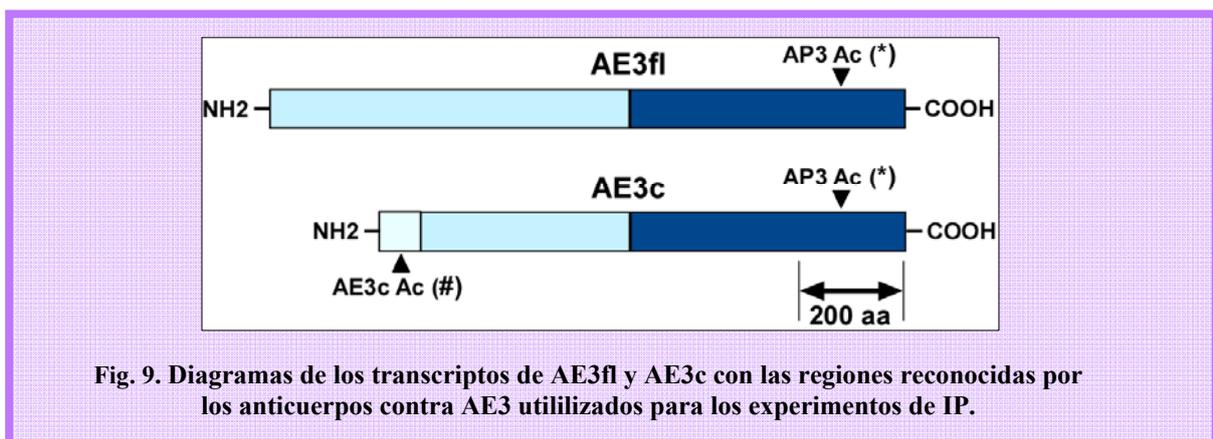
Del mismo modo, se realizaron inmunoprecipitaciones con lisados de corazón de ratas Wistar utilizando anticuerpo de chivo anti-ACXIV. Los resultados obtenidos con la técnica de

RESULTADOS

WB mostraron, al igual que con los experimentos en corazón de ratón, que **las isoformas de AE3c y AE3fl co-inmunoprecipitaron con ACXIV (Fig. 8).**



Asimismo, para confirmar los resultados obtenidos hasta el momento, se realizaron experimentos de co-IP recíprocos, es decir, IP con anticuerpo de conejo anti-AE3 y revelado en WB con anticuerpo de chivo anti-ACXIV a partir de homogenatos de ventrículos de corazón de ratón salvaje y KO $ae3^{-/-}$. En este caso, se utilizaron dos tipos de anticuerpos contra AE3. Uno de ellos, AP3, es un anticuerpo policlonal que se dirige contra la zona Ct que es común a todas las variantes de AE3. El otro anticuerpo, reconoce sólo la isoforma AE3c (Sterling and Casey 1999) (Fig. 9).



Como puede observarse en los inmunoblots de la Fig. 10, **ambos anticuerpos lograron inmunoprecipitar a la proteína ACXIV de los lisados de corazón de ratón salvaje.** En los lisados de corazón de ratón KO $ae3^{-/-}$ no se logró co-inmunoprecipitar

RESULTADOS

ACXIV con ninguno de los dos anticuerpos utilizados contra AE3. Se observa también que la expresión de ACXIV en lisados de corazón de ratones salvajes y KO $ae3^{-/-}$ fue similar. Es decir, los resultados observados de esta IP recíproca no se deben a una diferencia en la expresión de la proteína ACXIV en las dos cepas de ratones utilizadas.

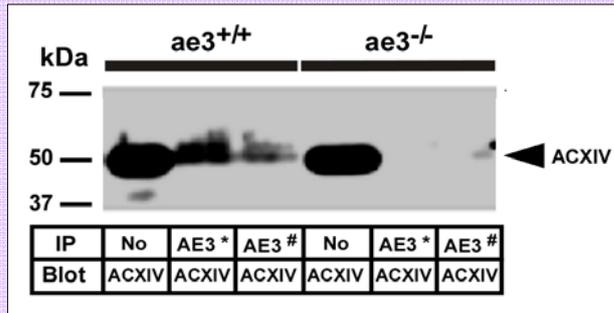


Fig. 10 Asociación física de AE3 y ACXIV en el corazón. IP del complejo AE3/ACXIV de ventrículos de corazón de ratón.

Lisados de ventrículo izquierdo de ratones $ae3^{+/+}$ o $ae3^{-/-}$ se inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpo anti-AE3 (AP3, AE3^{*}) o anticuerpo anti-AE3c (AE3c[#]). Luego, junto con muestras de lisados sin inmunoprecipitar (No), fueron analizados en geles de poliacrilamida al 10%, transferidos a membrana de PVDF y revelados con anticuerpo contra ACXIV (blot). Los geles se cargaron con 50 ul de muestra de lisados de corazón o 50 ul de las muestras obtenidas mediante el proceso de IP a partir de 1,75 ml de lisado de corazón. La posición de ACXIV se indica con una punta de flecha.

Además, utilizando los anticuerpos AP3 y AE3c (presentados en la Fig. 9), se examinaron las expresiones de las dos variantes de AE3, AE3fl y AE3c, en los lisados de corazón de ratones utilizados posteriormente para los experimentos de inmunoprecitación. Para ello, se utilizó la técnica de WB. Como se observa en la Fig. 11, ambas isoformas se detectaron en ratones $ae3^{+/+}$ salvajes, pero no en lisados de corazones de ratones KO $ae3^{-/-}$ con ninguno de los dos anticuerpos utilizados.

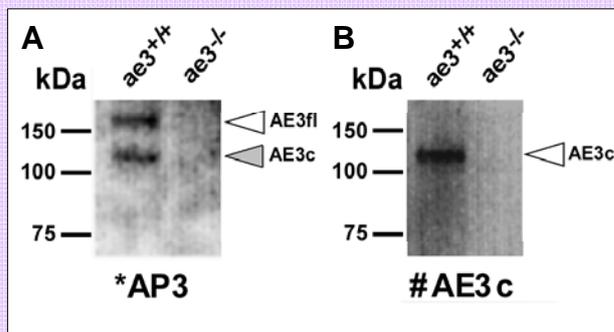


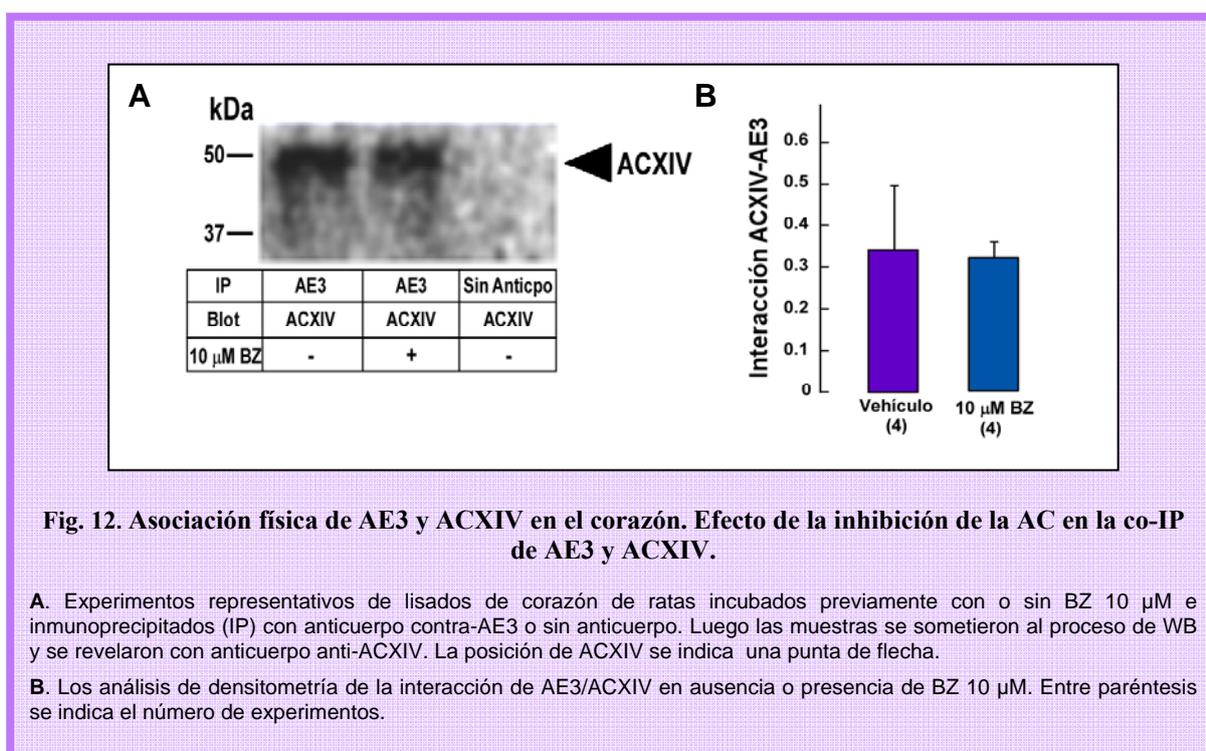
Fig. 11. Asociación física de AE3 y ACXIV en el corazón. Expresión de AE3fl y AE3c en lisados de ventrículos de corazón de ratón.

Los lisados de corazón de ratón $ae3^{+/+}$ y $ae3^{-/-}$ se analizaron por la técnica de WB para evaluar la expresión de AE3fl y AE3c en cada una de las muestras. Se utilizaron anticuerpos anti-AE3 (AP3^{*}) o anticuerpo anti-AE3c (AE3c[#]). La posición de AE3fl y AE3c se indican con puntas de flechas vacías o rellenas, respectivamente.

RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, puede decirse que **ACXIV forma un complejo con las dos isoformas de AE3 expresadas en corazón de rata y ratón adulto, AE3fl y AE3c.**

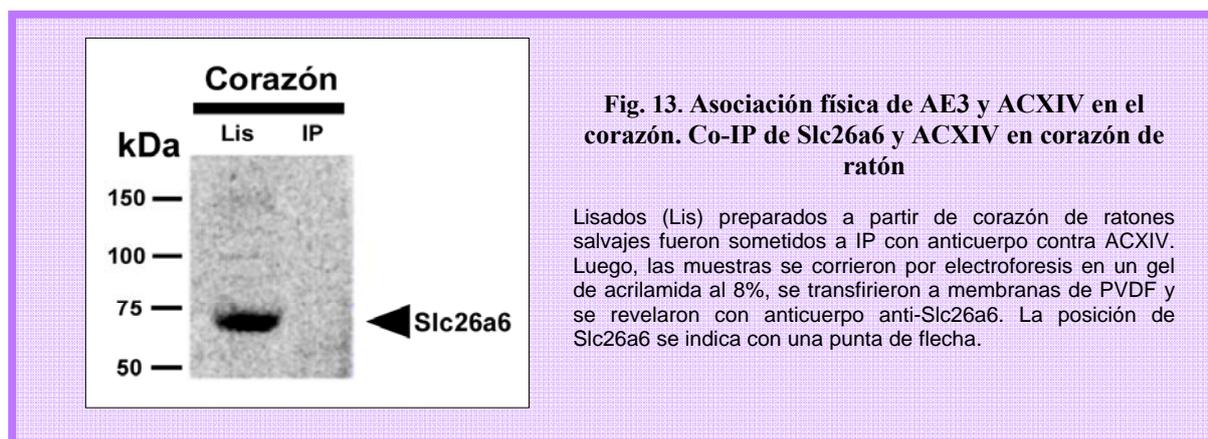
Para evaluar los efectos de la inhibición de la actividad de ACXIV sobre la interacción física AE3/ACXIV, se repitieron los experimentos de co-inmuprecipitación en presencia del inhibidor de AC impermeable a membrana, BZ. Para ello, se utilizaron lisados de corazón de rata Wistar que fueron incubados durante 20 min en presencia de BZ 10 μ M o en presencia sólo del vehículo utilizado para la disolución del inhibidor. Las muestras fueron sometidas al proceso de IP con anticuerpo anti-AE3 o sin anticuerpo. Luego se realizaron inmunoblots con anti-ACXIV como anticuerpo para el revelado. Como se observa en la **Fig. 12A**, ACXIV inmunoprecipitó junto a AE3 tanto en presencia como en ausencia de BZ. Seguidamente, se realizó un análisis cuantitativo determinando la cantidad de ACXIV en el lisado total en el volumen utilizado para la electroforesis con respecto a la cantidad de ACXIV co-inmunoprecipitada mediante la razón: lisado/IP. Los resultados mostraron que la interacción AE3/ACXIV no se modificó con BZ 10 μ M; la razón lisado/IP para la banda de ACXIV sin BZ fue de 0.34 ± 0.15 píxeles y con BZ la razón fue de 0.32 ± 0.04 píxeles.



Estos resultados confirman que el **inhibidor de AC impermeable a membrana, BZ, no interfiere en la interacción AE3/ACXIV.**

RESULTADOS

Como se expresó anteriormente, se han detectado miembros de la familia Slc4a (AE1, AE2 y AE3) en tejidos cardíacos (Puceat, Korichneva et al. 1995; Alvarez, Kieller et al. 2007). De manera más reciente, Slc26a6, un intercambiador dual de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y Cl^-/OH^- perteneciente a la familia Slc26a, ha sido identificado como el intercambiador de aniones predominante en el miocardio de ratón (Alvarez, Kieller et al. 2004). De acuerdo a estudios de inmunofluorescencia, Slc26a6 posee una localización similar a la de AE3 en el miocito ventricular, tanto en el sarcolema como en el sistema tubular transverso (túbulo-T) (Alvarez, Kieller et al. 2007). Slc26a6 también interactúa con la AC citoplasmática, ACII, para formar un MTB (Alvarez, Vilas et al. 2005), tal como lo hacen otros transportadores pertenecientes a la familia de los AE (McMurtrie, Cleary et al. 2004). Debido a su relevancia en lo que respecta a su expresión, localización y actividad en las células cardíacas, y dado que Slc26a6 también posee la habilidad de transportar HCO_3^- , se examinó la posibilidad de asociación de Slc26a6 con ACXIV. Para ello, se realizaron experimentos de coIP en homogenatos de ventrículos de corazón de ratón utilizando anticuerpo de chivo anti-ACXIV. Luego, las muestras fueron analizadas mediante WB revelando con anticuerpo anti-Slc26a6. En la **Fig. 13** se puede observar la banda a 70kD que corresponde a Slc26a6 en lisado de corazón de ratón. En la segunda calle puede observarse que el anticuerpo ACXIV no logró inmunoprecipitar la proteína Slc26a6.



Todos estos resultados reunidos sugieren que ACXIV y AE3 forman un complejo físico, pero Slc26a6 no se asocia con ACXIV en el corazón.

Expresión y Co-localización de AE3 y ACXIV en Secciones de Ventrículo Izquierdo y en Cardiomiocitos Aislados de Ratones Adultos

Para examinar si AE3 y ACXIV co-localizan en el corazón, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia y microscopia confocal en secciones de corazón y cardiomiocitos aislados de ratón. En estudios previos, se ha encontrado que AE3 se localiza en sarcolema y en estructuras intracelulares en secciones de corazón y cardiomiocitos aislados de ratón (Alvarez, Kieller et al. 2007). Además, ha sido reportado que AE3 se encuentra específicamente localizado en invaginaciones del sarcoplasma, los túbulos-T y en el RS. Con respecto a ACXIV, en estudios de fluorescencia se encontró que localiza predominantemente en RS longitudinal y en sarcolema de cardiomiocitos de ratón (Scheibe, Gros et al. 2006). La localización en estas estructuras sugeriría que ACXIV posee un rol crucial en el acomplamiento éxico-contráctil.

Para la realización del experimento se utilizó un anticuerpo de conejo anti-AE3 que reconoce las isoformas AE3fl y AE3c y un anticuerpo de chivo anti-ACXIV; como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos de burro contra IgG de conejo (para AE3) conjugado a un fluoróforo (Alexa Fluor 488) que emite ondas en la zona de color verde del espectro visible y contra IgG de chivo (para ACXIV) conjugado a un fluoróforo que emite ondas en la zona del color rojo (Alexa Fluor 594). Como control de especificidad de los anticuerpos se realizaron experimentos bajo condiciones similares, utilizando sólo anticuerpos secundarios y omitiendo el paso de agregado de anticuerpos primarios. Bajo estas condiciones no se registraron imágenes concretas, sólo autofluorescencia inespecífica basal.

En la **Fig. 14**, puede observarse la localización de ACXIV y AE3 en una sección de corazón. En las imágenes superpuestas se observan zonas de color amarillo, es decir, la zona en la que se superponen los anticuerpos de AE3 (píxeles verdes) y ACXIV (píxeles rojos) (**Fig.14 F**).

RESULTADOS

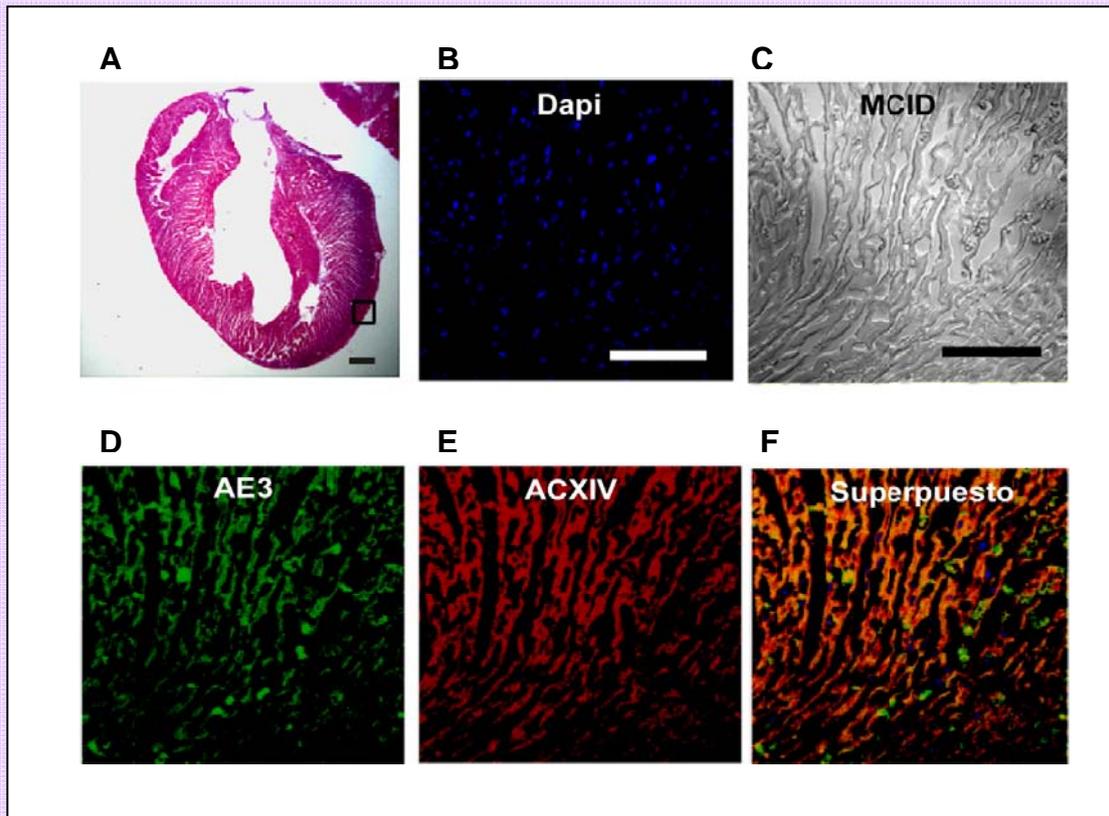


Fig. 14. Localización de AE3 y ACXIV en secciones de ventrículo izquierdo de ratones adultos.

La co-localización de AE3 y ACXIV se estudió en secciones ventriculares (A, D y E) de corazón de ratones mediante la técnica de inmunohistoquímica combinada con microscopía confocal. Se utilizaron anticuerpos específicos anti-AE3 (de conejo, verde) y anticuerpos anti-ACXIV (de chivo, rojo). El grado de colocalización se muestra por el grado de superposición de las señales (F, amarillo). La tinción de núcleos se muestra con Dapi (B). MCID= microscopía de contraste de interferencia diferencial (C).

En cardiomiocitos aislados se observa la expresión de AE3 y ACXIV a lo largo del sarcolema y en compartimientos intracelulares (Fig. 15 A). En las imágenes de superposición pueden observarse (en amarillo) extensas zonas de co-localización a lo largo de la membrana sarcolemal de los cardiomiocitos. Por el contrario, se observa que ACXIV y AE3 co-localizan débilmente en compartimientos intracelulares.

Seguidamente, se realizó un análisis cuantitativo de la superposición de AE3 y ACXIV en los cardiomiocitos marcados doblemente con anti-AE3 y anti-ACXIV utilizando el software Image Pro-Plus. El diagrama de dispersión presentado en la Fig. 15 B muestra un alto grado de superposición (amarillo) entre los píxeles de color verde (AE3) y los píxeles de color rojo (ACXIV), sugiriendo co-localización de ambas proteínas. El grado de asociación entre AE3 y ACXIV fue representado por el coeficiente de Correlación de Pearson (r), donde los valores de r entre -0.3 y 0.3 indican poca o ninguna asociación, los valores de r entre 0.3 y

RESULTADOS

0.7 indican una débil asociación positiva y los valores entre 0.7 y 1.0 indican una fuerte asociación positiva. El valor de r obtenido para la asociación entre AE3 y ACXIV fue de 0.77 ± 0.01 ($n=10$), lo cual sugiere un alto grado de co-localización. Por el contrario, se encontró que AE3 y ACXIV co-localizan débilmente en estructuras del interior celular, lo cual sugiere que, a nivel intracelular, AE3 y ACXIV están específicamente localizados en diferentes compartimientos dentro del RS y los túbulos-T.

También se cuantificó la co-localización de ACXIV/Vinculina y ACXIV/ α -actinina. ACXIV mostró una fuerte co-localización con Vinculina ($r=0.94 \pm 0.01$, $n=9$) y una débil co-localización con α -actinina ($r=0.29 \pm 0.06$, $n=7$). Adicionalmente, se cuantificó la co-localización de ACXIV y el intercambiador de Na^+/H^+ NHE1, que se encuentra en membrana sarcolemal, y el coeficiente de Correlación de Pearson mostró una asociación positiva débil entre el transportador y la AC ($r=0.40 \pm 0.05$, $n=7$).

A partir de los resultados obtenidos puede concluirse que AE3 y ACXIV co-localizan fuertemente en sarcolemas de cardiomiocitos.

Considerando los datos obtenidos hasta el momento, se puede sugerir que el intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3 y la enzima catalizadora ACXIV se encuentran físicamente acoplados formando un componente extracelular del MTB en el corazón. De todas maneras, cabe aclarar, que la resolución del sistema óptico usado en el presente trabajo no es lo suficientemente alta para demostrar finalmente la asociación física entre AE3 y ACXIV.

RESULTADOS

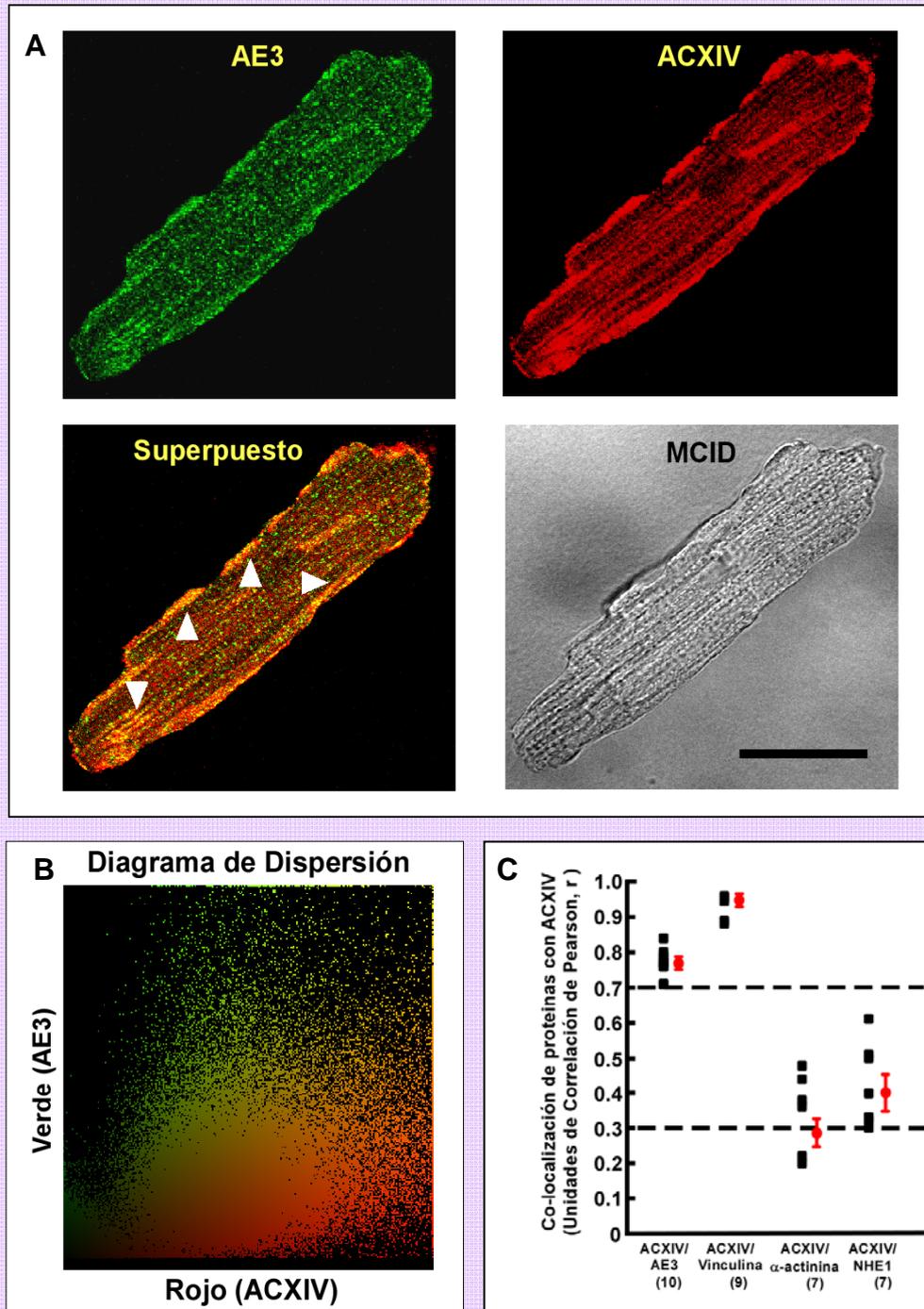


Fig. 15. Localización de AE3 y ACXIV en cardiomiocitos adultos de ratón.

A. Cardiomiocito de ratón adulto con doble inmunomarcación con anticuerpo de conejo contra AE3 (verde) y con anticuerpo de chivo contra ACXIV (rojo). Las señales de inmunofluorescencia se visualizaron con anticuerpo contra IgG de conejo conjugado a Alexa fluor 488 (verde) y anticuerpo contra IgG de chivo conjugado a Alexa fluor 594 (rojo). Las imágenes se colectaron con microscopio confocal laser-scanning Zeiss LSM, con un objetivo de 63/1.4 en aceite de inmersión. La co-localización de AE3 y ACXIV se observa con una marcación amarilla como resultado de superposición de las imágenes. El marcado observado en sarcolema indica la co-localización de AE3 y ACXIV en un patrón restringido, indicado con puntas de flecha. MCID, Microscopía diferencial de contraste. La barra indica la escala de 30 μ m.

B. El diagrama de puntos de dispersión indica la intensidad de fluorescencia tanto de las señales de los canales verdes como rojos correspondientes a la imagen superpuesta del cardiomiocito entero. Los puntos en diagonal (amarillo) indican la co-localización entre las señales de AE3 (verde) y ACXIV (rojo).

C. El grado de co-localización de AE3, vinculina, alfa-actinina con ACXIV se determinó con el software de análisis de imágenes Image Pro Plus. Los valores representan unidades de Correlación de Pearson (r) que revelan el grado de asociación de los píxeles de las imágenes del confocal (n, número de células analizadas).

RESULTADOS

Expresión de Anhidrasas Carbónicas en el Miocardio Hipertrofico

Se estudió la expresión de diferentes AC para evaluar si sus correspondientes genes podrían estar alterados en el corazón patológico. Para ello, se cuantificaron los niveles de expresión de ACII, ACIV, ACIX y ACXIV en corazón de ratas hipertroficas (SHR) y ratas normales (Wistar) mediante inmunoblots. En la siguiente tabla se encuentran diferentes parámetros correspondientes a los animales utilizados: edad, peso corporal, peso del corazón, índice masa cardíaca (IMC), medido como peso del corazón/peso corporal, y el índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI), medido como peso del ventrículo izquierdo/peso corporal.

Wistar				
Edad (semanas)	Peso Rata (g)	Peso del Corazón (mg)	IMC (mg/g)	IMVI (mg/g)
12±1	289±13	814±40	2.89±0.19	1.89±0.02

SHR				
Edad (semanas)	Peso Rata (g)	Peso del Corazón (mg)	IMC (mg/g)	IMVI (mg/g)
13±1	294±15	1131±29	4.04±0.23	3.17±0.15

Tabla 1. Parámetros obtenidos de las ratas Wistar y SHR. IMC es el índice de masa cardíaca (peso corazón/peso corporal) y IMVI es el índice de masa del ventrículo izquierdo (peso del ventrículo izquierdo/peso corporal).

En los animales de experimentación, previo a ser sacrificados, se determinó el peso corporal. Se encontraron valores similares entre los individuos de cada grupo.

Los corazones de las ratas SHR mostraron una elevada masa corporal y los IMC e IMVI aumentados. Como se explicó anteriormente, estos índices aumentados son parámetros de hipertrofia cardíaca, por lo cual puede decirse que las ratas SHR presentaban hipertrofia del miocardio.

La ACIV es una AC anclada a membrana y la ACII es intracelular. Para evaluar su expresión, se aislaron los ventrículos de ratas, se homogeneizaron y se separaron en dos fracciones: fracción de lisado total (para estudiar ACII) y fracción para aislamiento de membranas (para estudiar ACIV). Ésta última fracción fue luego sometida a centrifugaciones diferenciales para finalmente obtener la fracción de membranas. El análisis de expresión de

RESULTADOS

AC de las diferentes muestras se realizó por WB utilizando anticuerpos anti-ACIV y anti-ACII para el revelado. La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó por densitometría. Los datos se normalizaron midiendo la expresión de α -tubulina para la AC citosólica, ACII y la expresión de Na^+/K^+ ATPasa para la AC de membrana, ACIV. Los resultados mostraron que la expresión de ACII es similar tanto en el miocardio hipertrófico como en el miocardio normal (**Fig. 16 A**). Por su parte, la expresión de ACIV en SHR está ligeramente reducida con respecto a Wistar ($p=0.133$) (**Fig. 16 B**).

ACIX y ACXIV son AC transmembrana y se encuentran localizadas en diferentes regiones a lo largo de la membrana del RS de los cardiomiocitos (Scheibe, Gros et al. 2006). La expresión de ACIX y ACXIV se examinó en lisados de membrana de ventrículos de corazón de ratas Wistar y SHR mediante inmunoblots. La expresión de ACIX fue similar en Wistar y SHR (datos no mostrados). Por el contrario, la expresión de ACXIV aumentó más del 100% e en corazones hipertróficos (**Fig. 16 C**).

Las bandas correspondientes a ACII, ACIV y ACXIV se identificaron ubicando su posición de acuerdo a su peso molecular conocido.

Con los datos obtenidos sobre la expresión de AC se puede concluir que **sólo la expresión de ACXIV, la cual forma parte del complejo MTB junto con AE3, se encuentra aumentada en el corazón hipertrófico de SHR.**

RESULTADOS

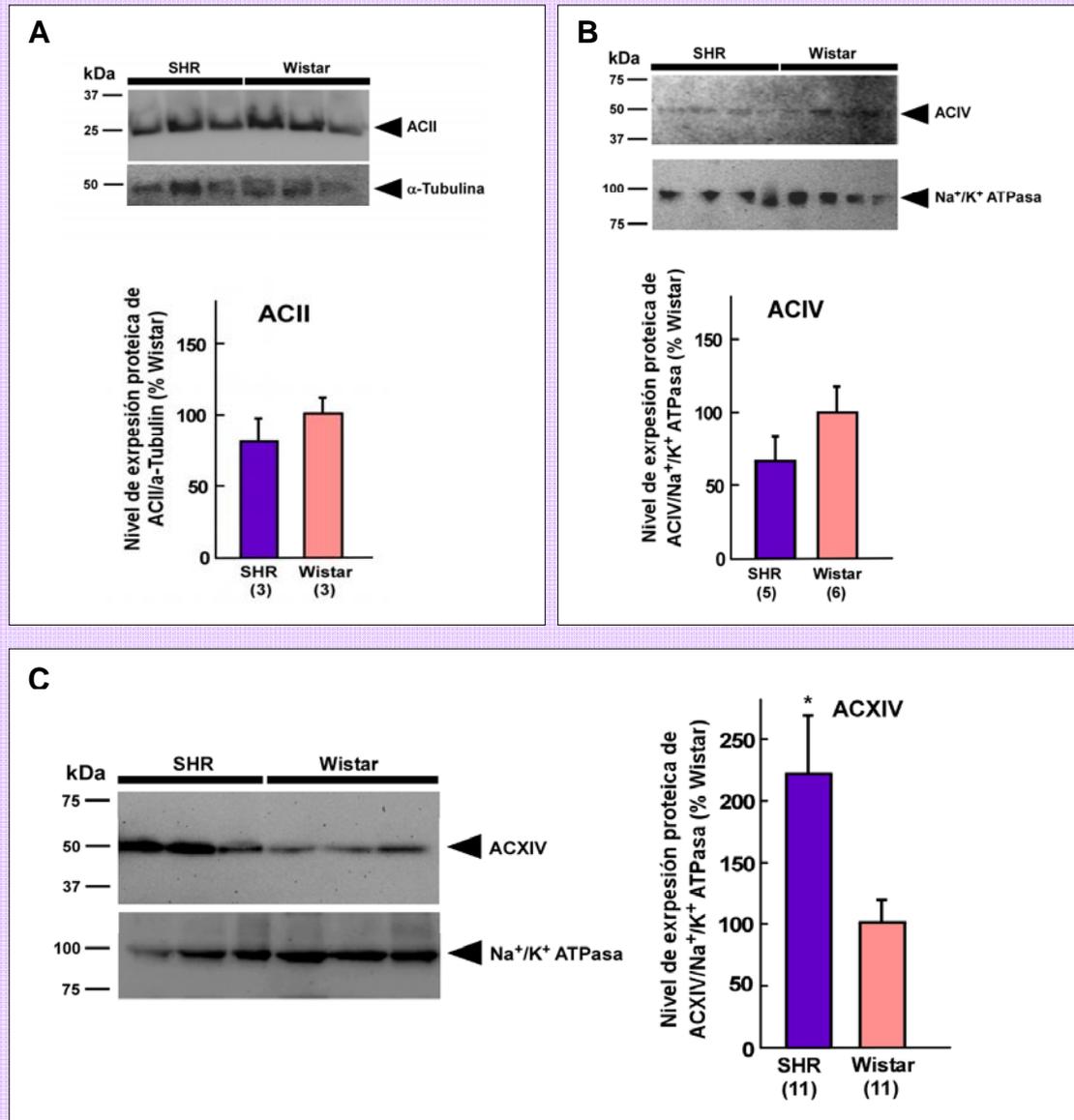


Fig. 16. Expresión de ACII, ACIV y ACXIV en corazón de ratas adultas SHR Y Wistar.

Lisados completos (para ACII, panel **A**) y lisados de membrana (para ACIV y ACXIV, panel **B** y **C**) preparados a partir de ventrículo izquierdo de corazón hipertrofico (SHR) o normal (Wistar). 100 μg de las muestras se sometieron al procedimiento de WB y como revelador de bandas se utilizaron anticuerpos anti-ACII y anti-alfa-tubulina (panel **A**), anti-ACIV y anti- Na^+/K^+ ATPasa (panel **B**) o anti-ACXIV y anti- Na^+/K^+ ATPasa (panel **C**).

Las posiciones de las proteínas se indican con las puntas de flechas. En cada panel se muestran gráficos de barras con los valores de expresión de las proteínas normalizados y relativos a la expresión proteica en corazón de ratas Wistar. Entre paréntesis se muestran el número de corazones analizados.

Rol Funcional del Complejo AE3/ACXIV en el Miocardio de SHR

La actividad aumentada del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ha sido reportada en el miocardio hipertrofico de SHR (Perez, Alvarez et al. 1995). Este aumento de actividad de AE3 fue acompañado de una reducción en la expresión de ARNm del transcripto primario de AE3c y un aumento en la expresión del ARNm de la variante del *splicing* de AE3fl en el

RESULTADOS

miocardio hipertrófico de SHR comparado con el miocardio normal de ratas WKY. No se observaron cambios en la expresión de ARNm de otras isoformas de AE (AE1 y AE2) (Chiappe de Cingolani, Morgan et al. 2001). Por ello, la expresión de AE en ratas hipertróficas SHR es comparable con la expresión de AE en ratas no hipertróficas (Chiappe de Cingolani, Morgan et al. 2001). En el presente estudio, se consideró si el aumento del intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ por AE3 en SHR podría estar asociado al aumento observado de la expresión de ACXIV (ver **Fig. 16 C**) y un consecuente incremento en la formación del complejo AE3/ACXIV en el corazón hipertrófico.

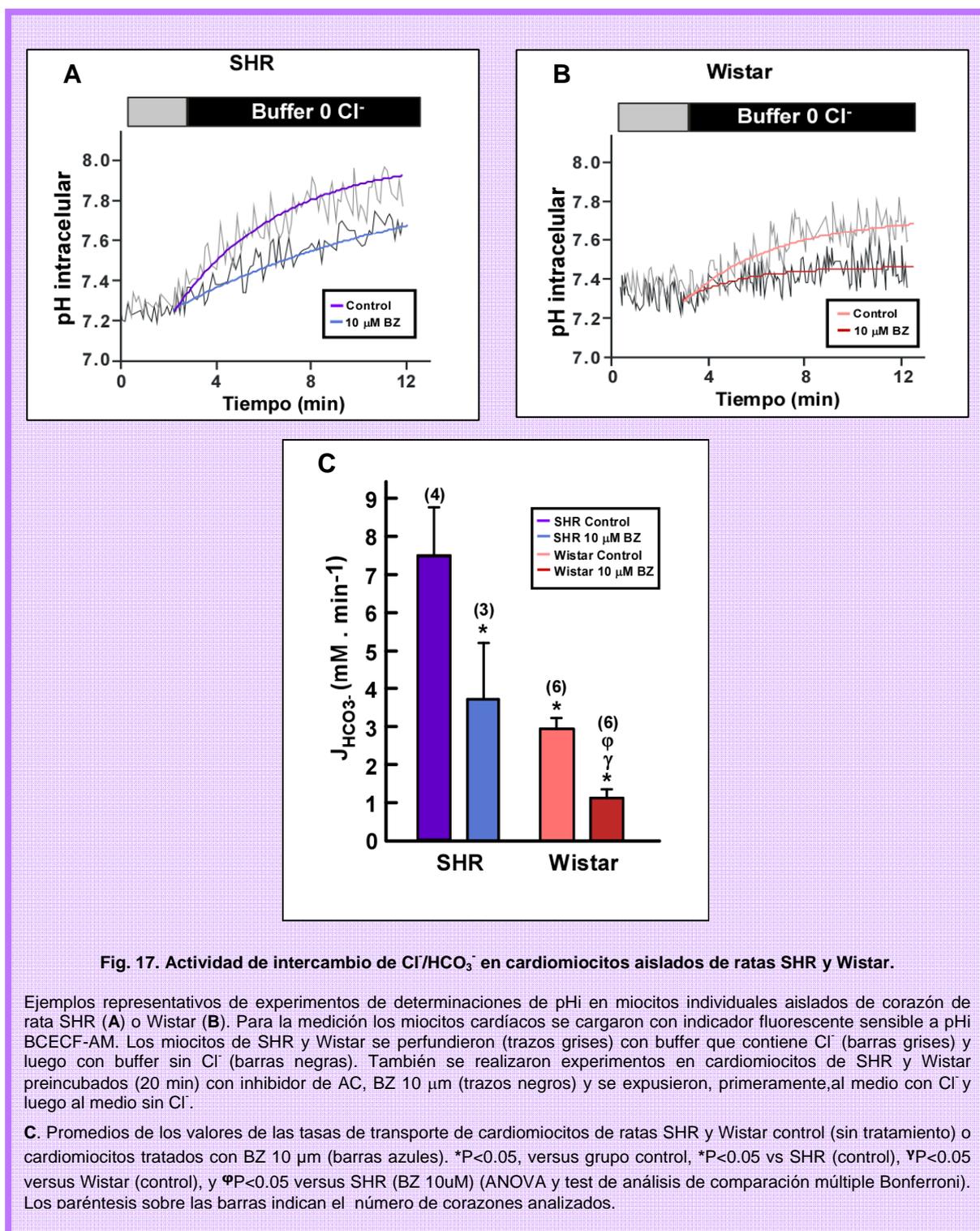
Para examinar esta hipótesis y considerando que el corazón hipertrófico presentó un aumento en la expresión proteica de ACXIV, primeramente, se estudió la actividad de AE3 en cardiomiocitos aislados de corazones normotróficos de ratas Wistar y de corazones hipertróficos de ratas SHR. La actividad del intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3 se midió mediante la determinación del cambio de pHi generado por el ingreso (alcalinización) o eflujo (acidificación) de HCO_3^- a través de la membrana sarcolemal mediado por AE3. Los cardiomiocitos se cargaron con el indicador fluorescente sensible a pH, BCECF-AM, y se perfundieron alternativamente con buffer Ringer con 140 mM de NaCl o con buffer Ringer libre de Cl^- . Los cambios en el gradiente de $[\text{Cl}^-]$ transmembrana, generados por la perfusión con los diferentes buffers (con Cl^- o libre de Cl^-), estimularon la activación de AE3. En condiciones de sobrecarga alcalina, el AE3 actúa en su modo directo, es decir, ingresa Cl^- y expulsa HCO_3^- a través de la membrana plasmática (Puceat, Clement et al. 1991; Xu and Spitzer 1994; Perez, Alvarez et al. 1995). En ausencia de Cl^- extracelular, el AE3 actúa en la forma inversa, eliminando Cl^- de la célula e ingresando iones HCO_3^- , lo cual genera un aumento en el pHi (Boyarsky, Ganz et al. 1988; Jiang, Stuart-Tilley et al. 1994). En la **Fig. 17** se muestran los registros representativos obtenidos en los experimentos realizados en el presente trabajo. Puede observarse el aumento en el pHi por ausencia de iones Cl^- en el medio extracelular cuando los cardiomiocitos fueron expuestos a buffer Ringer libre de Cl^- . Para estimar la tasa de alcalinización inducida por la actividad reversa de AE3 se utilizaron los valores de pHi registrados durante el primer minuto luego de la remoción de iones Cl^- y se ajustaron a una recta. Los flujos se estimaron a partir de un pHi basal similar en los cardiomiocitos de SHR y de Wistar, 7.32 ± 0.02 (n=4) y 7.29 ± 0.17 (n=6), respectivamente (**Fig. 17**). Asimismo, se calculó la capacidad buffer, β , tal como se explicó en la sección de materiales y métodos, y se obtuvieron valores comparables en SHR y Wistar de 62 ± 8 (n=4) y 61 ± 11 (n=6), respectivamente. **El flujo neto de HCO_3^- , determinado como $J_{\text{H}^+/\text{HCO}_3^-} = \beta$**

RESULTADOS

$\Delta p\text{Hi}/dt$, fue mayor para cardiomiocitos de SHR, con un valor de $7.5 \pm 1.3 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ (n=4), siendo $2.9 \pm 0.13 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ (n=6) el valor obtenido para Wistar (Fig. 17 C).

El siguiente paso fue estudiar si ACXIV ejerce algún efecto sobre la actividad de AE3. Para ello, se realizaron experimentos similares para la determinación de la tasa actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE3 en cardiomiocitos de ratas Wistar y SHR, pero en este caso, en presencia o ausencia del inhibidor de AC, BZ ($10 \mu\text{M}$). Este inhibidor de AC posee una permeabilidad reducida a la membrana (Shah, Ulmasov et al. 2005; Svichar, Esquenazi et al. 2006; Svichar, Waheed et al. 2009), por lo cual se lo utilizó en estos experimentos para inhibición de la AC extracelular, ACXIV. En estudios previos, se ha encontrado que, en neuronas del hipocampo, BZ disminuye el flujo de HCO_3^- mediado por AE3 de manera dependiente de ACXIV (Svichar, Waheed et al. 2009). En la Fig. 17 se pueden observar los resultados obtenidos. De manera interesante, en los miocitos de SHR pre-incubados durante 20 min con BZ, el flujo de HCO_3^- se redujo significativamente ($3.7 \pm 1.5 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$, n=3). En los cardiomiocitos control de ratas Wistar también se observó una disminución del flujo de HCO_3^- cuando fueron pre-incubados con BZ ($1.2 \pm 0.2 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$, n=4). **De esta manera, logró probarse la dependencia por la AC del intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE3 en el miocardio de rata.**

RESULTADOS



Teniendo en cuenta que cambios en la expresión proteica de AE3 en cardiomiocitos hipertróficos podrían afectar el flujo de HCO₃⁻ mediado por AE3, se analizó la expresión de AE3fl y AE3c en lisados de ventrículos de corazón de ratas SHR y Wistar (Fig. 18). Para ello, se realizaron inmunoblots de los lisados y se cuantificaron las bandas obtenidas por densitometría. Se utilizó anticuerpo anti-AE3 (SA8) que reconoce las dos isoformas de AE3.

RESULTADOS

Los valores obtenidos se corrigieron por normalización con los niveles de expresión de la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Cada una de las proteínas fue identificada en el inmunoblot de acuerdo a la posición de su migración consistente con el peso molecular conocido de la proteína. La expresión de AEc en corazones de ratas SHR no presentó cambios significativos con respecto a los corazones de ratas normales, $93 \pm 10\%$, (n= 5) y $100 \pm 21\%$ (n= 4), respectivamente, (p= 0.75). Asimismo, los niveles de expresión proteica para AEfl fueron ligeramente reducidos en corazones hipertróficos ($83 \pm 7\%$, n= 5) comparados con su expresión en corazones normales ($100 \pm 11\%$, n= 10) (p= 0.34). Además, se cuantificaron los niveles de expresión de AE3 total, es decir, la suma de AE3c y AE3fl, en los lisados de ventrículos de corazón de rata SHR y Wistar. **La expresión de AE3 total no presentó cambios significativos entre ventrículos hipertróficos ($87 \pm 5\%$, n= 10) y ventrículos normales ($100 \pm 12\%$, n= 8) (p= 0.33). A partir de estos resultados, puede concluirse que el aumento de la actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE3 observado en cardiomiocitos hipertróficos de SHR no es por causa de una modificación en los niveles de expresión proteica de AE3.**

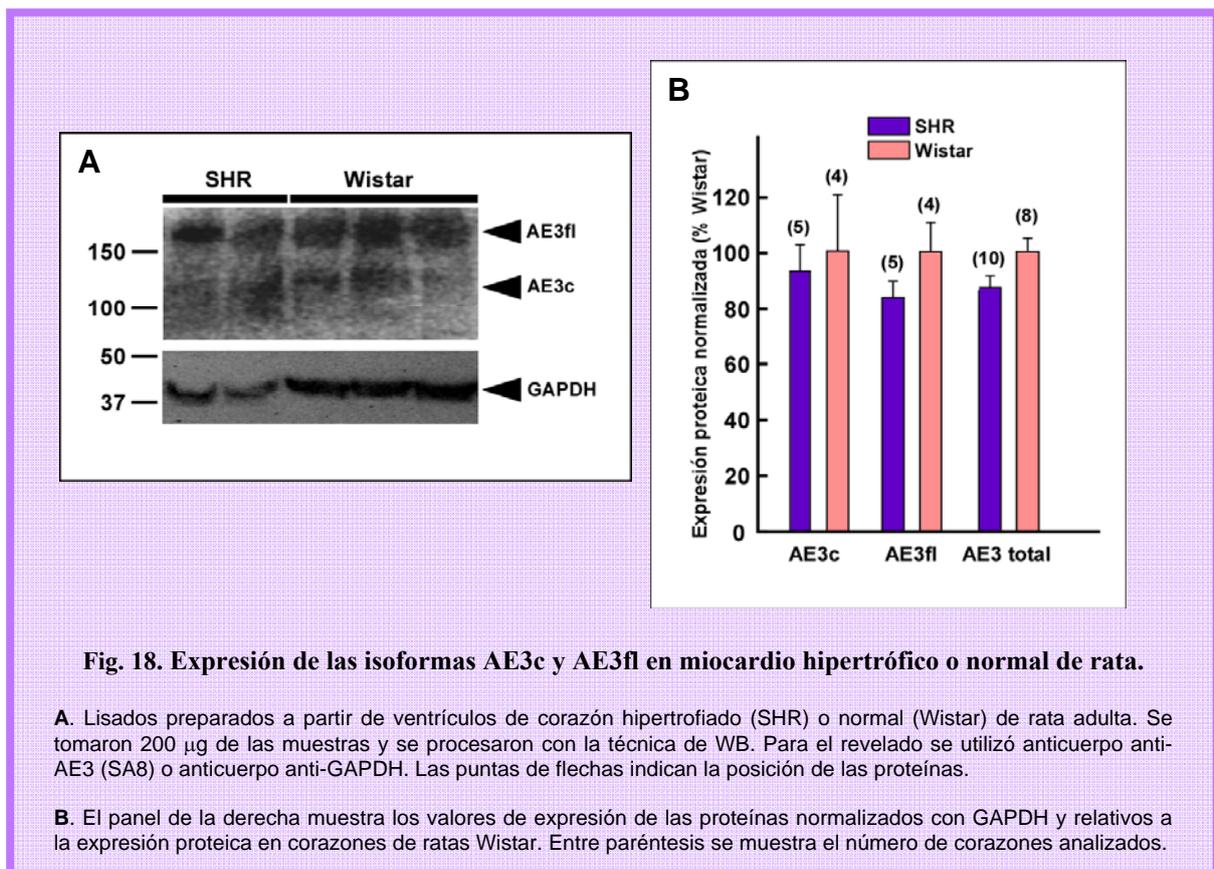


Fig. 18. Expresión de las isoformas AE3c y AE3fl en miocardio hipertrófico o normal de rata.

A. Lisados preparados a partir de ventrículos de corazón hipertrofiado (SHR) o normal (Wistar) de rata adulta. Se tomaron 200 μg de las muestras y se procesaron con la técnica de WB. Para el revelado se utilizó anticuerpo anti-AE3 (SA8) o anticuerpo anti-GAPDH. Las puntas de flechas indican la posición de las proteínas.

B. El panel de la derecha muestra los valores de expresión de las proteínas normalizados con GAPDH y relativos a la expresión proteica en corazones de ratas Wistar. Entre paréntesis se muestra el número de corazones analizados.

RESULTADOS

Por otra parte, se conoce que las células HEK 293 expresan ACII de manera endógena y, como ha sido reportado previamente, la unión de ACII a AE3 en células transfectadas aumenta el flujo de HCO_3^- mediado por AE3 (Sterling, Reithmeier et al. 2001; Casey, Sly et al. 2009). Para descartar la posibilidad que los resultados de los experimentos de determinación de actividad de AE3 se deba a que BZ atraviesa la membrana sarcolemal e inhibe a ACII, se estudió la actividad de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE3 en células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con ADNc de AE3fl-HA (**Fig. 19**). De modo similar a los estudios realizados en cardiomiocitos, se estimuló al intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3 para que funcione en su modo reverso (ingreso de HCO_3^- y extrusión de Cl^-) utilizando un medio extracelular libre de Cl^- y se midió el cambio de pH generado por el ingreso de HCO_3^- . Las células fueron cargadas con el indicador sensible a pH, BCECF-AM, y se incubaron en buffer Ringer con Cl^- . Luego, se colocaron las células en una cubeta con Ringer sin Cl^- y se registró, en un espectrofluorómetro, el transporte de HCO_3^- mediante mediciones en los cambios de pHi generados por los cambios en el gradiente de Cl^- transmembrana. De manera interesante, se encontró que en estas células transfectadas con AE3fl-HA, BZ no alteró significativamente la actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediada por AE3fl-HA, siendo $3.7 \pm 1.1 \text{ mM H}^+ \cdot \text{min}^{-1}$ ($n=11$) en ausencia de BZ y $2.7 \pm 0.7 \text{ mM H}^+ \cdot \text{min}^{-1}$ ($n=7$) en su presencia (**Fig. 19**). Por consiguiente, puede decirse que **BZ no afecta la interacción de ACII-AE3fl-HA, demostrando una muy baja permeabilidad a membrana del inhibidor de AC a la dosis utilizada (10 μM)**. De esta manera, se corrobora que la disminución de actividad de AE3 observada en los experimentos con BZ se debe a los efectos de la inhibición de actividad de AC extracelulares.

Para profundizar este estudio sobre los efectos de ACXIV sobre la actividad de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de AE3, se continuaron realizando ensayos funcionales utilizando las células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con ADNc de AE3fl-HA o co-transfectadas con ADNc de AE3fl-HA y ACXIV. Como puede observarse en los datos presentados en la **Fig. 19, la co-expresión de AE3fl-HA con ACXIV aumentó significativamente (aproximadamente un 100%) la actividad de transporte de HCO_3^- mediado por AE3 comparado con el transporte en las células transfectadas sólo con AE3fl-HA.**

A continuación, se estudió el rol de ACXIV sobre la actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE3 en las células HEK 293 transfectadas en presencia o ausencia del inhibidor, BZ. Se ha reportado que los inhibidores de AC no actúan directamente sobre el intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, si no que ejerce sus efectos sobre la AC (Morgan, Pastorekova

RESULTADOS

et al. 2007). Los resultados obtenidos mostraron que **el aumento de actividad del intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en células HEK 293 que co-expresaban AE3fl-HA/ACXIV fue inhibido con BZ ($3.8 \pm 1.9 \text{ mM H}^+ \cdot \text{min}^{-1}$, $n=7$) (Fig. 19). Esto demuestra un acoplamiento funcional entre AE3 y ACXIV.**

Posteriormente, se examinó si es necesaria la unión a AE3 de una ACXIV funcionalmente activa para maximizar la actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de este transportador. Para tal fin, se expresaron una ACXIV mutante con actividad deficiente (ACXIV V159Y) y AE3fl-HA en las células HEK 293. En estudios previos ha sido demostrado que la ACII inactiva (V143Y) no logró aumentar la actividad de transporte del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE1 (Sterling, Reithmeier et al. 2001; Casey, Sly et al. 2009). Los resultados obtenidos en el presente trabajo (**Fig. 19 B**) mostraron que la inactivación catalítica de ACXIV redujo el transporte mediado por AE3 comparado con el transporte medido en células que expresaban sólo AE3 o que co-expresaban AE-fl-HA y ACXIV. De esta manera, **puede demostrarse que la formación del complejo AE3/ACXIV es importante para la función de transporte de AE3 y que maximiza el intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE3.**

RESULTADOS

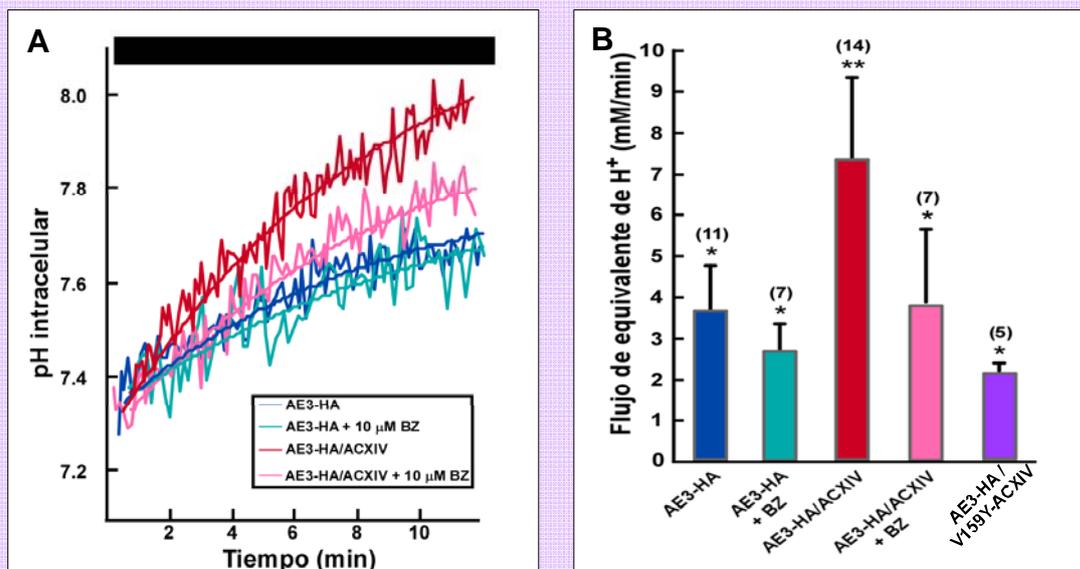


Fig.19. Efecto de la inhibición de la AC sobre la actividad de intercambio de AE3 y AE3/ACXIV.

A. Células HEK 293 transfectadas de manera transitoria con ADNc de AE3fl-HA o co-transfectadas con ADNc de AE3fl-HA y ACXIV. Se cargaron con BCECF-AM y se colocaron en fluorómetro para monitorear el pHi. Las células se mantuvieron en buffer con [Cl⁻] normal y luego fueron transferidas a una cubeta que contenía buffer libre de Cl⁻ (barra superior negra), en presencia o ausencia del inhibidor de AC impermeable a membrana, BZ 10 μM. Los valores iniciales de cambios de pHi durante el primer minuto fueron estimados a partir de la pendiente de la línea ajustada con el método de resta de cuadrados (líneas sobre el trazo)

B. Actividad de transporte de las células HEK 293 que expresaban AE3fl-HA o co-expresan AE3fl-HA y ACXIV o co-expresan AEfl-HA y ACXIV inactiva, V159Y. El transporte se normalizó con la cantidad de proteína de AE3fl-HA expresada. Algunos de los datos representados se obtuvieron en experimentos en presencia de BZ, 10 μM (BZ). La significancia estadística se determinó con ANOVA y con análisis de Comparación Múltiple Newman-Keuls. *P<0.05 comparado con AE3fl-HA. Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

La sobre-expresión de cada una de las proteínas en las células HEK 293 transfectadas transitoriamente se confirmó mediante inmunoblots (**Fig. 20**). Las bandas obtenidas fueron cuantificadas por densitometría. Las tasas de transporte medidas en los ensayos de actividad de AE3 se corrigieron con la expresión total de AE3fl-HA (**Fig. 20**).

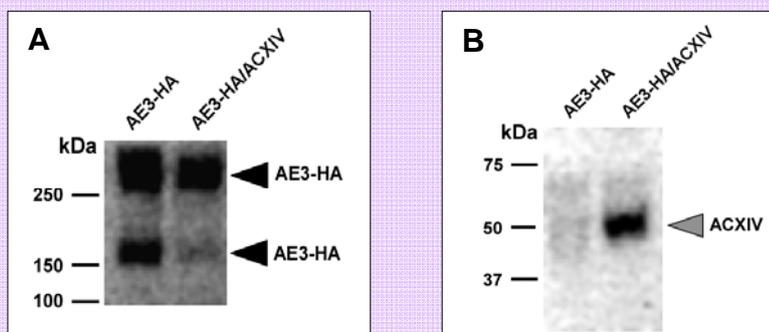


Fig. 20. Expresión de AE-HA y ACXIV en células HEK 293 transfectadas.

Lisados preparados a partir células HEK 293 transfectadas con ADNc de AE3-HA (calle 1), o co-transfectadas con AE3fl-HA y ACXIV (calle 2). Los lisados fueron utilizados para la técnica de WB y se revelaron con anticuerpo anti-AE3-HA (**A**) o anticuerpo anti-ACXIV (**B**). Las puntas de flechas indican la posición de las proteínas.

RESULTADOS

Como se explicó anteriormente, slc26a6 es el intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ más abundante en el corazón de ratón. En el presente trabajo slc26a6 fue claramente identificado y se ha demostrado que no se encuentra físicamente asociado a ACXIV (ver **Fig. 13**). Sin embargo, se realizaron experimentos para eliminar el potencial efecto mediado por ACXIV sobre la función de transporte de slc26a6 en el miocardio de rata. Para ello, se utilizaron las células HEK 293 transfectadas con slc26a6 o co-transfectadas con slc26a6 y ACXIV y se determinó la actividad de transporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de slc26a6. Los resultados obtenidos mostraron que la **actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de slc26a6 es comparable con la actividad de AE3fl-HA**. ($2.9 \pm 0.6 \text{ mM H}^+ \cdot \text{min}^{-1}$, n=5). Sin embargo, **la actividad de transporte de HCO_3^- mediado por slc26a6 en las células que co-expresaban slc26a6 y ACXIV ($3.2 \pm 0.6 \text{ mM H}^+ \cdot \text{min}^{-1}$, n=4) no mostró un aumento con respecto a las células que expresaban sólo slc26a6** (datos no mostrados).

A partir de estos resultados, puede concluirse que de los dos principales intercambiadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ expresados en el corazón de roedores, AE3 y slc26a6, sólo AE3 es susceptible al efecto estimulador de ACXIV.

Considerando cada uno de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone que ACXIV interactúa funcionalmente con AE3, formando un complejo proteico de membrana extracelular. Este complejo se encuentra involucrado en la regulación del metabolismo de HCO_3^- y del pHi en el corazón. Un aumento en la expresión de ACXIV y consecuente aumento en la formación del complejo AE3/ACXIV generaría un intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3 hiperactivo en el miocardio hipertrófico de ratas SHR.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se resumen a continuación:

- Los experimentos de co-IP y co-localización realizados en corazón de rata y ratón han mostrado que la enzima ACXIV interactúa físicamente con las dos isoformas expresadas en el corazón del intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3, AE3c y AE3fl.
- Los experimentos realizados mediante la técnica de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica han mostrado que el metabolón formado por AE3 y ACXIV se localiza en sarcolema de cardiomiocitos de ratón.
- ACXIV no se une ni modifica la actividad de intercambio del transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ predominante en corazón, el Slc26a6. Esto ha sido demostrado mediante experimentos de IP en corazón de ratones y en estudios de determinación de actividad en células HEK 293 transfectadas, respectivamente.
- Mediante experimentos de inmunoblots se encontró que la expresión de ACXIV está aumentada en corazón de ratas SHR con respecto a corazón de ratas Wistar, mientras que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión de ACII, ACIV y ACIX.
- En estudios de determinación de actividad en cardiomiocitos aislados se demostró que el flujo neto de HCO_3^- mediado por AE3 fue mayor en corazón de ratas SHR que en corazón de ratas Wistar.
- Experimentos en inmunoblots mostraron que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión de AE3 entre corazón de ratas SHR y corazón de ratas Wistar.
- Los estudios de determinación de actividad realizados en células HEK 293 transfectadas y en cardiomiocitos aislados mostraron que la ACXIV participa en la actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de AE3.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

- La actividad aumentada de AE3 observada en ratas SHR se adjudica al aumento de la expresión de ACXIV, lo cual generaría un aumento en la formación del complejo AE3/ACXIV.

De esta manera, se ha demostrado que el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE3 y la enzima catalizadora de HCO_3^- , ACXIV, interaccionan tanto física como funcionalmente en el corazón. ACXIV se une al intercambiador AE3 y aumenta su actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

En el presente trabajo de tesis, se ha encontrado que AE3 interacciona físicamente con ACXIV. Este resultado se obtuvo luego de realizar experimentos de co-IP en lisados de corazón de ratón y rata. Cuando la IP se realizó utilizando un anticuerpo contra AE3, se encontró que éste, unido a las esferas de sefarosa, inmunoprecipitó a la proteína AE3 y junto con ella co-inmunoprecipitó ACXIV. Cuando la inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo contra ACXIV, se encontró que éste logró inmunoprecipitar a ACXIV y junto con ella, co-inmunoprecipitó la proteína AE3. Estos resultados de co-inmunoprecipitación y su experimento recíproco sugieren una interacción física entre AE3 y ACXIV. Además, en los experimentos de co-IP realizados con corazón de ratones KO para AE3 no se observó la IP del complejo AE3/ACXIV. De esta manera, puede confirmarse la especificidad de la interacción AE3/ACXIV. Este tipo de interacción entre intercambiadores AE y diferentes isoformas de AC ha sido reportado en trabajos previos (Sowah and Casey 2011; Vince and Reithmeier 1998; Alvarez, Vilas et al. 2005; Morgan, Pastorekova et al. 2007; Casey, Sly et al. 2009; Sowah and Casey; Imtaiyaz Hassan, Shajee et al.)

Puede pensarse que las condiciones en las cuales se realizaron los experimentos de IP no fueron las mismas condiciones fisiológicas en las cuales se encuentran normalmente las proteínas en estudio. Por lo cual, existe la posibilidad que las proteínas modifiquen su conformación, estructura y carga, modificando así las interacciones con otras proteínas. Sin embargo, los protocolos de co-IP han sido aceptados para el estudio de interacción proteína-proteína y en el presente trabajo se han tomado los recaudos necesarios (mantenimiento de pH, trabajo en frío, buffers adecuados) para mantener las proteínas en su estado nativo durante el proceso de IP. Además, los estudios de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica realizados en el presente trabajo sustentan los resultados obtenidos sobre la interacción entre AE3 y ACXIV.

En las imágenes obtenidas por microscopía confocal de secciones de corazón y cardiomiocitos aislados de ratón se observó que AE3 se localiza en membrana sarcolemal,

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

túbulos-T y RS, mientras que ACXIV se encuentra en membrana sarcolemal y RS. Esta distribución ha sido reportada en trabajos previos (Alvarez, Kieller et al. 2004; Alvarez, Kieller et al. 2007). Las imágenes de superposición y su posterior análisis cuantitativo mostraron un alto grado de co-localización entre AE3 y ACXIV en la membrana sarcolemal. Como fue sugerido más arriba, estos datos concuerdan con los resultados de interacción entre AE3 y ACXIV obtenidos en los experimentos de co-IP. Por lo tanto, a partir de estos resultados y los obtenidos en los experimentos de co-IP, puede concluirse que AE3 y ACXIV interactúan físicamente en el miocardio.

Mediante técnicas de inmunoblot, se estudió la expresión de las diferentes isoformas de AC que han sido reportadas en corazón: ACII, ACIV, ACIX y ACXIV. Los resultados mostraron que sólo ACXIV se encuentra con una expresión aumentada ($\approx 100\%$) en ratas SHR comparado con ratas control Wistar. En estudios previos se ha encontrado un aumento de expresión del gen de ACII en ratas con hipertensión espontánea y corazón insuficiente (Sharkey, McCune et al. 2001) y un aumento en la expresión a nivel proteico de ACII en cardiomiocitos de neonatos y adultos con hipertrofia inducida con estimulación adrenérgica (FE) (Alvarez, Johnson et al. 2007). Sin embargo, en el modelo de corazón hipertrófico de rata SHR utilizado en el presente trabajo no se encontró un aumento de expresión de la proteína ACII. Estos resultados de aumento de expresión de ACXIV en corazón de ratas SHR y considerando la interacción física entre AE3 y ACXIV encontrada en el presente trabajo de tesis, sugieren un posible rol para la ACXIV en corazones hipertróficos.

Para profundizar el estudio, se examinó si la interacción AE3/ACXIV posee un rol funcional. Existen diversos estudios en los cuales se ha reportado que la interacción entre diferentes isoformas de AC y AE maximiza la actividad de intercambio de los transportadores. Por ejemplo, en el SNC, ACII y ACIV se asocian con ambas isoformas de AE3 (Casey, Sly et al. 2009) y en el estómago ACIX, ACII y AE2 se asocian para maximizar la secreción de ácidos estimulada por las células parietales gástricas (Morgan, Pastorekova et al. 2007). Estas interacciones funcionales se han reportado como MTI. En el presente trabajo de tesis, se evaluó si la unión de ACXIV a AE3 influye en la actividad de intercambio del transportador. Los resultados obtenidos en los experimentos de determinación de actividad de AE3 en cardiomiocitos aislados mostraron que cuando ACXIV es inhibida con el inhibidor de AC impermeable a membrana, BZ, el flujo de HCO_3^- mediado por AE3 disminuye $\approx 59\%$ en ratas Wistar y $\approx 51\%$ en ratas SHR comparadas con los cardiomiocitos de ratas Wistar y SHR sin

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

BZ, respectivamente. Asimismo, en células HEK 293 co-transfectadas con AE3 y ACXIV se observó un aumento de flujo neto de HCO_3^- comparado con el flujo de HCO_3^- medido en células transfectadas sólo con AE3. Este efecto de aumento de actividad de AE3 fue inhibido cuando dichas células fueron incubadas con BZ. En las células transfectadas sólo con AE3 no se observó ningún efecto provocado por el inhibidor de AC sobre el transporte de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Cabe aclarar que la disminución de actividad observada en las células co-transfectadas con AE3 y ACXIV, en presencia de BZ, no llegó al valor observado en células transfectadas sólo con AE3. Esto puede deberse a que la dosis utilizada de la droga no fue suficiente para inhibir todas las moléculas de ACXIV que se encontraban sobreexpresadas.

Por otra parte, en el presente trabajo, se ha demostrado que el efecto observado de BZ sobre el flujo de HCO_3^- se debe a la inhibición de la función catalítica de la AC y no a la inhibición de la interacción física entre AE3 y ACXIV. En los experimentos se observó que ACXIV co-inmunoprecipitó en la misma cantidad con AE3 tanto en ausencia como en presencia del inhibidor. Esto indicaría que BZ no interfiere en la interacción física de AE3 y ACXIV. Por lo tanto, y teniendo en cuenta los resultados anteriores, puede decirse que la enzima ACXIV activa y unida físicamente a AE3, colabora con la función de transporte de este intercambiador transformando el HCO_3^- en CO_2 . Esto genera un aumento del gradiente de HCO_3^- y, de esta manera, se genera un aumento en la velocidad de transporte de HCO_3^- hacia el exterior celular. Como se explicó anteriormente en la “introducción”, este tipo de cadenas en las cuales el sustrato pasa de manera eficiente de una enzima a la siguiente se conoce como MTI.

Adicionalmente, pudo confirmarse la importancia funcional de la interacción ACXIV/AE3 en células HEK 293 transfectadas. Estas células han sido extensamente utilizadas para estudiar AE debido a que no poseen niveles considerables de expresión endógena de tales intercambiadores (Sterling and Casey 1999). De esta manera, las células HEK 293 fueron transfectadas con AE3 o ACXIV o co-transfectadas con AE3/ACXIV. Se realizaron, además, ensayos paralelos con un dominante negativo, una isoforma de ACXIV mutante, V159Y, la cual era funcionalmente inactiva pero que mantenía la capacidad de unirse a AE3. De este modo, ACXIV mutante podía unirse a AE3 pero sin ejercer su función catalizadora. Los resultados de los estudios realizados mostraron que la unión de ACXIV mutante no produjo el aumento de actividad de AE3. De manera similar, en estudios previos, también realizados en células HEK 293 transfectadas, se demostró que la unión de la ACII activa a AE1 es necesaria para la actividad del intercambiador (Sterling, Reithmeier et al. 2001; Sterling, Reithmeier et al. 2001). En dichos estudios, utilizaron una isoforma mutante

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

de ACII, V143Y, la cual era inactiva funcionalmente. Si bien, ACII es expresada de manera endógena por estas células, ACII mutante se sobreexpresó 20 veces más que ACII endógena, por lo cual, V143Y competía con ACII por el sitio de unión de AE1 y lograba unirse al transportador. De esta manera, ACII mutante interactuaba físicamente con AE1 pero sin ejercer su función catalizadora. Los resultados mostraron que la unión de V143Y reducía la eficiencia de intercambio de AE1. Dado que ACII aún se expresaba de manera endógena, la reducción de la actividad de AE1 no fue completa (Sterling, Reithmeier et al. 2001). Estos resultados indicaron que la unión de ACII funcional aumenta la eficiencia de transporte de AE1. En el presente trabajo, a partir de los experimentos de transfección de células HEK 293 con ACXIV mutante se encontró una reducción casi completa de la actividad de AE3 dado que HEK 293 no expresan de manera endógena esta proteína. Con estos resultados, puede confirmarse la existencia de una interacción funcional entre AE3 y ACXIV.

Por otra parte, se realizaron estudios adicionales para validar los resultados obtenidos en los experimentos con BZ. Se conoce que este inhibidor de AC es impermeable a membrana (Nishimori, Vullo et al. 2005). Para comprobar que no ingresaba al interior celular se realizaron experimentos en células HEK 293 que sobreexpresaban ACII (citósolica) y AE3. Se midió la actividad del transportador en presencia o ausencia de BZ. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre sí. Esto indica que BZ no es capaz de permear, o permea escasamente, la membrana celular y por lo tanto no inhibe a las AC citosólicas como la ACII. Puede afirmarse entonces, que el inhibidor escasamente impermeable a membrana, BZ, en la dosis utilizada en los experimentos realizados en este trabajo, sólo produce la inhibición de AC extracelulares.

Como se explicó en secciones anteriores, la ACXIV no es la única isoforma de membrana en el corazón, si no que ACIV y ACIX también se encuentran dentro de este grupo de AC de membrana expresadas en corazón. Asimismo, ha sido reportado que ACIV y ACIX se asocian con AE3 (Sterling, Alvarez et al. 2002; Morgan, Pastorekova et al. 2007). Entonces, el inhibidor BZ utilizado en los experimentos podría estar inhibiendo a cualquiera de las isoformas de AC de membrana: ACIV, ACIX y ACXIV. Sin embargo, se sugiere que la disminución de la actividad observada en AE3 cuando se utiliza BZ correspondería mayormente a la inhibición de ACXIV. Esto se deduce teniendo en cuenta que, por un lado, en los experimentos realizados en el presente trabajo, se encontró que AE3 y ACXIV interactúan física y funcionalmente. Luego, como se discutió anteriormente, se observó el

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

aumento en la expresión de ACXIV en corazón de ratas SHR comparado con la expresión en ratas Wistar, mientras que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de ACIV y ACIX. Este aumento en la expresión de ACXIV en ratas SHR se correlaciona a su vez, con un aumento de la actividad de AE3 en ratas SHR en comparación con ratas control Wistar. En otros estudios, se reportó que con la utilización de BZ se provocó una disminución de la actividad de AE3 dependiente de ACXIV (Svichar, Waheed et al. 2009). Asimismo, en estudios realizados en fibras musculares de ratón se ha encontrado que un 70% de la actividad de AC total en la membrana sarcolemal corresponde a ACXIV (Wetzel, Scheibe et al. 2007), siendo ACIV el responsable del 30% restante (Hallerdei, Scheibe et al. 2010); (Wetzel, Scheibe et al. 2007; Hallerdei, Scheibe et al.), mientras que ACIX contribuye únicamente a la actividad de AC en los túbulos T del músculo esquelético y no participa en el sarcolema. A partir de experimentos de inhibición de AC extracelulares con BZ en neuronas del hipocampo se ha encontrado que ACIV y ACXIV juegan un rol importante en la regulación del pH en el cerebro, facilitando el intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE3 (Casey, Sly et al. 2009). Por consiguiente, se concluye que el aumento de flujo de HCO_3^- en la membrana sarcolemal de miocitos cardíacos mediado por AE3 corresponde mayormente a la unión y actividad de ACXIV. Cabe aclarar que los experimentos realizados con BZ indican que AE3 depende de la actividad catalítica de AC extracelulares y no se descarta la participación de ACIV y ACIX en la actividad de transporte de AE3 en los cardiomiocitos de ratas. Para discernir la participación de ACIV y ACIX en este MTI habría que realizar mayores estudios.

Slc26A6 es el intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ predominante en miocitos cardíacos (Alvarez, Kieller et al. 2007). De acuerdo a estudios de inmunofluorescencia, Slc26a6 posee una localización similar a la de AE3, en el sarcolema y en los túbulos-T de cardiomiocitos de ventrículo izquierdo (Alvarez, Kieller et al. 2007). Este transportador también interactúa con la AC citoplasmática ACII formando un MTB (Alvarez, Vilas et al. 2005), tal como lo hacen otros AEs (McMurtrie, Cleary et al. 2004). Para estudiar la posibilidad que ACXIV interactuara con Slc26a6 y participe en la actividad de transporte del mismo, se realizaron estudios de co-IP en homogenatos de corazón de ratón. Los resultados mostraron que ACXIV no inmunoprecipita con Slc26A6, lo cual indica que ACXIV no se asocia a este intercambiador. Con estos resultados se confirma que en los estudios de determinación de actividad de AE3 en los cuales se utilizó BZ, la disminución de transporte de HCO_3^- observada se debe a la inhibición indirecta de la actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de AE3 mediante el bloqueo de actividad de ACXIV y se descartan efectos de la participación de actividad de intercambio de Slc26A6 en los resultados obtenidos.

De manera interesante, la interacción de Slc26A6 con ACII se encuentra regulada por PKC. La fosforilación de Slc26A6 por PKC disminuye la interacción de este intercambiador con ACII lo cual reduce el transporte de HCO_3^- . En estudios previos se ha encontrado que Ang II regula el transporte de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediado por AE3fl a través de una vía dependiente de PKC. AE3fl es fosforilado por PKC en ser67 y aumenta la actividad de transporte de AE3fl (Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1998; Alvarez, Fujinaga et al. 2001). Esto sugiere una participación de AE3 en el desarrollo de HC. En el presente trabajo se ha encontrado que ACXIV se une a AE3, aumentando el transporte de HCO_3^- y formando de esta manera, un MTB. Por su parte, Slc26A6 forma un MTB con ACII para maximizar su actividad de transporte de HCO_3^- . Ambos transportadores de HCO_3^- se encuentran, a su vez, regulados por un mecanismo dependiente de PKC. Esto muestra un mecanismo único de regulación inmediata para el transporte a través de la membrana (Alvarez, Vilas et al. 2005).

En la presente tesis se propone que ACXIV forma un complejo funcional tanto con AE3c como con AE3fl. El mecanismo por el cual ACXIV regula el pHi en cardiomiocitos ocurre a través de la remoción del HCO_3^- formado localmente en una zona cercana al intercambiador AE3. De esta manera, se produce un cambio local en el gradiente de HCO_3^- . Previamente, fue demostrado que la unión de ACII a AE3 activa la tasa de transporte de AE3 (Casey, Sly et al. 2009). La actividad conjunta de AE3, ACII y ACXIV maximizarían el gradiente transmembrana de HCO_3^- , el cual es la fuerza impulsora para el transporte mediado por AE (**Fig. 21**). Asimismo, otros transportadores de HCO_3^- expresados en el músculo cardíaco se unirían a ACXIV formando otro MTB y contribuyendo a la regulación del pHi en el corazón. Para corroborar esta hipótesis habría que realizar experimentos *in vivo* adicionales a los que se han realizado en el presente trabajo.

Rol de AE3, ACXIV y el Complejo AE3/ACXIV en Procesos Patológicos Cardíacos

Estudios previos han demostrado que Ang II y ET estimulan la actividad tanto de AE3 como de NHE1 en el músculo cardíaco (Matsui, Barry et al. 1995; Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1998; de Hurtado, Alvarez et al. 2000). Esta estimulación es mediada por la activación de la cascada de señalización de HC. Asimismo, se han encontrado altos niveles de Ang II en el plasma de ratas SHR hipertróficas comparados con los niveles en ratas WKY utilizadas como control (Yoneda, Sanada et al. 2005). Esto llevaría a un aumento de la

actividad de AE3. Igualmente, en ratas SHR tratadas con enalapril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE, del inglés: angiotensin-converting enzyme) (Ennis, Alvarez et al. 1998), se encontró que el aumento de actividad tanto de AE3 como de NHE1 se normalizó a la vez que se produjo regresión de HC. En el presente trabajo, si bien a nivel de expresión de proteínas del transportador AE3 no se observó ninguna diferencia significativa entre corazones hipertróficos y corazones normales, se encontró que la actividad de AE3 está aumentada en corazones hipertróficos de ratas SHR, lo cual condice con los estudios publicados previamente. El aumento de actividad de AE3 en corazones de ratas SHR se correlaciona con el aumento de la expresión de la proteína ACXIV, cuya unión es necesaria para maximizar la actividad de transporte de AE3.

El mecanismo por el cual el agente hipertrofiante Ang II estimula la actividad de AE3 comienza con la estimulación del receptor AT1, liberación de ET, activación del receptor ET1, activación de PLC, liberación de diacilglicerol, activación de PKC (**Fig. 4**) (Schunkert, Sadoshima et al. 1995; Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1998; de Hurtado, Alvarez et al. 2000; Alvarez, Fujinaga et al. 2001). Ésta última molécula produce la fosforilación de AE3fl en el sitio Ser67, ubicado en el dominio citoplasmático Nt, aumentando su actividad de transporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Alvarez, Fujinaga et al. 2001). Por otro lado, PKC permite, además, la activación de la cascada de las MAPK. Una de las MAPK, P38 fosforila NHE1 en Ser703, en el dominio regulatorio Ct, e hiperactiva al intercambiador. Esto lleva a un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ y a la activación en modo reverso de NCX (Alvarez, Perez et al. 1999), lo cual, a su vez, genera un aumento de la $[\text{Ca}^{+2}]_i$. Este aumento del transitorio de Ca^{+2} genera una alteración en la homeostasis iónica que activaría el programa de crecimiento hipertrófico mediante la activación de diferentes factores de transcripción. El aumento de la actividad de NHE1 provocado por la fosforilación por P38, no sólo genera un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$, si no que también tiende a generar un aumento del pH_i debido al eflujo de protones H^+ que se intercambian por cada ión Na^+ que ingresa a la célula. En condiciones fisiológicas, en las cuales hay abundante HCO_3^- , los procesos reguladores de pH dependientes de HCO_3^- se activan al mismo tiempo que ocurre la activación del NHE1 y no se observan aumentos de pH_i (Ganz, Boyarsky et al. 1989; Perez, Alvarez et al. 1995), aunque sí se observan aumentos en la $[\text{Na}^+]_i$ (Jelicks and Gupta 1994). De manera interesante, en el miocardio hipertrófico de ratas espontáneamente hipertensas, SHR, se encontró una elevada actividad de intercambio de Na^+/H^+ mediada por NHE1 la cual estaba compensada por una elevada actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ mediada por AE3 (Perez, Alvarez et al. 1995). En estudios realizados en músculos papilares se bloqueó la actividad de AE3, utilizando un medio libre de

HCO_3^- (Hepes) o anticuerpos anti-AE3, y se observó un aumento de Na^+ junto con un aumento del pHi. Los anticuerpos utilizados fueron diseñados contra el loop III de AE3, es decir, ambas isoformas, AE3c y AE3fl, fueron bloqueadas (Cingolani, Chiappe et al. 2003). La acción combinada de AE3 y NHE1 resultaría, entonces, en una carga neta de NaCl sin cambios de pHi en el miocardio de SHR y en cardiomiocitos estimulados pro-hipertróficamente (Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1998; de Hurtado, Alvarez et al. 2000).

Con respecto a la participación de las AC en procesos patológicos cardíacos, se han reportados diversos trabajos. En el trabajo de Alvarez et al, se ha encontrado un rol para estas enzimas en la respuesta hipertrófica en cardiomiocitos expuestos ante agentes hipertróficos (Alvarez, Johnson et al. 2007). El tratamiento de cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas con el inhibidor de AC, ETZ, inhibió la hipertrofia inducida hormonalmente y logró revertir la hipertrofia una vez establecida. También se encontró que MTZ, otro inhibidor de AC, logró prevenir la hipertrofia en cardiomiocitos adultos (Alvarez, Johnson et al. 2007). Asimismo, se ha reportado el aumento de expresión del gen de ACII en ratas con hipertensión espontánea y corazón insuficiente (Sharkey, McCune et al. 2001). En ratones transgénicos que desarrollan HC mediada por Ang II y cardiomiopatía dilatada por la edad mostraron aumento en la expresión de ARNm de ACII, ACIV, ACVI y ACXIV, además de la forma inactiva ACVIII (Domenighetti AA, R. M. et al. 2004)

Como se explicó anteriormente, el aumento de actividad de intercambio Na^+/H^+ del transportador NHE1 ha sido implicado en el desarrollo de HC (Yoshida and Karmazyn 2000; Kusumoto, Haist et al. 2001; Cingolani and Ennis 2007). Para maximizar su actividad, el NHE1 también requiere de la unión de la enzima ACII, la cual, mediante su acción catalítica, provee de los H^+ sustrato para el intercambiador (Li, Alvarez et al. 2002).

Conclusiones

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, puede sugerirse la participación de ACXIV en la cascada hipertrófica descrita más arriba. En tal sentido, ACXIV contribuiría al aumento de actividad de AE3 mediante su unión al transportador generando un gradiente local transmembrana de HCO_3^- para AE3. La actividad de AE3 asociada a la actividad de NHE1 promueve hipertrofia. Se ha reportado que la hipertrofia programada aumenta la expresión de las enzimas AC en cultivos de cardiomiocitos de ratas

sujetos a estimulación con Ang II y el agonista α -adrenérgico, FE (Alvarez, Johnson et al. 2007).

La unión de ACXIV al intercambiador AE3 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ se desarrolla como un mecanismo eficiente para la homeostasis de HCO_3^- y la regulación del pH en el corazón. La expresión aumentada de ACXIV en corazones hipertróficos de ratas SHR altera el transporte de HCO_3^- mediado por AE3, creando una cascada de retro-alimentación que produce un desbalance iónico.

En la **Fig. 21** se muestra un esquema que resume lo hallado en el presente trabajo: la ACXIV forma un complejo funcional con AE3. El mecanismo por el cual ACXIV regula el pH_i ocurre a través de la eficiente remoción de HCO_3^- formado localmente en una zona extracelular cercana a AE3. Esto puede ocurrir gracias a la actividad enzimática de ACXIV, la cual es una isoforma de AC transmembrana cuyo sitio catalítico se encuentra orientado extracelularmente. De esta manera, se produce un cambio en el gradiente local de HCO_3^- . La ACII citosólica, por su parte, realiza el trabajo inverso, es decir, permite la producción de HCO_3^- en una zona cercana al AE3 desde el interior celular. ACXIV y ACII co-operan para empujar el HCO_3^- hacia el sitio de transporte y luego tirar desde el lado opuesto de la membrana.

En el miocardio normal, el arreglo multi-molecular potencia la actividad de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de AE3 por la producción y remoción de HCO_3^- en el sitio de transporte (**Fig. 21 A**).

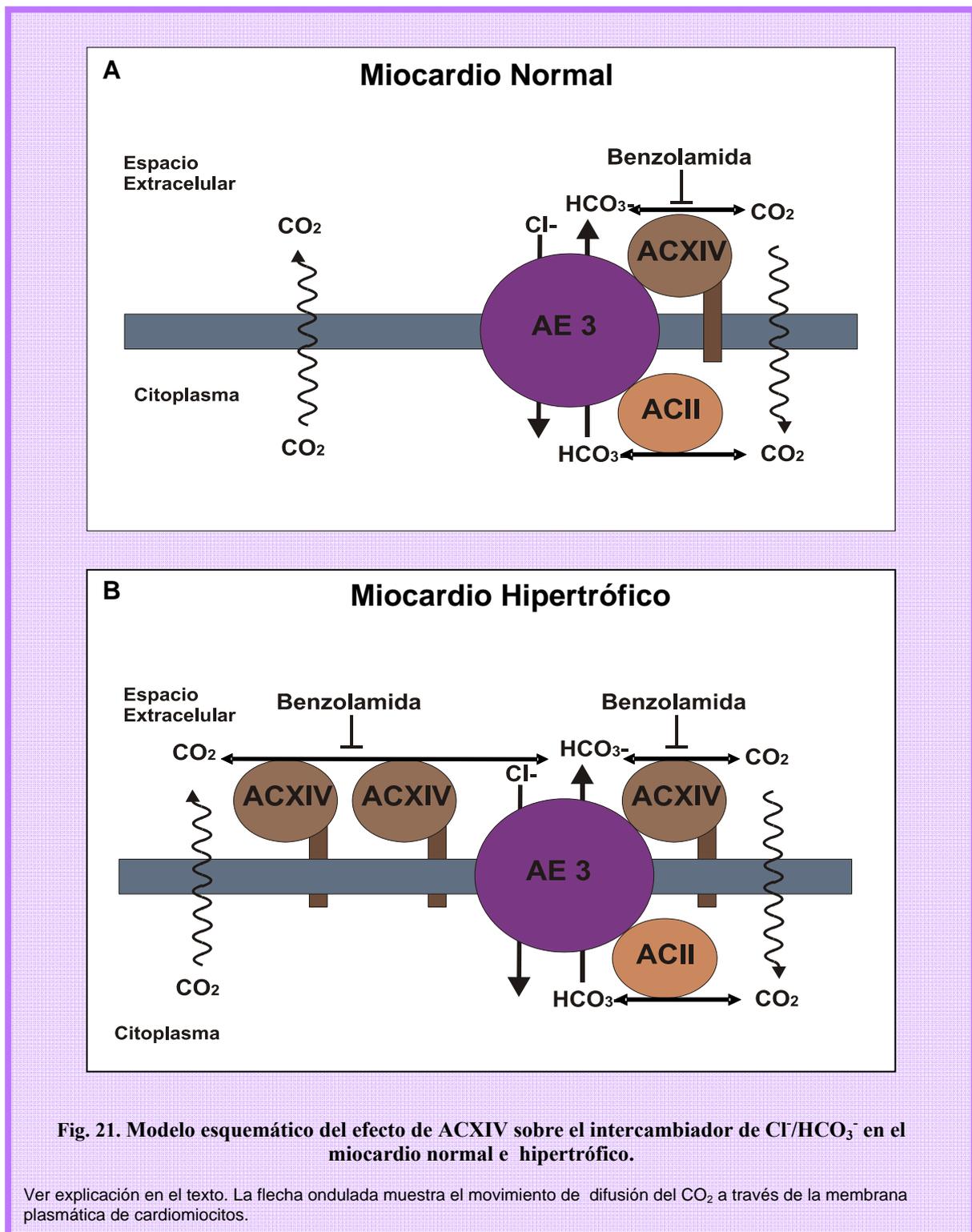
En el miocardio hipertrófico, la expresión proteica de ACXIV se encuentra aumentada y, consecuentemente, la formación del complejo AE3/ACXIV es favorecida, por lo cual aumentaría la actividad de AE3 (**Fig. 21 B**).

BZ, el inhibidor de AC escasamente permeable a membrana, disminuye el intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en el miocardio normal, demostrándose la dependencia del intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de AE3 por la AC extracelular. Además, BZ redujo la elevada actividad de intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ observada en el corazón hipertrófico.

En resumen, la co-activación de NHE1 y AE3 en SHR cargaría a los cardiomiocitos con Na^+ . La activación de AE3 por Ang II (Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1998; Alvarez, Fujinaga et al. 2001) y el aumento de expresión de ACXIV en SHR compensaría el aumento de actividad de NHE1, por lo cual se detecta un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ (Jelicks and Gupta 1994) sin cambios de pH_i (Perez, Alvarez et al. 1995). El aumento de Na^+_i llevaría a un aumento en la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ a través del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ mediado por NCX. Por ello, los cambios en la

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

homeostasis del Ca^{+2} que subyacen la co-activación de NHE1/AE3 en SHR, probablemente a través de la vía calcineurina/NFAT, son un factor crucial en la contribución a la patogénesis de la HC (Ennis, Garcarena et al. 2007). La interrupción de la formación del complejo AE3/ACXIV en SHR podría utilizarse como herramienta terapéutica para prevenir el crecimiento hipertrófico del corazón.



ABREVIATURAS

pHi	pH intracelular
AC	Anhidrasa Carbónica
ACTZ	Acetazolamida
AE, AE1, AE2, AE3,	Intercambiador de Cl⁻/HCO₃⁻, isoforma 1, 2 y 3, respectivamente,
AE3c	AE3 cardíaco
AE3fl	AE3 full length
Ang II	Angiotensina II
BZ	Benzolamida
ET	Endotelina
ETZ	Etozizolamida
FE	Fenilefrina
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol
HC	Hipertrofia Cardíaca
IC	Insuficiencia Cardíaca
KO	Knock Out
MAPK	Proteína Kinasa Activada por Mitógeno
MTB	Metabolón de Transporte de HCO₃⁻
MTI	Metabolón de Transporte Iónico
MTZ	Metazolamida
NBC	Co-transportador de Na⁺/HCO₃⁻
NCX	Intercambiador de Na⁺/Ca⁺²
NHE	Intercambiador de Na⁺/H⁺
PA	Presión Arterial
PKC	Proteína Kinasa C
Receptor AT1	Receptor de Ang II Tipo 1
Receptor ET_A	Receptor de ET Tipo A
RS	Retículo Sarcoplásmico
SHR	Ratas Espontáneamente Hipertensas
SITS	Inhibidor del Intercambio Aniónico
SNC	Sistema Nervioso Central
SNI	Suero No Inmune

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abuladze, N., I. Lee, D. Newman, J. Hwang, K. Boorer, A. Pushkin and I. Kurtz (1998). "Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter." *J Biol Chem* **273**(28): 17689-95.
- Al Moamen, N. J., V. Prasad, I. Bodi, M. L. Neiman, V. M. Lasko, S. L. Alper, D. F. Wieczorek, J. N. Lorenz and G. E. Shull (2011). "Loss of the AE3 anion exchanger in a hypertrophic cardiomyopathy model causes rapid decompensation and heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **50**(1): 137-46.
- Alvarez, B. V., J. Fujinaga and J. R. Casey (2001). "Molecular basis for angiotensin II-induced increase of chloride/bicarbonate exchange in the myocardium." *Circ. Res.* **89**(12): 1246-53.
- Alvarez, B. V., G. S. Gilmour, S. C. Mema, B. T. Martin, G. E. Shull, J. R. Casey and Y. Sauve (2007). "Blindness caused by deficiency in AE3 chloride/bicarbonate exchanger." *PLoS One* **2**(9): e839.
- Alvarez, B. V., D. E. Johnson, D. Sowah, D. Soliman, P. E. Light, Y. Xia, M. Karmazyn and J. R. Casey (2007). "Carbonic anhydrase inhibition prevents and reverts cardiomyocyte hypertrophy." *J. Physiol.* **579**(Pt 1): 127-45.
- Alvarez, B. V., D. M. Kieller, A. L. Quon, D. Markovich and J. R. Casey (2004). "Slc26a6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart." *J Physiol* **561**(Pt 3): 721-34.
- Alvarez, B. V., D. M. Kieller, A. L. Quon, M. Robertson and J. R. Casey (2007). "Cardiac hypertrophy in anion exchanger 1-null mutant mice with severe hemolytic anemia." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(3): H1301-12.
- Alvarez, B. V., F. B. Loiselle, C. T. Supuran, G. J. Schwartz and J. R. Casey (2003). "Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bicarbonate co-transporter." *Biochemistry* **42**(42): 12321-9.
- Alvarez, B. V., N. G. Perez, I. L. Ennis, M. C. Camilion de Hurtado and H. E. Cingolani (1999). "Mechanisms underlying the increase in force and Ca(2+) transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect." *Circ Res* **85**(8): 716-22.
- Alvarez, B. V., A. L. Quon, J. Mullen and J. R. Casey "Quantification of carbonic anhydrase gene expression in ventricle of hypertrophic and failing human heart." *BMC Cardiovasc Disord* **13**: 2.
- Alvarez, B. V., G. L. Vilas and J. R. Casey (2005). "Metabolon disruption: a mechanism that regulates bicarbonate transport." *Embo J* **24**(14): 2499-511.
- Asakura, M., M. Kitakaze, S. Takashima, Y. Liao, F. Ishikura, T. Yoshinaka, H. Ohmoto, K. Node, K. Yoshino, H. Ishiguro, H. Asanuma, S. Sanada, Y. Matsumura, H. Takeda, S. Beppu, M. Tada, M. Hori and S. Higashiyama (2002). "Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy." *Nat Med* **8**(1): 35-40.
- Avvaru, B. S., C. U. Kim, K. H. Sippel, S. M. Gruner, M. Agbandje-McKenna, D. N. Silverman and R. McKenna (2010). "A short, strong hydrogen bond in the active site of human carbonic anhydrase II." *Biochemistry* **49**(2): 249-51.
- Beltrami, A. P., K. Urbanek, J. Kajstura, S. M. Yan, N. Finato, R. Bussani, B. Nadal-Ginard, F. Silvestri, A. Leri, C. A. Beltrami and P. Anversa (2001). "Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction." *N Engl J Med* **344**(23): 1750-7.
- Bertini, I., C. Luchinat, R. Monnanni and A. Scozzafava (1982). "Different behavior of sulfonamides with respect to copper-substituted bovine and human carbonic anhydrases." *J Inorg Biochem* **16**(2): 155-60.

BIBLIOGRAFÍA

- Boriack-Sjodin, P. A., R. W. Heck, P. J. Laipis, D. N. Silverman and D. W. Christianson (1995). "Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase V at 2.45-Å resolution: implications for catalytic proton transfer and inhibitor design." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 10949-53.
- Bourdillon, P. D. and P. A. Poole-Wilson (1982). "The effects of verapamil, quiescence, and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function in ischemic rabbit myocardium." Circ Res **50**(3): 360-8.
- Boyarsky, G., M. B. Ganz, R. B. Sterzel and W. F. Boron (1988). "pH regulation in single glomerular mesangial cells. II. Na⁺-dependent and -independent Cl⁻-HCO₃⁻-exchangers." Am J Physiol **255**(6 Pt 1): C857-69.
- Cabantchik, Z. I. and A. Rothstein (1974). "Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. II. Effects of proteolytic enzymes on disulfonic stilbene sites of surface proteins." J Membr Biol **15**(3): 227-48.
- Camilion de Hurtado, M. C., B. V. Alvarez, N. G. Perez, I. L. Ennis and H. E. Cingolani (1998). "Angiotensin II activates Na⁺-independent Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in ventricular myocardium." Circ Res **82**(4): 473-81.
- Casey, J. R. (2006). "Why bicarbonate?" Biochem Cell Biol **84**(6): 930-9.
- Casey, J. R., P. E. Morgan, D. Vullo, A. Scozzafava, A. Mastrolorenzo and C. T. Supuran (2004). "Carbonic anhydrase inhibitors. Design of selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the human tumor-associated isozyme IX." J Med Chem **47**(9): 2337-47.
- Casey, J. R., W. S. Sly, G. N. Shah and B. V. Alvarez (2009). "Bicarbonate homeostasis in excitable tissues: role of AE3 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and carbonic anhydrase XIV interaction." Am J Physiol Cell Physiol **297**(5): C1091-102.
- Cingolani, H. E. (1999). "Na⁺/H⁺ exchange hyperactivity and myocardial hypertrophy: are they linked phenomena?" Cardiovasc Res **44**(3): 462-7.
- Cingolani, H. E., G. E. Chiappe, I. L. Ennis, P. G. Morgan, B. V. Alvarez, J. R. Casey, R. A. Dulce, N. G. Perez and M. C. Camilion de Hurtado (2003). "Influence of Na⁺-independent Cl⁻-HCO₃⁻ exchange on the slow force response to myocardial stretch." Circ Res **93**(11): 1082-8.
- Cingolani, H. E. and I. L. Ennis (2007). "Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy." Circulation **115**(9): 1090-100.
- Clark, R. E., T. B. Ferguson, P. N. West, R. C. Shuchleib and P. D. Henry (1977). "Pharmacological preservation of the ischemic heart." Ann Thorac Surg **24**(4): 307-14.
- Chegwidden, W. R. and N. D. Carter (2000). "Introduction to the carbonic anhydrases." Exs(90): 14-28.
- Chegwidden, W. R., S. J. Dodgson and I. M. Spencer (2000). "The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals." Exs(90): 343-63.
- Chernova, M. N., L. Jiang, D. J. Friedman, R. B. Darman, H. Lohi, J. Kere, D. H. Vandorpe and S. L. Alper (2005). "Functional comparison of mouse slc26a6 anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity." J Biol Chem **280**(9): 8564-80.
- Chiappe de Cingolani, G., P. Morgan, C. Mundina-Weilenmann, J. Casey, J. Fujinaga, M. Camilion de Hurtado and H. Cingolani (2001). "Hyperactivity and altered mRNA isoform expression of the Cl⁻/HCO₃⁻ anion-exchanger in the hypertrophied myocardium." Cardiovasc Res **51**(1): 71-9.
- Chiappe de Cingolani, G. E., I. L. Ennis, P. E. Morgan, B. V. Alvarez, J. R. Casey and M. C. Camilion de Hurtado (2006). "Involvement of AE3 isoform of Na⁽⁺⁾-independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in myocardial pH(i) recovery from intracellular alkalization." Life Sci **78**(26): 3018-26.

BIBLIOGRAFÍA

- Dart, C. and R. D. Vaughan-Jones (1992). "Na(+)-HCO₃⁻ symport in the sheep cardiac Purkinje fibre." *J Physiol* **451**: 365-85.
- de Hemptinne, A. and R. Marrasses (1979). "Influence of organic acid on intracellular pH [proceedings]." *Arch Int Physiol Biochim* **87**(5): 1010.
- de Hurtado, M. C., B. V. Alvarez, I. L. Ennis and H. E. Cingolani (2000). "Stimulation of myocardial Na(+)-independent Cl(-)-HCO₃⁻ exchanger by angiotensin II is mediated by endogenous endothelin." *Circ Res* **86**(6): 622-7.
- Dodgson, S. J. and R. E. Forster, 2nd (1986). "Carbonic anhydrase: inhibition results in decreased urea production by hepatocytes." *J Appl Physiol* **60**(2): 646-52.
- Dodgson, S. J. and R. E. Forster, 2nd (1986). "Inhibition of CA V decreases glucose synthesis from pyruvate." *Arch Biochem Biophys* **251**(1): 198-204.
- Domenighetti, A. A., M. E. Ritchie, G. Smyth, T. Pedrazzini, J. Proietto and L. M. Delbridge (2004). "Gene expression profiling reveals distinct sets of genes altered during hormonally and metabolically induced cardiac hypertrophies." *J. Mol. Cell. Cardiol* **37**: 303.
- Ennis, I. L., B. V. Alvarez, M. C. Camilion de Hurtado and H. E. Cingolani (1998). "Enalapril induces regression of cardiac hypertrophy and normalization of pHi regulatory mechanisms." *Hypertension* **31**(4): 961-7.
- Ennis, I. L. and E. M. Escudero (2008). Tratado de Cardiología de la Federación Argentina de Cardiología. Sección Hipertensión Arterial. *Hipertrofia Cardíaca*. F. A. d. Cardiología.
- Ennis, I. L., C. D. Garcarena, E. M. Escudero, N. G. Perez, R. A. Dulce, M. C. Camilion de Hurtado and H. E. Cingolani (2007). "Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na⁺/H⁺ exchanger-1 (NHE-1) inhibition." *Can J Physiol Pharmacol* **85**(3-4): 301-10.
- Esbaugh, A. J. and B. L. Tufts (2006). "The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates." *Respir Physiol Neurobiol* **154**(1-2): 185-98.
- Fabiato, A. and F. Fabiato (1978). "Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles." *J Physiol* **276**: 233-55.
- Fleming, R. E., E. C. Crouch, C. A. Ruzicka and W. S. Sly (1993). "Pulmonary carbonic anhydrase IV: developmental regulation and cell-specific expression in the capillary endothelium." *Am J Physiol* **265**(6 Pt 1): L627-35.
- Frey, N., H. A. Katus, E. N. Olson and J. A. Hill (2004). "Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?" *Circulation* **109**(13): 1580-9.
- Frey, N., T. A. McKinsey and E. N. Olson (2000). "Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function." *Nat Med* **6**(11): 1221-7.
- Fry, C. H. and P. A. Poole-Wilson (1981). "Effects of acid-base changes on excitation--contraction coupling in guinea-pig and rabbit cardiac ventricular muscle." *J Physiol* **313**: 141-60.
- Fujikawa-Adachi, K., I. Nishimori, T. Taguchi and S. Onishi (1999). "Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1." *Genomics* **61**(1): 74-81.
- Ganz, M. B., G. Boyarsky, R. B. Sterzel and W. F. Boron (1989). "Arginine vasopressin enhances pHi regulation in the presence of HCO₃⁻ by stimulating three acid-base transport systems." *Nature* **337**(6208): 648-51.
- Gay, C. V., H. Schraer, R. E. Anderson and H. Cao (1984). "Current studies on the location and function of carbonic anhydrase in osteoclasts." *Ann N Y Acad Sci* **429**: 473-8.
- Halestrap, A. P., X. Wang, R. C. Poole, V. N. Jackson and N. T. Price (1997). "Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia." *Am J Cardiol* **80**(3A): 17A-25A.

BIBLIOGRAFÍA

- Hallerdei, J., R. J. Scheibe, S. Parkkila, A. Waheed, W. S. Sly, G. Gros, P. Wetzel and V. Endeward (2010). "T tubules and surface membranes provide equally effective pathways of carbonic anhydrase-facilitated lactic acid transport in skeletal muscle." PLoS One **5**(12): e15137.
- Hefti, M. A., B. A. Harder, H. M. Eppenberger and M. C. Schaub (1997). "Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **29**(11): 2873-92.
- Henry, R. P. (1984). "The function of invertebrate carbonic anhydrase in ion transport." Ann N Y Acad Sci **429**: 544-6.
- Hume, J. R. and R. D. Harvey (1991). "Chloride conductance pathways in heart." Am J Physiol **261**(3 Pt 1): C399-412.
- Imtaiyaz Hassan, M., B. Shajee, A. Waheed, F. Ahmad and W. S. Sly (2012). "Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes." Bioorg Med Chem **21**(6): 1570-82.
- Ishihata, A. and M. Endoh (1993). "Pharmacological characteristics of the positive inotropic effect of angiotensin II in the rabbit ventricular myocardium." Br J Pharmacol **108**(4): 999-1005.
- Jelicks, L. A. and R. K. Gupta (1994). "Nuclear magnetic resonance measurement of intracellular sodium in the perfused normotensive and spontaneously hypertensive rat heart." Am J Hypertens **7**(5): 429-35.
- Jennings, R. B. and A. C. Shen (1972). "Calcium in experimental myocardial ischemia." Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab **1**: 639-55.
- Jiang, L., A. Stuart-Tilley, J. Parkash and S. L. Alper (1994). "pHi and serum regulate AE2-mediated Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in CHOP cells of defined transient transfection status." Am J Physiol **267**(3 Pt 1): C845-56.
- Johnson, R. M. and G. E. Lindskog (1971). "Further studies on factors influencing collateral ventilation." J Thorac Cardiovasc Surg **62**(2): 321-9.
- Kagiyama, S., S. Eguchi, G. D. Frank, T. Inagami, Y. C. Zhang and M. I. Phillips (2002). "Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense." Circulation **106**(8): 909-12.
- Kagiyama, S., K. Qian, T. Kagiyama and M. I. Phillips (2003). "Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy." Hypertension **41**(3 Pt 2): 824-9.
- Karmazyn, M. and M. P. Moffat (1993). "Role of Na⁺/H⁺ exchange in cardiac physiology and pathophysiology: mediation of myocardial reperfusion injury by the pH paradox." Cardiovasc Res **27**(6): 915-24.
- Kaunisto, K., S. Parkkila, H. Rajaniemi, A. Waheed, J. Grubb and W. S. Sly (2002). "Carbonic anhydrase XIV: luminal expression suggests key role in renal acidification." Kidney Int **61**(6): 2111-8.
- Khandoudi, N., J. Albadine, P. Robert, S. Krief, I. Berrebi-Bertrand, X. Martin, M. O. Bevensee, W. F. Boron and A. Bril (2001). "Inhibition of the cardiac electrogenic sodium bicarbonate cotransporter reduces ischemic injury." Cardiovasc Res **52**(3): 387-96.
- Ko, S. B., N. Shcheynikov, J. Y. Choi, X. Luo, K. Ishibashi, P. J. Thomas, J. Y. Kim, K. H. Kim, M. G. Lee, S. Naruse and S. Muallem (2002). "A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis." Embo J **21**(21): 5662-72.
- Kobayashi, S., C. W. Morgans, J. R. Casey and R. R. Kopito (1994). "AE3 anion exchanger isoforms in the vertebrate retina: developmental regulation and differential expression in neurons and glia." J Neurosci **14**(10): 6266-79.

BIBLIOGRAFÍA

- Kohlhardt, M., K. Haap and H. R. Figulla (1976). "Influence of low extracellular pH upon the Ca inward current and isometric contractile force in mammalian ventricular myocardium." Pflugers Arch **366**(1): 31-8.
- Kopito, R. R. (1990). "Molecular biology of the anion exchanger gene family." Int Rev Cytol **123**: 177-99.
- Kopito, R. R., B. S. Lee, D. M. Simmons, A. E. Lindsey, C. W. Morgans and K. Schneider (1989). "Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger." Cell **59**(5): 927-37.
- Kudrycki, K. E., P. R. Newman and G. E. Shull (1990). "cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 Cl-/HCO₃-exchanger." J Biol Chem **265**(1): 462-71.
- Kusumoto, K., J. V. Haist and M. Karmazyn (2001). "Na(+)/H(+) exchange inhibition reduces hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(2): H738-45.
- Kusuoka, H., P. H. Backx, M. Camilion de Hurtado, M. Azan-Backx, E. Marban and H. E. Cingolani (1993). "Relative roles of intracellular Ca²⁺ and pH in shaping myocardial contractile response to acute respiratory alkalosis." Am J Physiol **265**(5 Pt 2): H1696-703.
- Lagadic-Gossmann, D., K. J. Buckler and R. D. Vaughan-Jones (1992). "Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte." J Physiol **458**: 361-84.
- Leem, C. H., D. Lagadic-Gossmann and R. D. Vaughan-Jones (1999). "Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte." J Physiol **517** (Pt 1): 159-80.
- Lemarie, C. A., P. Paradis and E. L. Schiffrin (2008). "New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone." J Mol Med (Berl) **86**(6): 673-8.
- Li, X., B. Alvarez, J. R. Casey, R. A. Reithmeier and L. Fliegel (2002). "Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na⁺/H⁺ exchanger." J Biol Chem **277**(39): 36085-91.
- Li, X., Y. Liu, B. V. Alvarez, J. R. Casey and L. Fliegel (2006). "A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity." Biochemistry **45**(7): 2414-24.
- Lindskog, S. and P. O. Nyman (1964). "Metal-Binding Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases." Biochim Biophys Acta **85**: 462-74.
- Linn, S. C., K. E. Kudrycki and G. E. Shull (1992). "The predicted translation product of a cardiac AE3 mRNA contains an N terminus distinct from that of the brain AE3 Cl-/HCO₃- exchanger. Cloning of a cardiac AE3 cDNA, organization of the AE3 gene, and identification of an alternative transcription initiation site." J Biol Chem **267**(11): 7927-35.
- Loiselle, F. B., P. E. Morgan, B. V. Alvarez and J. R. Casey (2004). "Regulation of the human NBC3 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter by carbonic anhydrase II and PKA." Am J Physiol Cell Physiol **286**(6): C1423-33.
- Matsui, H., W. H. Barry, C. Livsey and K. W. Spitzer (1995). "Angiotensin II stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes." Cardiovasc Res **29**(2): 215-21.
- McMurtrie, H. L., H. J. Cleary, B. V. Alvarez, F. B. Loiselle, D. Sterling, P. E. Morgan, D. E. Johnson and J. R. Casey (2004). "The bicarbonate transport metabolon." J Enzyme Inhib Med Chem **19**(3): 231-6.

BIBLIOGRAFÍA

- Merkle, S., S. Frantz, M. P. Schon, J. Bauersachs, M. Buitrago, R. J. Frost, E. M. Schmitteckert, M. J. Lohse and S. Engelhardt (2007). "A role for caspase-1 in heart failure." *Circ Res* **100**(5): 645-53.
- Miles, E. W., S. Rhee and D. R. Davies (1999). "The molecular basis of substrate channeling." *J Biol Chem* **274**(18): 12193-6.
- Morgan, P. E., S. Pastorekova, A. K. Stuart-Tilley, S. L. Alper and J. R. Casey (2007). "Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters." *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(2): C738-48.
- Mori, K., Y. Ogawa, K. Ebihara, N. Tamura, K. Tashiro, T. Kuwahara, M. Mukoyama, A. Sugawara, S. Ozaki, I. Tanaka and K. Nakao (1999). "Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney." *J Biol Chem* **274**(22): 15701-5.
- Mount, D. B. and M. F. Romero (2004). "The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers." *Pflugers Arch* **447**(5): 710-21.
- Nadal-Ginard, B., J. Kajstura, A. Leri and P. Anversa (2003). "Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure." *Circ Res* **92**(2): 139-50.
- Nagelhus, E. A., T. M. Mathiesen, A. C. Bateman, F. M. Haug, O. P. Ottersen, J. H. Grubb, A. Waheed and W. S. Sly (2005). "Carbonic anhydrase XIV is enriched in specific membrane domains of retinal pigment epithelium, Muller cells, and astrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(22): 8030-5.
- Nakanishi, T., H. Gu, M. Seguchi, E. J. Cragoe, Jr. and K. Momma (1992). "HCO₃⁻-dependent intracellular pH regulation in the premature myocardium." *Circ Res* **71**(6): 1314-23.
- Nishimori, I., D. Vullo, A. Innocenti, A. Scozzafava, A. Mastrolorenzo and C. T. Supuran (2005). "Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the transmembrane isozyme XIV with sulfonamides." *Bioorg Med Chem Lett* **15**(17): 3828-33.
- Okamoto, K. and K. Aoki (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." *Jpn Circ J* **27**: 282-93.
- Okamoto, N., K. Fujikawa-Adachi, I. Nishimori, K. Taniuchi and S. Onishi (2001). "cDNA sequence of human carbonic anhydrase-related protein, CA-RP X: mRNA expressions of CA-RP X and XI in human brain." *Biochim Biophys Acta* **1518**(3): 311-6.
- Okuyama, T., S. Sato, X. L. Zhu, A. Waheed and W. S. Sly (1992). "Human carbonic anhydrase IV: cDNA cloning, sequence comparison, and expression in COS cell membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(4): 1315-9.
- Orchard, C. H. and J. C. Kentish (1990). "Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle." *Am J Physiol* **258**(6 Pt 1): C967-81.
- Parkkila, S., A. K. Parkkila, H. Rajaniemi, G. N. Shah, J. H. Grubb, A. Waheed and W. S. Sly (2001). "Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1918-23.
- Pastorek, J., S. Pastorekova, I. Callebaut, J. P. Mornon, V. Zelnik, R. Opavsky, M. Zat'ovicova, S. Liao, D. Portetelle, E. J. Stanbridge and et al. (1994). "Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment." *Oncogene* **9**(10): 2877-88.
- Pastorekova, S., S. Parkkila, J. Pastorek and C. T. Supuran (2004). "Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects." *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **19**(3): 199-229.
- Perez, N. G., B. V. Alvarez, M. C. Camilion de Hurtado and H. E. Cingolani (1995). "pH_i regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na⁺-H⁺ exchanger." *Circ. Res.* **77**(6): 1192-1200.

BIBLIOGRAFÍA

- Picaud, S. S., J. R. Muniz, A. Kramm, E. S. Pilka, G. Kochan, U. Oppermann and W. W. Yue (2009). "Crystal structure of human carbonic anhydrase-related protein VIII reveals the basis for catalytic silencing." *Proteins* **76**(2): 507-11.
- Ponstingl, H., K. Henrick and J. M. Thornton (2000). "Discriminating between homodimeric and monomeric proteins in the crystalline state." *Proteins* **41**(1): 47-57.
- Poole, R. C., A. P. Halestrap, S. J. Price and A. J. Levi (1989). "The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes." *Biochem J* **264**(2): 409-18.
- Popov, M., L. Y. Tam, J. Li and R. A. Reithmeier (1997). "Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3." *J Biol Chem* **272**(29): 18325-32.
- Puceat, M., O. Clement and G. Vassort (1991). "Extracellular MgATP activates the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in single rat cardiac cells." *J Physiol* **444**: 241-56.
- Puceat, M., I. Korichneva, R. Cassoly and G. Vassort (1995). "Identification of band 3-like proteins and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in isolated cardiomyocytes." *J Biol Chem* **270**(3): 1315-22.
- Puceat, M., S. Roche and G. Vassort (1998). "Src family tyrosine kinase regulates intracellular pH in cardiomyocytes." *J Cell Biol* **141**(7): 1637-46.
- Purkerson, J. M. and G. J. Schwartz (2005). "Expression of membrane-associated carbonic anhydrase isoforms IV, IX, XII, and XIV in the rabbit: induction of CA IV and IX during maturation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**(5): R1256-63.
- Pushkin, A., N. Abuladze, E. Gross, D. Newman, S. Tatishchev, I. Lee, O. Fedotoff, G. Bondar, R. Azimov, M. Nguyen and I. Kurtz (2004). "Molecular mechanism of kNBC1-carbonic anhydrase II interaction in proximal tubule cells." *J. Physiol.*
- Pushkin, A., N. Abuladze, D. Newman, I. Lee, G. Xu and I. Kurtz (2000). "Cloning, characterization and chromosomal assignment of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family." *Biochim Biophys Acta* **1493**(1-2): 215-8.
- Ramasamy, R., Y. Hwang, S. Bakr and S. R. Bergmann (2001). "Protection of ischemic hearts perfused with an anion exchange inhibitor, DIDS, is associated with beneficial changes in substrate metabolism." *Cardiovasc Res* **51**(2): 275-82.
- Reithmeier, R. A. (2001). "A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion exchangers." *Blood Cells Mol Dis* **27**(1): 85-9.
- Reithmeier, R. A., D. M. Lieberman, J. R. Casey, S. W. Pimplikar, P. K. Werner, H. See and C. A. Pirraglia (1989). "Structure and function of the band 3 Cl⁻/HCO₃⁻ transporter." *Ann N Y Acad Sci* **574**: 75-83.
- Romero, M. F., C. M. Fulton and W. F. Boron (2004). "The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters." *Pflugers Arch* **447**(5): 495-509.
- Schaffer, S. W., B. Safer, C. Ford, J. Illingworth and J. R. Williamson (1978). "Respiratory acidosis and its reversibility in perfused rat heart: regulation of citric acid cycle activity." *Am J Physiol* **234**(1): H40-51.
- Scheibe, R. J., G. Gros, S. Parkkila, A. Waheed, J. H. Grubb, G. N. Shah, W. S. Sly and P. Wetzel (2006). "Expression of membrane-bound carbonic anhydrases IV, IX, and XIV in the mouse heart." *J Histochem Cytochem* **54**(12): 1379-91.
- Schluter, K. D. and H. M. Piper (1999). "Regulation of growth in the adult cardiomyocytes." *Faseb J* **13 Suppl**: S17-22.
- Schunkert, H., J. Sadoshima, T. Cornelius, Y. Kagaya, E. O. Weinberg, S. Izumo, G. Riegger and B. H. Lorell (1995). "Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult

BIBLIOGRAFÍA

- rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II." Circ Res **76**(3): 489-97.
- Senes, A., M. Gerstein and D. M. Engelman (2000). "Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions." J Mol Biol **296**(3): 921-36.
- Shah, G. N., B. Ulmasov, A. Waheed, T. Becker, S. Makani, N. Svichar, M. Chesler and W. S. Sly (2005). "Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(46): 16771-6.
- Sharkey, L. C., S. A. McCune, O. Yuan, C. Lange and J. Fray (2001). "Spontaneous pregnancy-induced hypertension and intrauterine growth restriction in rats." Am J Hypertens **14**(10): 1058-66.
- Slepko, E. and L. Fliegel (2002). "Structure and function of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger." Biochem. Cell. Biol **80**(5): 499-508.
- Sly, W. S. and P. Y. Hu (1995). "Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies." Annu Rev Biochem **64**: 375-401.
- Sowah, D. and J. R. Casey (2011). "An intramolecular transport metabolon: fusion of carbonic anhydrase II to the COOH terminus of the Cl(-)/HCO₃(-)-exchanger, AE1." Am J Physiol Cell Physiol **301**(2): C336-46.
- Srere, P. A. (1987). "Complexes of sequential metabolic enzymes." Annu Rev Biochem **56**: 89-124.
- Stams, T., S. K. Nair, T. Okuyama, A. Waheed, W. S. Sly and D. W. Christianson (1996). "Crystal structure of the secretory form of membrane-associated human carbonic anhydrase IV at 2.8-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13589-94.
- Steck, T. L., B. Ramos and E. Strapazon (1976). "Proteolytic dissection of band 3, the predominant transmembrane polypeptide of the human erythrocyte membrane." Biochemistry **15**(5): 1153-61.
- Sterling, D., B. V. Alvarez and J. R. Casey (2002). "The extracellular component of a transport metabolon. Extracellular loop 4 of the human AE1 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger binds carbonic anhydrase IV." J Biol Chem **277**(28): 25239-46.
- Sterling, D. and J. R. Casey (1999). "Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH." Biochem J **344 Pt 1**: 221-9.
- Sterling, D. and J. R. Casey (2002). "Bicarbonate transport proteins." Biochem Cell Biol **80**(5): 483-97.
- Sterling, D., R. A. Reithmeier and J. R. Casey (2001). "Carbonic anhydrase: in the driver's seat for bicarbonate transport." Jop **2**(4 Suppl): 165-70.
- Sterling, D., R. A. Reithmeier and J. R. Casey (2001). "A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers." J Biol Chem **276**(51): 47886-94.
- Stryer, L. (2002). Fatty Acid Metabolism. Biochemistry. W. H. Freeman. New York.
- Stryer, L. (2002). Protein turnover and amino acid catabolism. Biochemistry. W. H. F. a. Co.
- Sun, B., C. H. Leem and R. D. Vaughan-Jones (1996). "Novel chloride-dependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism." J Physiol **495 (Pt 1)**: 65-82.
- Supuran, C. T. (2008). "Carbonic anhydrases--an overview." Curr Pharm Des **14**(7): 603-14.
- Supuran, C. T. (2008). "Carbonic anhydrases as drug targets." Curr Pharm Des **14**(7): 601-2.
- Supuran, C. T., A. Scozzafava and A. Casini (2003). "Carbonic anhydrase inhibitors." Med Res Rev **23**(2): 146-89.

BIBLIOGRAFÍA

- Svichar, N., S. Esquenazi, A. Waheed, W. S. Sly and M. Chesler (2006). "Functional demonstration of surface carbonic anhydrase IV activity on rat astrocytes." *Glia* **53**(3): 241-7.
- Svichar, N., A. Waheed, W. S. Sly, J. C. Hennings, C. A. Hubner and M. Chesler (2009). "Carbonic anhydrases CA4 and CA14 both enhance AE3-mediated Cl⁻-HCO₃⁻-exchange in hippocampal neurons." *J Neurosci* **29**(10): 3252-8.
- Takahata, T., T. Kumano, K. Ookawa, M. Hayakari, I. Kakizaki and S. Tsuchida (2004). "Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by 6-ethoxyzolamide: repressed peroxisome proliferator-activated receptor gamma mRNA and enhanced CCAAT/enhancer binding protein beta mRNA levels." *Biochem Pharmacol* **67**(9): 1667-75.
- Tanaka, H., S. Matsui, T. Kawanishi and K. Shigenobu (1996). "Use of chloride blockers: a novel approach for cardioprotection against ischemia-reperfusion damage." *J Pharmacol Exp Ther* **278**(2): 854-61.
- Tong, C. K., W. Cammer and M. Chesler (2000). "Activity-dependent pH shifts in hippocampal slices from normal and carbonic anhydrase II-deficient mice." *Glia* **31**(2): 125-30.
- Tureci, O., U. Sahin, E. Vollmar, S. Siemer, E. Gottert, G. Seitz, A. K. Parkkila, G. N. Shah, J. H. Grubb, M. Pfreundschuh and W. S. Sly (1998). "Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7608-13.
- Ulmasov, B., A. Waheed, G. N. Shah, J. H. Grubb, W. S. Sly, C. Tu and D. N. Silverman (2000). "Purification and kinetic analysis of recombinant CA XII, a membrane carbonic anhydrase overexpressed in certain cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14212-7.
- Vandenberg, J. I., J. C. Metcalfe and A. A. Grace (1993). "Mechanisms of pHi recovery after global ischemia in the perfused heart." *Circ. Res.* **72**: 993-1003.
- Vandenberg, J. I., J. C. Metcalfe and A. A. Grace (1994). "Intracellular pH recovery during respiratory acidosis in perfused hearts." *Am J Physiol* **266**(2 Pt 1): C489-97.
- Vargas, L. A., R. G. Diaz, E. R. Swenson, N. G. Perez and B. V. Alvarez (2013). "Inhibition of carbonic anhydrase prevents the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1-dependent slow force response to rat myocardial stretch." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **305**(2): H228-37.
- Vaughan-Jones, R. D. (1986). "An investigation of chloride-bicarbonate exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre." *J Physiol* **379**: 377-406.
- Vaughan-Jones, R. D., F. C. Villafuerte, P. Swietach, T. Yamamoto, A. Rossini and K. W. Spitzer (2006). "pH-Regulated Na⁽⁺⁾ influx into the mammalian ventricular myocyte: the relative role of Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange and Na⁽⁺⁾-HCO₃⁻ Co-transport." *J Cardiovasc Electrophysiol* **17 Suppl 1**: S134-S140.
- Villafuerte FC, S. P., Vaughan-Jones, RD (2007). "Common inhibitors of membrane H⁺-transport also inhibit carbonic anhydrase." *FASEB Journal* **21**(916.10).
- Vince, J. W., U. Carlsson and R. A. Reithmeier (2000). "Localization of the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II." *Biochemistry* **39**(44): 13344-9.
- Vince, J. W. and R. A. Reithmeier (1998). "Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger." *J Biol Chem* **273**(43): 28430-7.
- Vince, J. W. and R. A. Reithmeier (2000). "Identification of the Carbonic Anhydrase II Binding Site in the Cl⁻/HCO₃⁻ Anion Exchanger AE1." *Biochemistry* **39**(18): 5527-5533.

BIBLIOGRAFÍA

- Vuillemin, M. and T. Pexieder (1997). "Carbonic anhydrase II expression pattern in mouse embryonic and fetal heart." *Anat. Embryol. (Berl)* **195**(3): 267-77.
- Waheed, A., X. L. Zhu and W. S. Sly (1992). "Membrane-associated carbonic anhydrase from rat lung Purification characterization, tissue distribution and comparison with carbonic anhydrase IVs of other mammals." *J. Biol. Chem.* **267**: 3308-3311.
- Wang, Z., P. J. Schultheis and G. E. Shull (1996). "Three N-terminal variants of the AE2 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters." *J Biol Chem* **271**(13): 7835-43.
- Wetzel, P., R. J. Scheibe, B. Hellmann, J. Hallerdei, G. N. Shah, A. Waheed, G. Gros and W. S. Sly (2007). "Carbonic anhydrase XIV in skeletal muscle: subcellular localization and function from wild-type and knockout mice." *Am J Physiol Cell Physiol* **293**(1): C358-66.
- Whittington, D. A., J. H. Grubb, A. Waheed, G. N. Shah, W. S. Sly and D. W. Christianson (2004). "Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes." *J Biol Chem* **279**(8): 7223-8.
- Woolley, P. (1975). "Models for metal ion function in carbonic anhydrase." *Nature* **258**(5537): 677-82.
- Wu, X., T. Zhang, J. Bossuyt, X. Li, T. A. McKinsey, J. R. Dedman, E. N. Olson, J. Chen, J. H. Brown and D. M. Bers (2006). "Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling." *J Clin Invest* **116**(3): 675-82.
- Xie, Q., R. Welch, A. Mercado, M. F. Romero and D. B. Mount (2002). "Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1." *Am J Physiol Renal Physiol* **283**(4): F826-38.
- Xu, P. and K. W. Spitzer (1994). "Na-independent Cl⁻-HCO₃⁻ exchange mediates recovery of pHi from alkalosis in guinea pig ventricular myocytes." *Am J Physiol* **267**(1 Pt 2): H85-91.
- Yamamoto, T., T. Shirayama, T. Sakatani, T. Takahashi, H. Tanaka, T. Takamatsu, K. W. Spitzer and H. Matsubara (2007). "Enhanced activity of ventricular Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in pressure overload hypertrophy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(2): H1254-64.
- Yannoukakos, D., A. Stuart-Tilley, H. A. Fernandez, P. Fey, G. Duyk and S. L. Alper (1994). "Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart." *Circ Res* **75**(4): 603-14.
- Yoneda, M., H. Sanada, J. Yatabe, S. Midorikawa, S. Hashimoto, M. Sasaki, T. Katoh, T. Watanabe, P. M. Andrews, P. A. Jose and R. A. Felder (2005). "Differential effects of angiotensin II type-1 receptor antisense oligonucleotides on renal function in spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* **46**(1): 58-65.
- Yoshida, H. and M. Karmazyn (2000). "Na(+)/H(+) exchange inhibition attenuates hypertrophy and heart failure in 1-wk postinfarction rat myocardium." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(1): H300-4.
- Zhu, Q., D. W. Lee and J. R. Casey (2003). "Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1." *J Biol Chem* **278**(5): 3112-20.
- Zinchuk, V., O. Zinchuk and T. Okada (2007). "Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena." *Acta Histochem Cytochem* **40**(4): 101-11.