



Mecanismes moleculars de secreció miocardiàca: remodelat ventricular i secreció de peptid natriurètic tipus B

Gregori Casals Mercadal

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



MECANISMES MOLECULARS DE SECRECIÓ MIOCARDÍACA: REMODELAT VENTRICULAR I SECRECIÓ DE PÈPTID NATRIURÈTIC TIPUS B

Memòria presentada per
GREGORI CASALS MERCADAL
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat sota la direcció del **Dr. Wladimiro Jiménez Povedano**,
en el Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de
Barcelona.

Signatura del director de la tesi
Dr. Wladimiro Jiménez Povedano

Signatura del doctorand
Gregori Casals Mercadal

Tesi inscrita en el programa de doctorat "Medicina", Departament de
Ciències Fisiològiques I, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

ABREVIACIONS

ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNc	Àcid desoxiribonucleic codificant
ANP	Pèptid natriurètic auricular
APJ	Receptor d'apelina
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
AT1a	Receptor tipus 1 de l'angiotensina II
BNP	Pèptid natriurètic tipus B
cGMP	Fosfat de guanosina cíclic
CK-MB	Isoforma MB de la creatina-cinasa
CNP	Pèptid natriurètic tipus C
FIH	Factor inhibidor de HIF-1
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GFR	Taxa de filtració glomerular
HA	Àcid hialurònic
HIF-1	Factor induïble per hipòxia 1
IAM	Infart agut de miocardi
IL1 β	Interleucina-1 beta
kDa	Kilodalton
LVEF	Fracció d'ejecció ventricular esquerra
LVEFp	Fracció d'ejecció ventricular esquerra preservada
LVEFr	Fracció d'ejecció ventricular esquerra reduïda
MAPK	Proteïnes quinases activades per mitògens
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MMPs	Metal·loproteïnases

MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
NOS2	Sintasa d'òxid nítric tipus 2
NPR-A	Receptor de pèptids natriurètics A
NPR-B	Receptor de pèptids natriurètics B
NPR-C	Receptor de pèptids natriurètics C
NSTEMI	Infart agut de miocardi sense elevació del segment ST
NT-proBNP	Fragment amino terminal del pro-pèptid natriurètic tipus B
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PCRus	Proteïna C reactiva, ultrasensible.
PDGFR β	Receptor beta del factor de creixement derivat de plaquetes
PHD2	Prolina hidroxilasa 2
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PIIINP	Propèptid aminoterminal del procol·lagen tipus III
rpm	Revolucions per minut
SCA	Síndrome coronària aguda
STEMI	Infart agut de miocardi amb elevació del segment ST
TGF β R1	Receptor 1 del factor de creixement transformant beta
TIMPs	Inhibidors tissulars de metal·loproteïnases
TNF α	Factor de necrosi tumoral alfa
Tnl	Troponina I
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular
VHL	Von Hippel Lindau

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
1. Malaltia cardíaca isquèmica	3
1.1. Introducció	3
1.2. Remodelat ventricular en la malaltia cardíaca isquèmica	5
2. Cardiomiòcits	9
3. Hipòxia cel·lular i regulació transcripcional per HIF-1	11
3.1. Introducció	11
3.2. Gens diana de HIF-1	13
4. Apelina	15
4.1. Introducció	15
4.2. Síntesi i secreció cardíaca d'apelina	16
4.3. Isquèmia miocardiàca, HIF-1 i Apelina	18
5. Pèptids natriurètics	19
5.1. Introducció	19
5.2. Síntesi, secreció i processament dels pèptids natriurètics cardíacs	22
5.3. Accions fisiològiques	25
5.4. Isquèmia miocardiàca, HIF-1 i pèptids natriurètics	26
6. Significació clínica de la concentració plasmàtica de BNP	28
6.1 Valor de la concentració plasmàtica de BNP en la insuficiència cardíaca	28
6.2 Valor de la concentració plasmàtica de BNP en la cardiopatia isquèmica	31
HIPÒTESI I OBJECTIUS	35

MÈTODES	39
A. Procediments experimentals (parts I i II)	41
B. Pacients i mètodes (part III)	45
RESULTATS	49
<u>Part I.</u> Estudi dels mecanismes moleculars de remodelat ventricular: factors implicats en el recanvi de matriu extracel·lular en cardiomiòcits.	51
<u>Part II.</u> Efecte de la hipòxia sobre la secreció del pèptid natriurètic tipus B (BNP) en cardiomiòcits ventriculars humans.	58
<u>Part III.</u> Estudi de la significació clínica de les concentracions plasmàtiques de BNP en pacients amb síndrome coronària aguda.	63
DISCUSSIÓ	69
CONCLUSIONS	81
BIBLIOGRAFIA	85
ANNEX	107
Hypoxia induces B-type natriuretic peptide release in cell lines derived from human cardiomyocytes. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol.</i> 2009;297:H550-5 (Part II)	109
Admission B-type natriuretic peptide retains prognostic value in patients with acute coronary syndrome and preserved left ventricular ejection fraction. <i>Int J Cardiol</i> 2012;158:459-60 (Part III)	116
AGRAÏMENTS	119

INTRODUCCIÓ

1. MALALTIA CARDÍACA ISQUÈMICA

1.1. Introducció

La malaltia cardíaca isquèmica engloba un conjunt d'entitats clíniques que es caracteritzen per presentar un subministrament inadequat de sang i oxigen al miocardi (1). La causa més freqüent d'isquèmia miocardiàca és la malaltia arterioscleròtica en les artèries coronàries, suficient com per provocar una disminució regional en el flux sanguini miocardiàc que produeix una perfusió inadequada del miocardi que irriguen (1). La presència d'un desequilibri entre el subministrament d'oxigen al miocardi i la seva demanada constitueix un factor principal de la fisiopatologia d'aquesta malaltia (1). La malaltia cardíaca isquèmica inclou majoritàriament els diagnòstics d'angina, infart de miocardi, isquèmia silent i la mortalitat com a conseqüència de la malaltia arterial coronària.

Actualment, la malaltia cardíaca isquèmica és considerada la causa principal de mortalitat i discapacitat en els països desenvolupats, on provoca més costos econòmics que qualsevol altra malaltia (1,2). En les darreres dècades, s'ha observat una disminució de les taxes de mortalitat (3,4), molt probablement en relació a les millores terapèutiques (revascularització, tractaments inicials de la síndrome coronària aguda (SCA), tractament de la insuficiència cardíaca) i actuacions sobre els factors de risc (colesterol, pressió arterial, tabaquisme, activitat física) (5). Malgrat tot, aquesta entitat continua representant la causa d'aproximadament una tercera part de totes les morts en persones majors de 35 anys (4,6). La mortalitat a Espanya l'any 2008 per aquesta malaltia va ser de 43.500 persones (7).

Tot i que la incidència de la malaltia cardíaca isquèmica també sembla haver disminuït amb el temps en els països desenvolupats (8,9), aquesta malaltia continua representant una causa principal de morbiditat. En els individus de 40 anys, el risc de desenvolupar malaltia cardíaca coronària al llarg de la vida s'ha calculat que és del 49% en homes i del 32% en dones (5). La incidència d'esdeveniments coronaris

augmenta progressivament amb l'edat en els homes. En dones premenopàusiques, les manifestacions greus de la malaltia coronària com l'infart agut de miocardi (IAM) o la mort sobtada són menys freqüents, però augmenten de forma brusca després de la menopausa (10-12).

Els pacients amb malaltia cardíaca isquèmica es classifiquen en dos grans grups: pacients amb malaltia arterial coronària crònica i pacients amb SCA. Aquests últims, al seu torn, es classifiquen en tres tipus: pacients amb angina inestable, pacients amb infart de miocardi sense elevació del segment ST a l'electrocardiograma d'ingrés (NSTEMI) i pacients amb infart de miocardi amb elevació del segment ST (STEMI). En la definició universal d'infart agut de miocardi (13), es considera infart de miocardi aquell esdeveniment clínic que és conseqüència de necrosi miocardiàica. Contràriament, d'acord amb aquesta definició, l'angina inestable es presenta en pacients amb manifestacions clíniques d'isquèmia cardíaca que no tenen elevacions de les concentracions circulants de troponina o CK-MB (marcadors bioquímics de necrosi miocardiàica). Els símptomes apareixen en repòs (o esforç mínim) i solen durar més de 10 minuts. El NSTEMI es diferencia de l'angina inestable en que el grau d'isquèmia és suficient com per provocar necrosi miocardiàica, detectable per augment de les concentracions circulants de troponina o CK-MB. El STEMI presenta pitjor pronòstic i, de fet, tots els pacients amb STEMI han de ser avaluats per a la implementació de teràpia de reperfusió el més aviat possible.

A pesar dels avanços terapèutics, els pacients amb SCA continuen presentant mal pronòstic. La presència de canvis en el segment ST en l'electrocardiograma és un factor principal de mal pronòstic (2,14). A més, la mortalitat després d'un episodi de SCA és particularment elevada en els pacients amb concentracions plasmàtiques de troponina elevades (mortalitat del 10% als 30 dies i del 19% als 6 mesos), però també és important en els pacients amb angina inestable (mortalitat del 4% als 30 dies i del 9% als 6 mesos) (15).

1.2. Remodelat ventricular en la malaltia cardíaca isquèmica

A pesar que les millores en les estratègies terapèutiques han conduït a una disminució de la mortalitat posterior a l'IAM, la incidència i prevalença de la insuficiència cardíaca post IAM ha augmentat progressivament en els darrers anys (16,17). De fet, la insuficiència cardíaca és actualment un dels principals problemes de salut en els països industrialitzats, on sembla ser l'única entitat cardiovascular que augmenta la prevalença (1). En aproximadament tres quartes parts dels casos d'insuficiència cardíaca, la malaltia cardíaca isquèmica és la condició subjacent (1). En models animals i en humans, s'observa l'aparició de remodelat tissular ventricular posteriorment a l'infart. El remodelat apareix generalment dins de les primeres hores posteriors a l'infart i progressa al llarg del temps (18-21). El remodelat pot arribar a afectar tot el cor, ja que l'aprimament i dilatació desproporcionats de la zona infartada s'acompanyen d'una distorsió de la forma cardíaca amb hipertròfia del miocardi no infartat per sobrecàrrega de volum (19,22). Els pacients sense dilatació o amb dilatació cardíaca lleu a les 4 setmanes posteriors de l'IAM tendeixen a mantenir-se estables, mentre que aquells amb una dilatació progressiva durant aquest període tendeixen a presentar un empitjorament posterior, amb pèrdua de funció i contractilitat del miocardi (remodelat patològic) (23). A pesar de les evidències que la inducció del remodelat cardíac per la isquèmia és un aspecte important en l'aparició de la insuficiència cardíaca, els mecanismes moleculars pels quals la isquèmia miocardiaca es tradueix en remodelat ventricular i insuficiència cardíaca són poc coneguts.

El remodelat ventricular pot classificar-se com fisiològic o patològic (24). El remodelat fisiològic és un canvi compensatori en les dimensions i funcions del cor en resposta a estímuls fisiològics com l'exercici i l'embaràs. El remodelat patològic pot ocórrer per sobrecàrrega de pressió (per exemple en l'estenosi aòrtica i la hipertensió), sobrecàrrega de volum (per exemple en la regurgitació valvular), o després de dany cardíac (per exemple en l'IAM, miocarditis o cardiomiopatia dilatada idiopàtica). El

remodelat post IAM va ser descrit inicialment l'any 1990 com la presència d'alteracions en la topografia ventricular posterior a l'IAM (25) i va ser definit posteriorment com l'expressió genòmica que resulta en canvis moleculars, cel·lulars i intersticials com a conseqüència de la isquèmia cardíaca i que es manifesta clínicament en forma de canvis en la mida, forma i funció cardíques (24). En cada una d'aquestes situacions, el remodelat pot constituir des d'un procés aparentment compensador a un de desadaptatiu (26)

La fibrosi cardíaca és un determinant principal del procés de remodelat i és considerat un factor de risc important en el desenvolupament d'insuficiència cardíaca (24). Una de les característiques principals de la fibrosi cardíaca és la deposició incrementada de matriu extracel·lular, constituïda principalment per col·làgens i altres proteoglicans i proteïnes en equilibri dinàmic amb els components cel·lulars del cor. El recanvi dinàmic de col·lagen és controlat per diversos mecanismes reguladors, incloent la síntesi *de novo* i la degradació proteolítica per part de les metal·loproteïnases (MMPs). En condicions fisiològiques, l'equilibri entre la síntesi i degradació de col·lagen és crucial per la homeòstasi de la matriu extracel·lular. En canvi, després d'un IAM es produeix una reorganització de la matriu extracel·lular a través de l'activació de vies profibròtiques i de MMPs, que s'associa amb alteracions en l'estructura i funció del miocardi (27). Diferents famílies de proteases estan involucrades en el desenvolupament de la insuficiència cardíaca secundària a l'IAM (27). Es considera que els factors predominants que causen el remodelat de la matriu extracel·lular en la progressió a insuficiència cardíaca són l'augment de l'activitat proteolítica de les MMPs i/o la disminució dels nivells dels seus inhibidors tissulars (TIMPs) (28). Malgrat tot, es desconeixen en gran mesura els mecanismes que regulen aquests factors així com els que regulen els factors implicats en la síntesi dels components matriu extracel·lular. La identificació dels mecanismes moleculars específics pels quals la isquèmia miocardiàca inicia i promou el remodelat ventricular és necessària per establir

aproximacions terapèutiques que permetin un tractament precoç de la insuficiència cardíaca isquèmica, evitar-ne l'aparició o atenuar-ne la gravetat.

Dos components importants de la isquèmia miocardiàca són la hipòxia i la inflamació, factors associats amb processos fisiològics i patològics com la fibrogènesi. La hipòxia cel·lular i sistèmica activa la síntesi de col·lagen en diversos tipus cel·lulars, suggerint l'existència de factors regulats per la hipòxia implicats en reaccions comunes durant el procés de síntesi de col·lagen (29,30). La hipòxia-reoxigenació també s'associa amb una activació de les MMPs (31,32). Semblantment, s'ha observat que la inducció de citocines proinflamàtores s'associa amb l'inici i progressió del remodelat cardíac (33-36). Els pacients amb insuficiència cardíaca presenten concentracions circulants augmentades de citocines proinflamàtores (37). Poc després de l'IAM augmenta l'expressió d'aquestes citocines de forma transitòria (28,33-35,38,39) i crònicament, es troben incrementades a nivell miocardiàc en la zona infartada i peri-infartada (34,36,39).

Les cèl·lules cardíques, incloent els cardiomiòcits ventriculars, participen directament en el procés de remodelat cardíac post IAM. Els cardiomiòcits són una font important de col·lagen (40-42) i també produeixen MMPs i inhibidors tissulars de metal·loproteïnases (TIMPs) (31,40,41,43,44) (taula 1). Posteriorment a l'IAM, s'observen canvis en l'expressió de MMPs i TIMPs i alteracions en la producció de col·lagen en cardiomiòcits (taula 2). Si la hipòxia o la inflamació promouen aquests canvis és un aspecte que no s'ha avaluat, en part per raons metodològiques. De fet, els mecanismes bàsics de la funció cel·lular miocardiàca humana en resposta a la hipòxia són poc coneguts a causa de l'absència de models *in vitro* que hagin permès la identificació de la contribució específica de la tensió d'oxigen en els processos objecte d'estudi. En la part 1 d'aquesta tesi s'ha utilitzat un model *in vitro* de cardiomiòcits ventriculars humans adults aïllats que ha permès avaluar l'efecte específic de la hipòxia i estímuls proinflamatoris sobre el remodelat cardíac en cardiomiòcits

ventriculars. Amb aquests estudis es pretén identificar els mecanismes bàsics que regulen el remodelat ventricular en la isquèmia cardíaca.

Taula 1. MMPs i TIMPs identificats en posterioritat a un IAM (43).

Classe	Número	Mida (kDa)	Cèl·lules productores post-IAM
Col·lagenases			
Col·lagenasa intersticial	MMP-1	52/57	Fibroblasts
Col·lagenasa 2	MMP-8	75	Neutròfils
Col·lagenasa 3	MMP-13	54	No identificat
Gelatinases			
Gelatinasa A	MMP-2	72	Macròfags, fibroblasts, cardiomiòcits
Gelatinasa B	MMP-9	92	Neutròfils, macròfags, cardiomiòcits
Estromelisines			
Estromelisina-1	MMP-3	52/58	Cardiomiòcits
Matrilisina	MMP-7	28	No identificat
MMPs tipus membrana			
MT1-MMP	MMP-14	66	Fibroblasts, cèl·lules vasculars musculars llises, cardiomiòcits
TIMPs			
TIMP-1		28	Fibroblasts i cardiomiòcits
TIMP-2		21	Fibroblasts i cardiomiòcits
TIMP-3		24	Fibroblasts i cardiomiòcits
TIMP-4		22	Fibroblasts i cardiomiòcits

Taula 2. Evolució temporal i espacial de l'abundància proteica de MMPs i TIMPs post IAM (43)

	0-7 dies			7-21 dies			8 setmanes		
	Remot	Peri-infarct	Infart	Remot	Peri-infarct	Infart	Remot	Peri-infarct	Infart
Col·lagenases									
MMP-1	↑	↑	↑	ND	ND	ND	=	↓	↓
MMP-8	=	=	=	↑	↑	↑	=	↑	↑
MMP-13	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	↑	↑
Gelatinases									
MMP-2	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	↑	↑
MMP-9	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	↓	↓
Estromelisinases									
MMP-3	ND	ND	↑	↑	↑	↑	=	=	↓
MMP-7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	=	↓	↓
MT1-MMP	=	=	=	=	=	=	=	↑	↑
TIMPs									
TIMP-1	=	=	=	↑	↑	↑	=	↓	↓
TIMP-2	=	=	=	↑	↑	↑	↓	↓	↓
TIMP-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↓	↓	↓
TIMP-4	=	↓	↓	ND	ND	ND	=	↓	↓

ND: no determinat. ↑ augment, ↓ descens, = sense canvis (respecte a l'expressió en condicions basals).

2. CARDIOMIÒCITS

Els cardiomiòcits surten del cicle cel·lular i es diferencien *in vivo* en el període perinatal. A diferència del múscul esquelètic, el miocardi no té cèl·lules satèl·lits amb capacitat de proliferar en resposta al dany muscular (45,46). Els estudis en cultius de mioblasts esquelètics derivats de cèl·lules satèl·lits musculars han contribuït de forma significativa a l'estudi dels mecanismes de control i diferenciació de diverses miopaties (47). Contràriament, la limitació en la disponibilitat de línies cel·lulars de cardiomiòcits ventriculars humans ha obstaculitzat la realització d'estudis anàlegs en el múscul cardíac, ja que els cultius a partir de teixit miocardiàc tenen una vida limitada *in vitro*. De fet, tot i que els cultius primaris diferenciats poden mantenir-se algunes setmanes, desenvolupen canvis morfològics i funcionals i generen una població cel·lular

heterogènia (48,49). En els darrers anys han aparegut línies cel·lulars de cardiomiòcits, tumorals o modificades genèticament, capaces de proliferar en cultiu, (50-57) que pateixen d'alguns dèficits com la falta de fenotip característic de cardiomiòcits i una capacitat limitada d'expansió, que han compromès la seva aplicació en molts estudis experimentals. De particular utilitat és, però, la línia cel·lular de cardiomiòcits auriculars de ratolí HL1 (58), que manté les característiques dels cardiomiòcits auriculars diferenciats. Tot i que valuosos per l'estudi dels cardiomiòcits auriculars, la utilitat d'aquestes cèl·lules és limitada en l'estudi fisiopatològic en cardiomiòcits ventriculars. Més recentment, la línia cel·lular estable de cardiomiòcits ventriculars humans adults AC16 (59) ha estat constituïda a partir de la immortalització de cardiomiòcits primaris de cor humà adult a través de la seva fusió amb una línia cel·lular de fibroblasts sense ADN mitocondrial transformats amb el virus SV40. D'aquesta manera, possibilita una millor aproximació a l'estudi a nivell cel·lular i molecular dels processos fisiopatològics en els que intervenen de forma principal els cardiomiòcits ventriculars, com el remodelat ventricular i la secreció miocardiàca de BNP i factors de creixement cardíacs estudiats en aquesta tesi (figura 1).

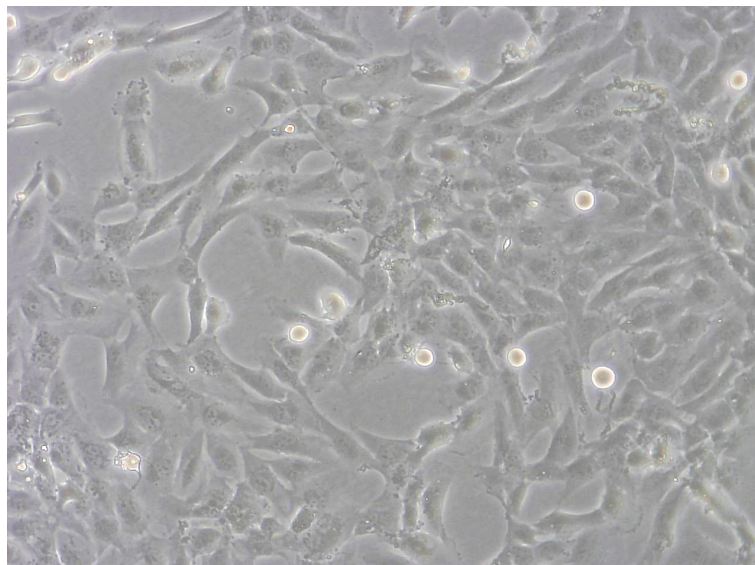


Figura 1. Imatge dels cardiomiòcits ventriculars humans (cèl·lules AC16) obtinguda en el Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic. Les condicions de cultiu van ser 37°C, 5%CO₂ i 100% d'humitat. El medi de cultiu va consistir en DMEM-F12 (1:1) complementat amb sèrum boví fetal (12,5%), penicil·lina (50 U/mL), estreptomicina (50µg/mL) i L-glutamina (2mM).

3. HIPÒXIA CEL·LULAR I REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL PER HIF-1

3.1. Introducció

L'adaptació cel·lular a la hipòxia depèn de forma essencial del factor de transcripció HIF-1, el qual és inactiu en condicions normòxiques però s'activa en condicions d'hipòxia (60,61) regulant la transcripció de desenes de gens de forma cel·lular específica (62). Estructuralment, HIF-1 és un heterodímer ubiquïtament expressat en els teixits humans, compostat per una subunitat regulada per oxigen (HIF-1 α) i una altra expressada de forma constitutiva (HIF-1 β , també coneguda com ARNT) (63,64). En condicions normòxiques, la ràpida hidroxilació dependent d'oxigen per la prolil hidroxilasa 2 (PHD2) dels residus prolina 402 i/o 564 de la subunitat HIF-1 α proporciona un lloc d'unió en aquesta subunitat pel producte del gen von Hippel-Lindau (VHL), component del complex E3 ubiquïtina lligasa. Aquesta unió indueix una poliubiquïtinització de HIF-1 α que culmina amb la seva degradació pel proteosoma (65,66). Contràriament, en condicions de disponibilitat reduïda d'oxigen, disminueix l'activitat de la PHD2, inhibint-se la degradació de HIF-1 α . Aquesta estabilització de HIF-1 α permet la seva translocació des del citoplasma al nucli cel·lular, on dimeritza amb HIF-1 β , formant el complex HIF-1 transcripcionalment actiu. En el nucli, HIF-1 s'uneix als elements de resposta a hipòxia (HRE; 5'-RCGTG-3') en les regions reguladores dels gens diana, induint-ne la transcripció (67) (figura 2).

A més de l'estabilització de HIF-1 α , l'activació transcripcional de HIF-1 requereix de la unió de proteïnes coactivadores de la transcripció. Existeix, per tant, un segon mecanisme per a l'activació de HIF-1, que modula els dominis de transactivació (estimulació de la transcripció) N-TAD i C-TAD de HIF-1 α . Aquests dominis recluten coactivadors transcripcionals com CBP/p300, SRC-1 i TIF2 (67). En condicions normals de tensió d'oxigen, la hidroxilació dependent d'oxigen del residu asparagina 803 en el domini C-TAD de HIF-1 α pel factor inhibidor de HIF (FIH, asparagina hidroxilasa dependent d'oxigen) bloqueja la interacció de HIF-1 α amb la proteïna

coactivadora CBP/p300 (69-71), reduint l'activitat transcripcional de HIF-1 α (68). Pel contrari, en condicions hipòxiques, la hidroxilació del residu asparagina està inhibida, permetent una interacció eficient entre CBP/p300 i HIF-1 α que facilita l'activació de la transcripció dels gens diana. D'aquesta manera, la utilització de l'oxigen com a substrat per part de FIH-1 constitueix un segon mecanisme sensor d'oxigen. S'ha descrit que la transcripció de FIH-1 és independent de la concentració d'oxigen i no actua sobre l'estabilitat de HIF-1 α (72). Igual que les prolina hidroxilases, la asparagina hidroxilasa FIH-1 requereix Fe⁺² i ascorbat com a cofactors.

A banda de la tensió d'oxigen, s'ha descrit que HIF-1 també pot ser regulat d'una forma independent d'oxigen. En aquest sentit, diverses citocines, factors de creixement i altres molècules de senyalització han estat implicades en el control de HIF-1 en condicions normòxiques (67). També, encara que de forma complexa i dependent del tipus cel·lular, en alguns casos s'ha observat l'estimulació de la transactivació o de la síntesi de HIF-1 a través de l'activació de les vies de senyalització de les proteïnes quinases activades per mitògens (MAPK) o la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) (73).

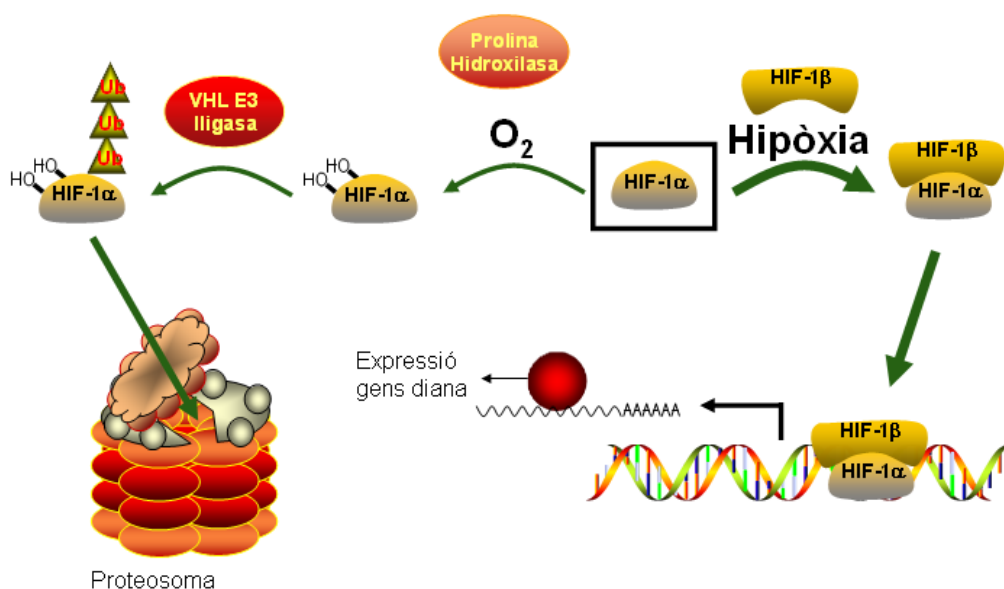


Figura 2. Representació dels mecanismes moleculars de regulació de l'expressió dels gens diana de HIF-1 en funció de la tensió d'oxigen cel·lular.

3.2 Gens diana de HIF-1

L'adaptació de les cèl·lules i òrgans al subministrament d'oxigen està mediada per una varietat de gens sobre els que actua el factor de transcripció HIF-1, que estan regulats de forma teixit-específica. HIF-1 activa l'expressió d'aquests gens unint-se als elements de resposta a hipòxia localitzats en les seves regions promotores (74). Actualment, s'han identificat més de 100 gens sobre els que actua HIF-1, els quals tenen funcions variables (67).

a) Eritropoesi i metabolisme del ferro. La capacitat dels eritròcits de transportar oxigen es veu incrementada en resposta a la hipòxia gràcies a l'expressió de gens implicats en l'eritropoesi i el metabolisme del ferro. Augmenta l'expressió d'eritropoetina (74), provocant l'increment del nombre d'eritròcits i l'alliberament d'oxigen als teixits. També estan regulats per la hipòxia els productes de gens implicats en el metabolisme del ferro que controlen els principals passos bioquímics de la producció d'hem. La hipòxia augmenta l'expressió de transferrina i del seu receptor i de ceruloplasmina (75,76), facilitant el subministrament de ferro als teixits. La transferrina transporta el Fe^{3+} a l'interior de la cèl·lula. El receptor de transferrina permet la recuperació de transferrina (76). La ceruloplasmina és necessària per oxidar el ferro de l'estat ferrós al fèrric (77).

b) Angiogènesi. L'angiogènesi és un procés complex en el que estan implicats gran quantitat de productes gènics expressats per diferents tipus cel·lulars. S'ha observat l'augment d'expressió d'un gran nombre de gens implicats en diferents passos de l'angiogènesi en resposta a canvis en la tensió d'oxigen. Entre ells, destaca el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), potent mitogen endotelial vascular que participa directament en l'angiogènesi mitjançant el reclutament de cèl·lules endotelials en zones hipòxiques o poc vascularitzades, on estimula la seva proliferació (78). Així, la inducció de VEGF i altres factors proangiogènics condueix a un increment de la densitat vascular i, en conseqüència, a una disminució de la distància de difusió

d'oxigen. A més, HIF-1 regula gens implicats en el to vascular com la sintasa d'òxid nítric tipus 2 (NOS2) (79), hem oxigenasa 1 (80), endotelina 1 (81), adrenomedulina (82) i el receptor α_{1B} adrenèrgic (83). També, la hipòxia induïx factors implicats en el recanvi de la matriu extracel·lular i la maduració dels vasos com la metal·loproteïnasa 2 endotelial (32), inhibidors de l'activador tissular de plasminògen (84) i prolina hidroxilases del col·lagen (29).

c) Metabolisme glucídic. En condicions de baix subministrament d'oxigen, les cèl·lules canvien el seu metabolisme de la glucosa de la via oxigen dependent de l'àcid tricarboxílic a la glucòlisi independent d'oxigen (85). Amb només 2 molècules d'ATP a partir d'una molècula de glucosa, en lloc de les 38 molècules d'ATP proporcionades pel cicle de l'àcid tricarboxílic, les cèl·lules hipòxiques aconsegueixen augmentar la seva capacitat per generar ATP incrementant la disponibilitat de glucosa. Això s'obté a través de l'augment en l'expressió d'enzims glucolítics i transportadors de glucosa (86). La hipòxia i HIF-1 activen la gran majoria d'enzims de la via glucolítica, així com els transportadors de glucosa 1 i 3 (GLU1, GLU3) (87). A més, metabòlits de la glucòlisi com el lactat i el piruvat provoquen acumulació de HIF-1 α en condicions normòxiques i regulen l'expressió dels gens induïbles per hipòxia establint un cercle amplificador (88).

d) Proliferació cel·lular i supervivència. La hipòxia i HIF-1 induïxen factors de creixement, com el factor de creixement insulínic tipus 2 (IGF-2) i el factor de creixement transformant- α (TGF- α) (89). La unió d'aquests factors de creixement als seus receptors activen vies de transducció de senyals que condueixen a la proliferació i supervivència cel·lular i, també, estimulen l'expressió de HIF-1 α (90).

e) Apoptosi. L'adaptació cel·lular a la hipòxia porta a la proliferació i supervivència cel·lular, però paradoxalment també condueix a la mort cel·lular en determinades circumstàncies. S'ha observat que HIF-1 està involucrat en la inducció d'apoptosi per la hipòxia. Cèl·lules embrionàries portadores d'una delecció de HIF-1 α mostren menor

apoptosi en condicions hipòxiques (91). Diferents tipus cel·lulars mostren activació de caspases i alliberament de citocrom c en condicions d'hipòxia (92,93). També s'ha observat que l'expressió de HIF-1 α i HIF-1 β correlaciona amb l'apoptosi i factors proapoptòtics com caspasa-3, Fas, i Fas lligand (94). A més, la hipòxia disminueix la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 (91). Alguns gens implicats en el control del cicle cel·lular, com p53 i p21 també són dependents de HIF (91). A més, p53 intervé en la regulació de l'apoptosi induïda per la hipòxia a través de la inducció de gens relacionats amb l'apoptosi com Bax, NOXA, PUMA i PERP (95).

f) Altres. Entre altres processos on s'ha descrit un paper fisiològic de HIF-1 destaca la seva regulació de gens implicats en l'adipogènesi (96), formació del cos carotídi (97), desenvolupament de limfòcits B (98) i alguns processos immunològics (99).

4. APELINA

4.1. Introducció

L'apelina és el lligand endogen del receptor lligat a proteïnes G, APJ. El sistema apelina-APJ s'expressa en diversos òrgans i teixits com el sistema nerviós central i perifèric, cor, pulmó, ronyó, fetge o teixit adipós. Entre altres, actua sobre la regulació de l'homeòstasi de la glucosa, formació de vasos, proliferació cel·lular i processos immunològics (100,101). El sistema cardiovascular, però, constitueix el principal lloc d'acció de l'apelina, on exerceix un paper important en la regulació de la homeòstasi (102). L'apelina, que també s'expressa de forma important a nivell cardíac i vascular (103), és una de les substàncies endògenes amb efecte ionotròpic positiu més potent (104). L'administració exògena d'apelina provoca un efecte ionotròpic positiu agut i crònic en el miocardi (104-106). Les accions de l'apelina a nivell cardiovascular inclouen, a més de l'augment de la contractilitat cardíaca, la vasodilatació i la reducció de la pre-càrrega i post-càrrega ventricular (107,108). Les accions ionotròpiques

conjuntament amb la reducció de la pre-càrrega i post-càrrega fan de l'apelina una substància atractiva des del punt de vista terapèutic en la insuficiència cardíaca.

S'han descrit diversos mecanismes pels quals l'apelina regularia el to vascular i la pressió arterial. En aquest sentit, l'administració d'apelina a rates provoca una disminució de la pressió arterial a través de l'estimulació de l'alliberació d'òxid nítric en les cèl·lules endotelials (109) i redueix la reabsorció renal d'aigua a través de la inhibició de l'alliberació de l'hormona antidiürètica (110). L'administració d'apelina en humans provoca vasodilatació arterial mediada per òxid nítric (111). A més, l'apelina també actua contrarestant la vasoconstricció induïda per angiotensina (112). Així, els ratolins amb dèficit d'APJ són normotensos en situació basal però presenten una major sensibilitat a l'administració exògena d'angiotensina II que els ratolins *wild-type* (112). La pressió arterial mitjana en ratolins doble *knockout*, amb dèficit del receptor APJ i del receptor tipus 1 de l'angiotensina II (AT1a), és superior que en els ratolins amb dèficit únicament del receptor AT1a, suggerint que el sistema apelina/APJ provoca una vasodilatació compensatòria de la vasoconstricció mediada per angiotensina. L'apelina és també un potent supressor de l'activació dels fibroblasts cardíacs i té efectes inhibidors sobre la fibrosi cardíaca i el remodelat ventricular (113,114). S'ha proposat que l'expressió del sistema apelina-APJ durant la diferenciació de cèl·lules mononuclears de medul·la òssia en cèl·lules cardiomiogèniques pot ser un mecanisme important per la regulació de la regeneració miocardiàca i la seva recuperació funcional després de l'IAM (115).

4.2. Síntesi i secreció cardíaca d'apelina

El gen de l'apelina es situa en el braç llarg del cromosoma X i codifica per la preproapelina, pèptid de 77 aminoàcids. L'apelina-36, fragment C-terminal de 36 aminoàcids de la preproapelina, va ser el primer en ser descrit com a lligand endogen

del receptor APJ. Posteriorment, es descriuen fragments C-terminal més curts (de 12 a 19 aminoàcids), que presenten major activitat sobre el receptor (116,117), constituint l'apelina-13 probablement la forma amb major activitat (116).

L'apelina està present tant en el miocardi com en el plasma. S'ha observat disminució de l'ARNm de l'apelina en cardiomiòcits sotmesos a estirament *in vitro* i en el ventricle de models animals d'insuficiència cardíaca hipertensiva (104). Això pot explicar que en els models animals d'insuficiència cardíaca l'expressió d'apelina augmenta o es manté en la hipertròfia ventricular esquerra i insuficiència cardíaca compensada, però disminueix en insuficiència cardíaca greu descompensada. Semblantment, en humans les concentracions plasmàtiques d'apelina augmenten o es mantenen en la disfunció ventricular esquerra inicial (118), però els pacients amb insuficiència cardíaca avançada presenten una disminució en les concentracions plasmàtiques d'apelina (119,120).

L'apelina es relaciona estretament amb diversos processos inflamatoris (121-123), suggerint que la secreció d'apelina pot estar influenciada per citocines proinflamatòries. En adipòcits existeix una correlació entre l'expressió d'apelina i TNF α (123). En els SCA s'observa un desequilibri en l'alliberació de citocines, que afavoreix els efectes proinflamatoris (124,125), però es desconeix l'efecte dels factors proinflamatoris sobre la secreció cardíaca d'apelina.

El sistema apelinèrgic es troba disminuït a nivell cardíac en la insuficiència cardíaca avançada experimental (126). Es considera que el dèficit de l'activitat apelina-APJ pot tenir un paper important en la fisiopatologia de la insuficiència cardíaca. De fet, són creixents les evidències que mostren el potencial terapèutic d'activar el sistema apelina-APJ en els pacients amb insuficiència cardíaca (107,108,127). Malgrat tot, els mecanismes moleculars que regulen la producció miocardiaca d'apelina són poc coneguts. En la part 1 d'aquesta tesi s'estudia si la hipòxia i les citocines

proinflamatòries són factors específics que poden contribuir a l'augment de l'expressió cardíaca d'apelina.

4.3. Isquèmia miocardiàca, HIF-1 i apelina.

La regulació del sistema apelina-APJ a nivell cardíac es veu modificada en situació d'isquèmia aguda. L'ARNm d'apelina i APJ augmenten de forma progressiva després de la inducció d'isquèmia cardíaca. Així, després del lligament de l'artèria coronària descendent anterior en rates s'ha observat un augment de l'expressió cardíaca d'apelina (128). Igualment, en un model experimental murí s'observa que apelina i APJ estan sobreexpressats a nivell cardíac després de la inducció d'isquèmia o hipòxia (129). En el cas de la insuficiència cardíaca isquèmica crònica s'ha descrit tant l'augment com la disminució del sistema apelina/APJ (128,130,131). Aquestes discrepàncies semblen estar en relació amb els diferents temps d'estudi post infart en el que es mesura l'expressió d'apelina i/o amb diferències en el grau de gravetat de la insuficiència cardíaca. De fet, la conclusió extreta després de diversos estudis amb resultats aparentment contradictoris és que les concentracions plasmàtiques d'apelina en els pacients amb insuficiència cardíaca augmenten en les fases inicials però disminueixen en fases avançades (133,134). S'han observat nivells de l'ARNm d'apelina augmentats en el ventricle esquerre de pacients amb insuficiència cardíaca isquèmica (130). Les concentracions plasmàtiques d'apelina es troben disminuïdes en pacients amb IAM i angina inestable (135,136).

L'apelina presenta accions cardioprotectores front la isquèmia cardíaca (137,138) que poden estar en relació a la seva activació en hipòxia a través de HIF-1. La sobreexpressió d'apelina en resposta a la hipòxia s'ha observat en diferents tipus cel·lulars (139-142). S'han observat llocs d'unió potencials de HIF-1 en el gen d'apelina (143) i, en cors de rata en situació d'isquèmia, el patró d'expressió d'apelina és similar al dels gens coneguts de resposta a hipòxia (129). S'ha observat que

l'apèlina augmenta després de la isquèmia-reperfusió, provocant una millora la disfunció cardíaca, inhibició de l'apoptosi i dels efectes oxidatius (144).

5. PÈPTIDS NATRIURÈTICS

5.1. Introducció

Les primeres suposicions que el cor pogués tenir una funció endocrina daten de mitjans del segle XX, motivades fonamentalment per l'observació d'una associació funcional entre el cor (distensió auricular) i el ronyó (augment de la diüresi) (145). També a favor de la noció que el cor pogués comportar-se com un òrgan endocrí, estava l'observació per microscòpia electrònica de grànuls intracel·lulars en els cardiomiòcits auriculars de conills porquins, semblants als de les cèl·lules endocrines (146). Tres dècades després, va poder demostrar-se experimentalment que el cor intervenia directament en la funció diürètica i natriurètica renal i que, per tant, no es tractava d'un òrgan que actuava únicament com una bomba mecànica. Les primeres evidències experimentals d'una relació humoral entre el cor i el ronyó van venir de la demostració que la injecció intravenosa en rates d'extractes auriculars condueix a un augment de la diüresi i de l'excreció urinària de sodi, així com un descens en la pressió arterial (147,148) (figura 3). La substància responsable de l'efecte natriurètic va poder ser aïllada en aurícules de rata i resultà ser una hormona peptídica, que va denominar-se pèptid atrial natriurètic (ANP) (149). Posteriorment, va identificar-se un pèptid estructuralment relacionat en cervell porcí, que va denominar-se pèptid natriurètic cerebral (150). Més endavant, va demostrar-se que aquest pèptid es sintetitzava principalment en el miocardi (151-153), per la qual cosa i per evitar confusions, actualment sol denominar-se més pròpiament com pèptid natriurètic tipus B (BNP). Estudis posteriors han profunditzat en les accions de l'ANP i el BNP sobre el manteniment de la pressió sanguínia i el balanç hidroelectrolític (154,155). Ambdós pèptids redueixen la resistència vascular i incrementen la diüresi i l'excreció de sodi,

reduint la pressió arterial sistèmica. Un tercer membre de la família de pèptids natriurètics, el pèptid natriurètic tipus C (CNP), també fou identificat en extractes de cervell porcí (156). Aquest pèptid, a diferència de l'ANP i el BNP es sintetitzat preferentment a l'endoteli vascular i el sistema nerviós central (157), actuant bàsicament com a factor paracrí (158), tot i que ha estat documentada la seva expressió a nivell de miocardi i de fibroblasts cardíacs (159,160).

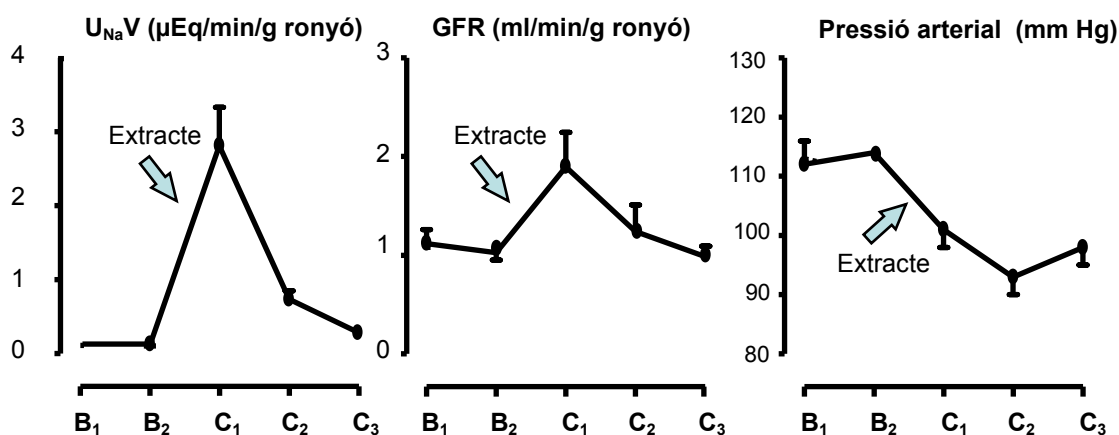


Figura 3. Excreció de sodi en orina (U_{Na}V), taxa de filtració glomerular (GFR) i pressió arterial abans (B₁, B₂) i després (C₁, C₂, C₃) de la injecció intravenosa d'extractes auriculars en rates control. Jiménez W et al. *Am J Physiol* 1986;250:F749-52 (148).

Els pèptids natriurètics son sintetitzats com prohormones, constituint les hormones madures actives els fragments C-terminal formats com a resultat de trencaments específics dels precursors (161,162). En concret, les hormones madures són pèptids de 28, 32 i 22 aminoàcids, respectivament per ANP, BNP i CNP. A causa de la presència d'un enllaç disulfur intramolecular, 17 aminoàcids de la molècula dels pèptids natriurètics presenten una estructura en forma d'anell, onze dels quals són idèntics en els tres pèptids (figura 4). Aquesta estructura en anell es considera essencial en la resposta d'unió amb els seus receptors i en l'activitat biològica dels pèptids natriurètics (163).

Els pèptids natriurètics actuen en els òrgans diana mitjançant la unió a receptors de membrana. El receptor de pèptid natriurètics tipus A (NPR-A) (164) és un receptor transmembrana lligat a guanilil ciclasa que s'expressa en el ronyó, múscul llis, glàndula adrenal, cervell, cor, testicle, ulls, intestí, i mucosa olfactiva. Les accions fisiològiques d'ANP i BNP venen mediades per la unió a aquest receptor i la subsegüent generació del segon missatger intracel·lular GMPc (165,166), el qual actua sobre diverses dianes moleculars com les proteïna quinases dependents de GMPc, canals iònics lligats a GMPc o fosfodiesterases regulades per GMPc (167). S'ha descrit que els ratolins amb dèficit de NPR-A presenten hipertròfia cardíaca, hipertensió arterial i fibrosi ventricular (168,169). Així mateix, també s'ha observat hipertensió arterial en individus que presenten mutacions que condueixen a una disminució de l'expressió del NPR-A (170).

El receptor de pèptid natriurètics tipus B (NPR-B) (171) és el principal receptor del CNP. Aquest receptor també està lligat a guanilil ciclasa i s'expressa preferentment en el cervell (172). El receptor de pèptid natriurètics tipus C (NPR-C) representa el 95% de tots els receptors de pèptids natriurètics i la seva expressió és ubíqua (173). Actua eliminant dels pèptids natriurètics circulants (174), funció que realitza a través d'endocitosis mediada per receptor (175) (figura 4).

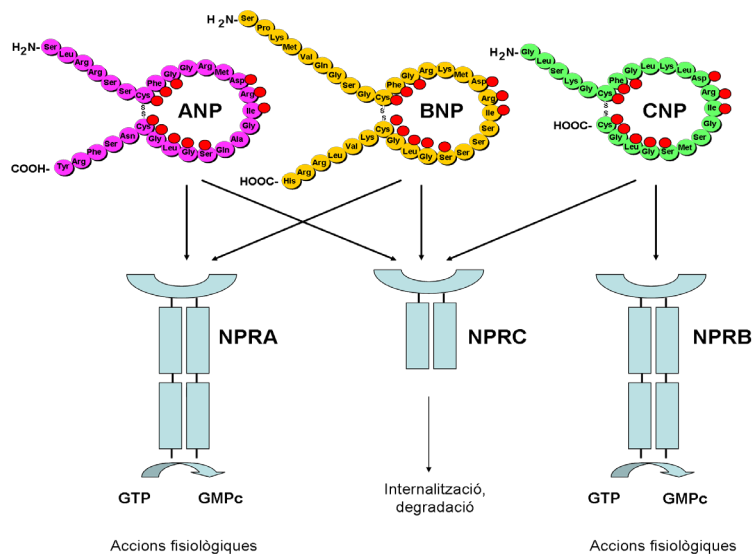


Figura 4. Estructura dels pèptids natriurètics i mecanisme d'acció. Els aminoàcids assenyalats són aminoàcids idèntics en l'estructura dels tres pèptids.

5.2. Síntesi, secreció i processament dels pèptids natriurètics cardíacs

a) Síntesi, secreció i processament de l'ANP

El gen que codifica per l'ANP (NPPA) es localitza en el cromosoma 1p36.2, junt al gen NPPB, que codifica pel BNP. L'aurícula cardíaca és el lloc d'expressió preferent de l'ANP (176). Durant el desenvolupament embrionari, l'ANP també s'expressa a nivells elevats en el ventricle esquerre, però la seva expressió cau bruscament després del naixement (177), observant-se en el ventricle adult concentracions 100 vegades inferiors a nivell d'ARNm i 250-1000 vegades inferiors a nivell proteic en comparació amb l'aurícula (178,179).

L'ANP es sintetitza en els cardiomiòcits auriculars com un pèptid de 151 aminoàcids i és emmagatzemat com a pro-ANP (126 aminoàcids) en grànuls específics. La forma biològicament activa consta de 28 aminoàcids (180) i s'allibera pel trencament del pro-ANP mitjançant l'enzim convertidor d'ANP (corina), una serina-proteasa transmembrana de tipus II específica de miocardi (181). L'ANP és principalment alliberat de l'aurícula en resposta a l'expansió de volum, que és percebuda com un increment de l'estirament auricular (182). A nivell ventricular, la sobrecàrrega cardíaca crònica que ocorre en la insuficiència cardíaca pot provocar també un augment de la producció d'ANP (183,184).

b) Síntesi, secreció i processament del BNP

El humà el gen del BNP es localitza en la regió distal del braç curt del cromosoma 1. Està compost per 3 exons i 2 introns. La seva transcripció genera un ARNm d'uns 700 parells de bases que codifica una prohormona de 134 aminoàcids (185), que conté una seqüència senyal per on és fragmentada, generant una prohormona de 108 aminoàcids (pro-BNP). Una fragmentació addicional, probablement catalitzada pels enzims proteolítics furina i/o corina (181,186), resulta en un fragment aminoterminal inactiu de 76 aminoàcids (NT-proBNP) i un fragment carboxiterminal de 32 aminoàcids

que constitueix el pèptid biològicament actiu (BNP) (figura 5). La longitud del fragment actiu és variable segons l'espècie. En l'humà, el porc i el gos, el BNP consta de 32 aminoàcids (187,188), mentre que en la rata i el ratolí és de 45 aminoàcids (189,190). Mentre que en l'aurícula el BNP és emmagatzemat en grànuls de secreció conjuntament amb l'ANP, la producció ventricular de BNP és constitutiva i està regulada transcripcionalment, principalment per l'estirament de la paret cardíaca com a resultat d'una sobrecàrrega de volum. El factor de transcripció nuclear GATA4 té una funció principal en la regulació d'aquest procés (191,192).

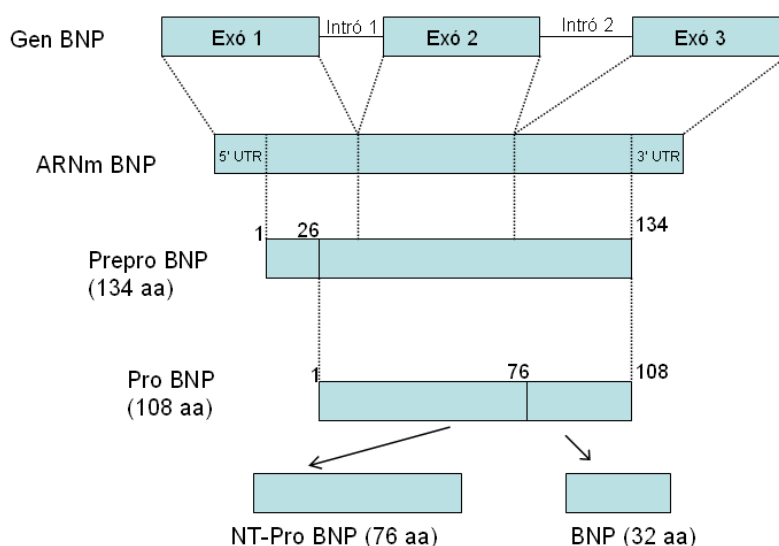


Figura 5. Estructura gènica i via de biosíntesi del pèptid natriurètic tipus B (BNP) en humans. aa: aminoàcids.

El contingut total de BNP i del seu ARNm en el ventricle s'ha calculat que és el 30% i el 70% del total cardíac respectivament (193). No obstant això, el teixit ventricular és el principal productor i secretor de BNP, segons van demostrar inicialment estudis experimentals en models animals (194). En humans, les concentracions plasmàtiques de BNP són majors en la vena interventricular anterior i el si coronari que en l'arrel aòrtica, suggerint també que la síntesi i secreció de BNP és predominantment ventricular (195). La producció ventricular de BNP és encara major en condicions de disfunció ventricular esquerra (193,196,197), constituint la distensió de la paret

cardíaca el principal estímul de síntesi i de secreció (198,199). Els cardiomiòcits són el principal tipus cel·lular productor de BNP i pèptids relacionats (NT-proBNP, proBNP) presents en la circulació sanguínia. L'augment de les concentracions plasmàtiques de BNP venen mediades fonamentalment per l'augment en l'expressió de BNP en el ventricle esquerre (193).

c) Diferències en la síntesi, secreció i processament de l'ANP i el BNP.

Quant als mecanismes de secreció i emmagatzemament intracel·lular, existeixen notables diferències entre els dos sistemes principals de pèptids natriurètics cardíacs (ANP i BNP). Així, l'ANP és emmagatzemat majoritàriament en grànuls auriculars i l'estirament auricular s'acompanya d'una ràpida alliberació d'ANP i pèptids relacionats. En canvi, la síntesi *de novo* d'ANP és lenta i de menor importància. En contraposició, el BNP és secretat majoritàriament a través d'un mecanisme constitutiu i només una petita quantitat es troba emmagatzemada en grànuls de secreció auricular conjuntament amb l'ANP (200,201). Per tant, l'increment de la secreció de BNP és fonamentalment dependent de l'activació gènica i, en conseqüència, és més lent que l'alliberació majoritàriament granular de l'ANP. Aquestes diferències expliquen que aquelles situacions en què existeixen variacions agudes en el grau d'estirament auricular comporten canvis més ràpids en les concentracions circulants d'ANP que en les de BNP (201). A nivell d'expressió gènica, però, l'activació del gen del BNP en resposta a l'estirament ocorre més ràpidament que la d'ANP (202).

d) Diferències en la síntesi, secreció i processament dels pèptids natriurètics a nivell auricular o ventricular.

També existeixen diferències importants en relació a la producció d'ANP i BNP en les diferents cavitats cardíques. En condicions normals, l'aurícula és una font important d'ambdós pèptids (ANP i BNP). No obstant, en condicions d'estirament crònic dels cardiomiòcits (com en la insuficiència cardíaca) existeix una important sobreexpressió de la producció ventricular de pèptids natriurètics (193,202,203), que és

quantitativament molt més important en el cas del BNP que en el de l'ANP. Això ha portat que en la literatura científica, de forma simplificada i en benefici de la comprensió, no sigui infreqüent qualificar el BNP com a hormona ventricular. De fet, en situacions en les que el miocardi és sotmès a distensió per sobrecàrrega de volum o pressió, com en la insuficiència cardíaca, hipertròfia cardíaca o infarts de miocardi importants, s'estimula de forma destacada la síntesi i producció ventricular de BNP. En els IAM, la producció de BNP sembla estar incrementada, en un major grau que la d'ANP, en l'àrea peri-infartada, elevació tradicionalment atribuïda a un mecanisme d'estirament local (204). Existeixen també evidències experimentals que indiquen que, a més de l'estirament muscular cardíac, altres factors estimulen la transcripció de BNP. Neurohormones i citocines antiinflamatòries, incloent endotelina-1, angiotensina II, interleucines i agonistes adrenèrgics poden augmentar la producció cardíaca de BNP de forma paracrina i, possiblement, endocrina (205,206).

5.3. Accions fisiològiques.

Els estudis dels efectes fisiològics de BNP, realitzats mitjançant injecció de BNP en organismes o administració en cèl·lules o òrgans en diferents rangs de concentracions, o mitjançant el disseny de ratolins transgènics o *knockout*, mostren que el BNP s'uneix al NPR-A provocant un augment de la producció intracel·lular de GMPc (207,208). Els principals efectes biològics inclouen diüresi, vasodilatació, inhibició del sistema renina-angiotensina-aldosterona i augment del creixement muscular cardíac i vascular. Els seus efectes paracrins són en general cardioprotectors (208). Els ratolins *knockout* pel BNP presenten fibrosi cardíaca sense hipertensió (209). Els ratolins transgènics que sobreexpresen BNP presenten hipotensió i malformacions òssies (189). Estudis *in vitro* han permès demostrar un efecte inhibidor del BNP sobre la proliferació de fibroblasts cardíacs (210) i sobre la inducció de MMPs (211). Actualment es desconeix si el fragment NT-pro BNP té efectes biològics per si mateix. Igualment, es desconeix si la prohormona intacta pot unir-se als receptors perifèrics.

5.4. Isquèmia miocàrdica, HIF-1 i pèptids natriurètics.

Evidències experimentals mostren que HIF-1 té un paper destacat en la fisiopatologia de la malaltia coronària. La presència de HIF-1 (212-216) i l'augment en l'expressió de diversos dels seus gens diana (217,218), ha estat confirmada experimentalment en el miocardi hipòxic. Així mateix, consistent amb una menor oxigenació cardíaca, s'ha observat l'activació de HIF-1 α en el miocardi isquèmic de rates sotmeses a lligament d'artèries coronàries (219). La inducció de HIF-1 α té lloc de forma ràpida en el curs de l'infart de miocardi, segons es desprèn de l'anàlisi de biòpsies ventriculars obtingudes en pacients amb IAM (220). Determinats polimorfismes de HIF-1 α s'associen amb absència de vasos col·laterals en pacients amb estenosi de les artèries coronàries (221). En els pacients amb SCA, aquests polimorfismes estan presents amb major freqüència en els pacients que presenten angina estable en comparació amb els que presenten infart (222).

HIF-1 té un paper essencial en la resposta del miocardi en situació d'hipòxia (223,224). El paper protector de HIF-1 en situacions d'isquèmia cardíaca s'ha observat en ratolins transgènics que sobreexpressen HIF-1 α . Aquests ratolins presenten, després de la inducció d'IAM, una mida menor de l'infart, major densitat capil·lar i augment de l'expressió de VEGF i NOS2 (225). Semblantment als ratolins transgènics, els ratolins amb nivells cardíacs elevats de HIF-1 α induïts per una disminució de l'activitat de PHD2 també presenten protecció front l'infart de miocardi (226-228). Aquests estudis mostren que HIF-1 regularia la perfusió i l'alliberament d'oxigen constituint un factor important en la capacitat del cor per protegir-se front episodis de falta d'oxigen.

Diverses evidències suggereixen que HIF-1 pot ser inductor de la producció de BNP en cardiomiòcits. S'han identificat llocs d'unió de HIF-1 potencials en la regió promotora del gen del BNP (229) i estudis experimentals en models animals exposats a hipòxia mostren un augment de l'expressió gènica miocàrdica de BNP (230-232). Malgrat tot, la contribució de la hipòxia tissular com a estímul inductor de BNP no està

demostrada, ja que la majoria d'aproximacions experimentals han investigat isquèmia miocardiaca (233,234) o hipòxia crònica en models animals (231,232), que s'associen a alteracions fisiopatològiques més complexes que la hipòxia solament, com poden ser els canvis hemodinàmics i/o en la massa ventricular, que també poden afectar l'expressió de BNP. L'efecte específic de la hipòxia sobre la secreció de BNP en cardiomiòcits ventriculars s'avalua en la part 2 d'aquesta tesi.

La reducció crònica de la tensió d'oxigen incrementa la síntesi cardíaca d'ANP en rates i ratolins (235,236). Igualment, la hipòxia aguda provoca una alliberació d'ANP en models animals. En estudis *in vitro* en cors aïllats de rata i ratolí, la hipòxia estimula l'alliberació d'ANP, suggerint un efecte estimulador directe (236,237). En cultius de cardiomiòcits auriculars de ratolí, l'exposició a hipòxia augmenta l'expressió d'ANP i estimula la seva secreció (238). Semblantment, en cardiomiòcits auriculars de rata l'exposició a hipòxia ha mostrat un augment de la secreció d'ANP, encara que no de la seva expressió gènica (239). Donat que els cardiomiòcits auriculars són la font principal d'emmagatzemament d'ANP, és possible que la gran quantitat d'ANP emmagatzemat en grànuls en els cardiomiòcits auriculars eviti l'augment de síntesi d'ANP en resposta a hipòxia. Els cardiomiòcits ventriculars secreten ANP de forma constitutiva i emmagatzemen només una petita proporció del pèptid sintetitzat (240,241). Per tant, els mecanismes que regulen la producció d'ANP en resposta a hipòxia poden diferir entre els cardiomiòcits auriculars i ventriculars (242). L'efecte específic de la hipòxia sobre la secreció d'ANP en cardiomiòcits ventriculars serà avaluat en la part 2 d'aquesta tesi.

6. SIGNIFICACIÓ CLÍNICA DE LA CONCENTRACIÓ PLASMÀTICA DE BNP

6.1. Valor de la concentració plasmàtica de BNP en la insuficiència cardíaca

Les evidències progressives que el cor constituïa la principal font de síntesi del BNP i que l'estirament miocardiàc era el mecanisme fisiopatològic que en regulava la producció constitueixen la base de les primeres avaluacions clíniques de les concentracions plasmàtiques de BNP, com a indicadors d'insuficiència cardíaca. Aquests estudis van mostrar que les concentracions plasmàtiques de BNP es troben augmentades en pacients amb disfunció ventricular esquerra simptomàtica i asimptomàtica. També va observar-se que tot i que en individus sans les concentracions plasmàtiques del BNP són menys d'una cinquena part que les de l'ANP, en pacients amb insuficiència cardíaca l'increment de la concentració de BNP és molt major. Per aquesta raó, la determinació del BNP es considera més útil que la de l'ANP en la valoració dels pacients amb insuficiència cardíaca i ha estat molt més avaluada en aquesta condició (243,244). La determinació de BNP és útil en la valoració dels pacients amb dispnea, especialment en els casos d'incertesa en el diagnòstic d'insuficiència cardíaca (245-249). De fet, l'avaluació de la dispnea aguda millora quan s'afegeix la determinació de BNP en el judici clínic (245). A més, les concentracions de BNP correlacionen amb la classificació funcional de la insuficiència cardíaca de la New York Heart Association (250). Altres estudis suggereixen que els augments en les concentracions plasmàtiques de BNP ajuden a establir la presència d'insuficiència cardíaca per disfunció diastòlica amb una precisió semblant que en la disfunció sistòlica (251-253), encara que no permeten diferenciar entre ambdues entitats. Més recentment, les determinacions de BNP s'han proposat com a guia del monitoratge terapèutic en la insuficiència cardíaca, tot i que els diferents estudis que han avaluat aquest aspecte han donat resultats no sempre consistents. Actualment, l'evidència científica suggereix que l'ús dels peptids natriurètics com a guia terapèutica pot reduir el nombre d'hospitalitzacions per insuficiència cardíaca en pacients menors

de 75 anys, però no donen suport al seu ús de forma rutinària per sota d'aquesta edat (254-257).

Actualment, en les guies de la insuficiència cardíaca de l'ACC/AHA (American College of Cardiology / American Heart Association) es recull que les determinacions de les concentracions circulants de pèptids natriurètics (BNP o NT-proBNP) poden ser útils en l'avaluació i l'estratificació del risc dels pacients que acudeixen a urgències amb dispnea i en els que el diagnòstic d'insuficiència cardíaca no és clar (258). Semblantment, les guies de la Heart Failure Society of America recomanen determinar BNP o NT-proBNP en tots els pacients amb sospita d'insuficiència cardíaca quan el diagnòstic és incert (259). També les guies de la European Society of Cardiology inclouen la determinació de BNP o NT-proBNP entre les proves diagnòstiques útils en els pacients amb insuficiència cardíaca (260). La majoria de pacients amb dispnea i insuficiència cardíaca presenten valors de $BNP > 400$ pg/mL. Els valors de $BNP < 100$ pg/mL tenen un elevat valor predictiu negatiu pel diagnòstic d'insuficiència cardíaca com a etiologia de la dispnea. En el rang de concentracions de BNP de 100 a 400 pg/mL, però, les concentracions plasmàtiques de BNP no són prou sensibles ni específiques per detectar o excloure la presència d'insuficiència cardíaca. En aquest rang de concentracions han de considerar-se també altres diagnòstics com embolisme pulmonar, disfunció ventricular esquerra sense insuficiència cardíaca o cor pulmonale. Altres limitacions de l'ús de les concentracions plasmàtiques de BNP en el diagnòstic o seguiment en la insuficiència cardíaca inclouen el fet que els pacients poden presentar dispnea aguda per insuficiència cardíaca i per altres causes conjuntament, per la qual cosa les concentracions de BNP elevades no sempre permetrien excloure la presència d'altres causes de dispnea. També s'observa que alguns pacients amb insuficiència cardíaca crònica mantenen elevades les concentracions de BNP a pesar del tractament amb evolució aparentment adequada. En conjunt, les concentracions plasmàtiques de BNP no es consideren de suficient valor com a guia única en la presa

de decisions terapèutiques en pacients amb insuficiència cardíaca. Es recomana el seu ús conjuntament amb la valoració clínica. Finalment, la determinació de la concentració plasmàtica de BNP no serà d'utilitat en l'avaluació de pacients tractats amb nestiride (BNP).

El valor pronòstic de les concentracions plasmàtiques de BNP en la insuficiència cardíaca també ha estat avaluat. Tant en els pacients amb insuficiència cardíaca crònica com en els pacients amb disfunció ventricular esquerra asimptomàtica o poc simptomàtica, les concentracions plasmàtiques de BNP proporcionen informació pronòstica (261-268). Les concentracions plasmàtiques de BNP són un bon indicador de risc de mort o esdeveniments cardiovasculars i podrien ser factors predictors de supervivència superiors que els factors de risc tradicionals com la classificació funcional de la New York Heart Association o inclús la fracció d'ejecció ventricular esquerra (LVEF) (269). La persistència de valors elevats de BNP a pesar del tractament proporciona informació pronòstica (264,265,268). També en pacients amb insuficiència cardíaca crònica, els valors elevats de BNP en el moment de l'alta en pacients ingressats per descompensació són millors indicadors de mortalitat o reingrés que els paràmetres clínics o ecocardiogràfics habituals (270). En pacients amb insuficiència cardíaca aguda descompensada, les concentracions de BNP elevades a l'ingrés són un predictor de mortalitat intrahospitalària amb independència d'altres variables clíniques o bioquímiques (271).

Tot i que BNP i NT-proBNP estan molt relacionats, els dos pèptids presenten diferents rangs, punts de tall proposats (272) i diverses diferències fisiològiques. BNP és l'hormona biològicament activa, mentre que NT-proBNP és una substància biològicament no activa. Els mecanismes d'eliminació i vida mitjana són també diferents. El BNP és degradat per endopeptidases i té una vida mitjana de 5-10 minuts, mentre que l'NT-proBNP s'elimina de forma passiva principalment pel ronyó i té una vida mitjana més llarga, de 25–120 min (273,274). A pesar d'aquestes diferències,

ambdós pèptids tenen moltes semblances pel que es refereix a la seva utilitat en el diagnòstic i estratificació del risc en la insuficiència cardíaca i poden ser considerats intercanviables també en el seu paper potencial com a guia del tractament.

6.2. Valor de la concentració plasmàtica de BNP en la cardiopatia isquèmica

En comparació a la molt abundant literatura científica sobre la relació entre el BNP i la insuficiència cardíaca, hi han menys estudis que avaluïn l'associació entre BNP i isquèmia. D'Souza i col·laboradors (275) detectaren concentracions de BNP en l'efluent coronari durant la reperfusió en cors de rata aïllats, que correlacionaren amb la severitat i duració de la isquèmia miocardiàca. La inducció d'isquèmia durant 2, 5 i 20 minuts provocà un augment de la concentració de BNP en l'efluent coronari durant la reperfusió en relació creixent amb la durada de la isquèmia. La isquèmia induïda als 2 i 5 minuts no es va relacionar amb un augment de la pressió al final de la diàstole, suggerint que la isquèmia per se i no l'estirament ventricular secundari a la isquèmia seria la causa de l'alliberament de BNP. Goetze i col·laboradors (276) demostraren en un model porcí que la inducció d'isquèmia miocardiàca provoca un augment de l'expressió gènica de BNP. En humans, s'ha demostrat un augment de la concentració de BNP en l'efluent coronari pocs minuts després de la inducció d'isquèmia miocardiàca mitjançant l'inflament d'un baló intracoronari (277). Els pacients amb isquèmia miocardiàca i baix grau de necrosi miocardiàca presenten elevació dels pèptids natriurètics. La concentració de NT-proBNP es troba elevada en pacients amb angina inestable en comparació amb pacients amb angina estable i sense malaltia coronària (278). Els pacients en els que es realitza angioplàstia coronària mostren un augment ràpid i transitori de la concentració de BNP (279). S'ha observat que les concentracions plasmàtiques de BNP estan elevades a l'ingrés en els pacients amb IAM, presentant un màxim a les 12-24 hores posteriors a l'inici dels símptomes (280). Després, encara que les concentracions declinen de forma gradual, es mantenen elevades en la fase crònica, reflectint probablement alteracions de la funció ventricular

esquerra o procés de remodelat, ja que en pacients sense remodelat ventricular esquerre les concentracions de BNP solen normalitzar-se després d'una reperfusió coronària precoç (281).

Un estudi inicial en pacients amb cardiopatia isquèmica estable no va observar augment de les concentració de BNP d'aquests pacients (282). Posteriorment, però, Bibbins-Domingo i col·laboradors (283) observen concentracions elevades de BNP en pacients amb malaltia coronària estable, principalment en aquells que tenen història d'IAM, quan s'indueix isquèmia per exercici. Semblantment, Sabatine i col·laboradors (284) observen un augment en les concentracions circulants de BNP després d'una prova d'esforç. Tateishi i col·laboradors (285) observen un augment transitori en la concentració de BNP després d'angioplàstia transluminal percutània, que també suggereix una elevació de les concentracions plasmàtiques de BNP associades a isquèmia miocardiàca aguda. Un metanàlisi recent suggereix que els increments de la concentració de BNP permeten identificar isquèmia induïda amb proves no invasives, però en la majoria d'estudis no s'exclouen els pacients amb insuficiència cardíaca o disfunció ventricular (286). Tot plegat indica la conveniència d'avaluar específicament el comportament de les concentracions plasmàtiques de BNP en els pacients amb isquèmia miocardiàca amb fracció d'ejecció ventricular esquerra preservada (LVEFp). Aquest aspecte s'avalua en la part 3 d'aquesta tesi.

Diferents estudis assenyalen la presència d'una estreta associació entre les concentracions plasmàtiques de BNP i el risc cardiovascular en un rang de circumstàncies diferents (287). Aquesta associació ha estat estudiada particularment en el cas de la malaltia cardíaca estable (287). Igualment, les concentracions elevades de BNP també han demostrat tenir importància pronòstica a curt i llarg termini en pacients amb SCA amb i sense elevació del segment ST (288-299), tradicionalment atribuïda a que indiquen disfunció ventricular esquerra. Semblantment al cas de la insuficiència cardíaca, la determinació plasmàtica de NT-proBNP sembla tenir un valor

predictiu similar al del BNP en els pacients amb isquèmia cardíaca (300-302). Els valors elevats de BNP s'associen amb un augment de mortalitat inclús en pacients amb isquèmia miocardiàca sense insuficiència cardíaca. Malgrat tot, hi ha poca informació sobre si el valor pronòstic de les concentracions plasmàtiques de BNP es manté en els pacients amb SCA i LVEFp. Aquest aspecte s'avalua en la part 3 d'aquesta tesi.

HIPÒTESI i OBJECTIUS

La hipòtesi principal dels estudis inclosos en aquesta memòria és que la hipòxia i la resposta inflamatòria presents en el miocardi isquèmic són inductors específics de remodelat ventricular i que la hipòxia activa la secreció compensatòria de factors cardioprotectors antifibrogèncis a través del factor de transcripció HIF-1.

Per provar aquesta hipòtesi, s'han dut a terme tres estudis. A continuació es presenten les hipòtesis i objectius globals de cada un dels estudis inclosos en aquesta memòria.

Estudi 1. Estudi dels mecanismes moleculars de remodelat ventricular: factors implicats en el recanvi de matriu extracel·lular en cardiomiòcits.

Hipòtesi: els factors proinflamatoris i la reducció de la tensió d'oxigen són inductors específics de recanvi de matriu extracel·lular en els cardiomiòcits ventriculars humans.

Objectius:

- Identificació dels mecanismes moleculars pels quals la isquèmia miocardiàca promou fibrosi cardíaca i remodelat ventricular.
- Identificació dels mecanismes moleculars que regulen la síntesis i secreció dels factors de creixement cardíacs antifibrogènics apelina i VEGF.

Estudi 2. Efecte de la hipòxia sobre la secreció del pèptid natriurètic tipus B (BNP) en cardiomiòcits ventriculars humans.

Hipòtesi: la reducció de la tensió d'oxigen estimula directament l'expressió gènica i la secreció de BNP en cardiomiòcits ventriculars humans en absència d'estímuls hemodinàmics o neurohormonals.

Objectius:

- Establir si la hipòxia és estímul suficient per la secreció de BNP en cardiomiòcits ventriculars humans.
- Identificació dels mecanisme moleculars que regulen la secreció de BNP en condicions d'hipòxia en cardiomiòcits ventriculars humans.

Estudi 3. *Estudi de la significació clínica de les concentracions plasmàtiques de BNP a l'ingrés en pacients amb síndrome coronària aguda (SCA).*

Hipòtesi: els pacients amb SCA i fracció d'ejecció conservada presenten concentracions plasmàtiques de BNP elevades, en relació al grau d'hipòxia cel·lular.

Objectius:

- Avaluar les concentracions plasmàtiques de BNP en pacients amb SCA.
- Analitzar la informació clínica que proporciona la concentració plasmàtica de BNP en pacients amb SCA i LVEF preservada o reduïda.

MÈTODES

A. PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS (ESTUDIS I i II)

Cultiu cel·lular.

Les cèl·lules AC16 es van sembrar en plaques de sis pous (1×10^6 cèl·lules/pou) i es van fer créixer fins arribar a la confluència en medi Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12), complementat amb sèrum boví fetal (12,5%), penicil·lina (50 U/ml) i estreptomicina (50 μ g/ml). Després, el medi va canviar-se per DMEM-F12 lliure de sèrum durant 10 hores i, posteriorment, les cèl·lules es van incubar durant intervals de temps variables en DMEM-F12 en condicions normòxiques (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) o hipòxiques (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) en incubador CO₂/O₂ (Forma Scientific Series II, 3131, Marietta, OH). També es van realitzar cultius cel·lulars en presència de clorur de cobalt (CoCl₂, estabilitzador de HIF-1 α), rotenona (inhibidor de HIF-1), TNF α , IL1 β o vehicle.

La viabilitat cel·lular va determinar-se afegint 0,4 mg de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) a les cèl·lules i incubant-les a 37°C durant 90 minuts. El medi va descartar-se i es van afegir 200 μ l de N-propanol a cada pou. Després de 5-10 minuts de reacció, es van obtenir 50 μ l de solució, es van transferir a una placa de 96 pous i es va mesurar la densitat òptica a 570 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, Ca).

Estudi de l'efecte de la hipòxia i les citocines proinflamatòries en la producció cel·lular.

Un cop completats els períodes d'incubació de cultiu cel·lular, es van obtenir mostres de medi per mesurar la concentració de PIIINP, TIMP-1, HA, apelina, VEGF, BNP i ANP. Els medis es van centrifugar a 2000 rpm durant 10 minuts, es van decantar en tubs nous i es van desar a -20°C o -80°C fins a la determinació. Prèviament a la determinació d'apelina, els medis (4 ml) van concentrar-se mitjançant filtres de

centrífuga Amicon Ultra (3-KDa, Millipore, Carrigtwohill, Ireland). La concentració de proteïna en el medi va determinar-se mitjançant l'assaig de Bradford (331).

Anàlisi de l'expressió de l'ARNm dels components de matriu extracel·lular i factors de creixement.

L'ARN total cel·lular es va extreure mitjançant un kit comercial (RNeasy, Qiagen, Germany). Les mostres van ser tractades amb ADNasa (Ambion, Austin, TX) i la concentració d'ARN obtinguda va determinar-se per anàlisi espectrofotomètric (ND-100 Spectrophotometer, Nanodrop Technology, USA). Va realitzar-se la retrotranscripció d'un microgram d'ARN (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). L'amplificació dels gens estudiats va realitzar-se mitjançant PCR quantitativa (Light Cycler 480, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Els encebadors (taula 3) i les sondes fluorescents usats per l'amplificació dels diferents gens van ser dissenyats amb software específic (Universal Probe Library Assay Design Center; Roche Applied Science, <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>). La PCR quantitativa va realitzar-se per duplicat. En cada reacció de PCR, el volum total de reacció va ser de 20 µl, que inclouen ADNc diluït 1/16, encebadors (200 nM), sondes fluorescents (100 nM) i enzim polimerasa (FastStart TaqMan Probe Master, Diagnostics). La senyal fluorescent es va detectar durant 45 cicles (desnaturalització 10 segons a 95°C, *annealing* 30 segons a 60°C, extensió 30 segons a 72°C). El gen GAPDH va ser usat com a gen de referència per la normalització. La quantificació relativa va realitzar-se usant el *comparative threshold cycle* (CT), que es relaciona inversament amb l'abundància d'ARNm de la mostra inicial.

Taula 3. Seqüència dels encebadors utilitats per a l'amplificació dels gens avaluats

Gen	Encebador esquerre	Encebador dret
BNP	GATGGTGCAAGGGTCTGG	CCTCTTAATGCCGCCTCA
VEGF	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	GGTCCCGAAACCCTGAG
ANP	GAGCGGACTGGGCTGTAAC	GGAGCCTCTTGCAGTCTGTC
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	CGCCCAATACGACCAAAT
APELINA	GCTCTGGCTCTCCTTGACC	CCATTCCTTGACCCTCTGG
COL1A1	CCCTGGAAAGAATGGAGAT	AATCCTCGAGCACCTGA
COL1A2	CCAGCTGGTCCAAATGGT	CACCAGGGAAACCAGTCATAC
PDGFRB	TTCCATGAGGATGCTGAGGT	CAGGGTGGCTCTCACTTAGC
TGFBR-1	AGGCCAAATATCCCAAACA	CCAACATTCTCTCATAATTTTAGCC
MMP2	CCCAAAACGGACAAAGAGTT	CTTCAGCACAAACAGGTTGC
TIMP-1	GGGCTTCACCAAGACCTACA	TGCAGGGGATGGATAAACAG
TIMP-2	GAAGAGCCTGAACCACAGGT	CGGGGAGGAGATGTAGCAC

Determinació de l'activitat gelatinasa.

L'activitat de les MMPs va ser analitzada mitjançant zimografia. Els medis de cultiu obtinguts de cèl·lules incubades en condicions de normòxia, hipòxia, vehicle o tractades amb IL1 β van ser concentrats amb filtres de centrífuga Amicon Ultra (3-KDa, Millipore, Carrigtwohill, Ireland) i es va determinar la concentració proteica. Es va realitzar electroforesi dels medis concentrats (100 μ g de proteïna) en gels d'acrilamida que contenien un 0,2% de gelatina. Després de l'electroforesi, els gels van rentar-se amb una solució aquosa de Tritó X-100 al 2,5% i posteriorment es van incubar durant 23 hores a 37°C en un tampó Tris-HCl (50 mM) que també contenia CaCl₂ (5 mM), ZnCl₂ (2 μ M) i NaN₃ (0,02%). Finalment, els gels van ser tenyits amb blau de Coomassie R250 (0,4%) i destenyits amb una solució 50% aigua, 10% àcid acètic i 40% metanol. Es va escanejar i

determinar la intensitat de les bandes proteolítiques de 62 kDa, corresponents a la forma activa de la MMP-2.

Determinació de l'efecte de la hipòxia sobre l'activació de HIF-1 en les cèl·lules AC16.

L'activitat intranuclear de HIF-1 va ser determinada en els extractes nuclears de les cèl·lules AC16 obtingudes després de l'exposició a hipòxia o normòxia. Els nuclis cel·lulars es van obtenir mitjançant un kit d'extracció nuclear (Active Motif, Carlsbad, CA). Les cèl·lules es van recollir i lisar i es va eliminar la fracció citosòlica. Els extractes nuclears van ser homogeneïtzats, recollits i va determinar-se la concentració proteica. L'activació de HIF-1 va determinar-se mesurant la capacitat d'unió dels extractes nuclears (6 µg) a una seqüència d'oligonucleòtids d'un element de resposta a hipòxia (TransAM, Active Motif).

Per avaluar l'efecte inhibitor sobre l'activació de HIF-1, les cèl·lules AC16 van exposar-se a rotenona (2,5 µM), durant 40 minuts i després a hipòxia (5% O₂) o normòxia (21% O₂) durant 24 hores. L'activitat de HIF-1 va determinar-se en els nuclis cel·lulars i es va recollir el medi per a la determinació de les concentracions de PIIINP, TIMP-1, HA, Apelina, VEGF, ANP i BNP.

Determinacions i anàlisi estadística.

Les concentracions de PIIINP, TIMP-1, HA i BNP es van mesurar mitjançant immunoassaigs de quimioluminescència (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY). La concentració d'apelina i VEGF es va determinar per enzimmunoassaig (Apelin-12 microplate ELISA assay kit, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA i VEGF Quantikine, Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN). L'ANP va ser prèviament extret de les mostres de medi mitjançant extracció en fase sòlida amb columnes Sep Pack C-18 (Waters Associates, Milford, MA) i determinat per radioimmunoassaig (Euro-Diagnostica, Arnhem, The Netherlands).

Les dades experimentals es presenten com a mitjana \pm error estàndard. Les comparacions entre les condicions de normòxia i hipòxia i entre cèl·lules tractades i vehicle van realitzar-se amb la prova estadística d'anàlisi de la variança i *post hoc* Bonferroni t-test o la prova t de Student. La prova t de Student va usar-se per avaluar l'efecte de la rotenona i CoCl_2 sobre la producció dels diferents factors per part de les cèl·lules AC16. Es van considerar diferències significatives els valors de $p < 0,05$.

B. PACIENTS I MÈTODES (ESTUDI III)

Població d'estudi

Van ser inclosos en l'estudi un total de 1806 pacients ingressats de forma consecutiva amb SCA dins de les primeres 24 hores posteriors a l'inici dels símptomes. El diagnòstic d'IAM es va basar en els criteris de la definició universal d'infart de miocardi (13). Tots els pacients van ser sotmesos a una exploració física i una entrevista clínica sistematitzades per recollir detalls dels símptomes, antecedents patològics, tractaments previs i intercurrents i possibles desencadenants de la SCA. Es van realitzar electrocardiogrames seriatos a tots els pacients. Dins les primeres 48 hores posteriors a l'ingrés es va realitzar un estudi ecocardiogràfic estandarditzat amb càlcul de LVEF per mètode de Simpson biplanar seguint les recomanacions de l'American Society of Echocardiography (332). Els pacients es van classificar segons el valor de la LVEF en dos grups: pacients amb LVEF preservada (pLVEF: $\text{LVEF} \geq 55\%$) i pacients amb LVEF reduïda (rLVEF: $\text{LVEF} < 55\%$). El diagnòstic d'insuficiència cardíaca es va basar en els criteris de l'European Society of Cardiology (260). En els pacients sotmesos a coronariografia es van recollir dades sobre el nombre de vasos coronaris afectats, la realització d'intervenció coronària percutània i el seu resultat. Es va recollir sang venosa de tots els pacients per a les determinacions de laboratori, incloent, a més dels paràmetres habituals, les concentracions plasmàtiques de troponina cardíaca I (TnI), proteïna C-reactiva ultrasensible (PCRus) i BNP. En l'estudi es van incloure també 78 pacients control amb dolor toràcic d'origen no isquèmic als quals

es va mesurar la concentració plasmàtica de BNP. L'obtenció i utilització de les dades clíniques així com de les mostres biològiques es va realitzar previ consentiment informat per escrit dels pacients. El Comitè d'Ètica per a la Investigació Clínica de la institució va aprovar l'estudi, que es va realitzar d'acord amb la declaració de Hèlsinki.

Paràmetres de laboratori.

Per l'anàlisi de BNP es van obtenir mostres sanguínies per punció venosa de tots els pacients dins de les 48 hores següents a l'episodi de SCA. Les mostres sanguínies van ser recollides en tubs amb EDTA com anticoagulant i mantingudes en gel fins a la seva centrifugació (3000 rpm, 15 min a 4 °C). El plasma va ser desat a una temperatura de -80°C fins a la seva determinació mitjançant un immunoassaig de quimioluminiscència en l'autoanalitzador ADVIA Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). La variabilitat del mètode va ser avaluada. La variabilitat intra-assaig (n=10) del mètode va ser de 2,3%, 1,3% i 2,7% a concentracions de BNP de 47 pg/ml, 468 pg/ml i 1810 pg/ml, respectivament. La variabilitat inter-assaig (n=10) va ser de 5,0%, 2,8% i 2,0% a les mateixes concentracions de BNP.

La concentració plasmàtica de TnI va ser determinada mitjançant un immunoassaig de quimioluminiscència en l'autoanalitzador ADVIA Centaur CP (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Els altres paràmetres de laboratori estudiats van ser determinats mitjançant mètodes estàndard en autoanalitzadors ADVIA 2400 i ADVIA 120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). La taxa de filtració glomerular va estimar-se amb la fórmula MDRD (333).

Seguiment, esdeveniments clínics i anàlisi estadística.

L'objectiu principal de l'estudi de seguiment va ser el compost de mortalitat de qualsevol causa i presentació de nous episodis de SCA. La mitjana de seguiment va ser de 394 dies. Es va realitzar un seguiment mitjançant contacte telefònic de tots els pacients. Per l'anàlisi estadística dels resultats es va utilitzar les proves t de Student, chi-quadrat i

regressió lineal. L'associació entre les concentracions de BNP i l'aparició d'esdeveniments adversos es va estudiar mitjançant la prova de t de Student per a mostres independents, i l'anàlisi de la corba característica d'operació del receptor (ROC). Les diferències van ser considerades significatives per a un valor de $p < 0,05$. Les dades demogràfiques s'expressen com mitjanes o percentatges, mentre que la resta de paràmetres s'expressen com a mitjana \pm error mig.

RESULTATS

PART I. ESTUDI DELS MECANISMES MOLECULARS DE REMODELAT VENTRICULAR: FACTORS IMPLICATS EN EL RECANVI DE MATRIU EXTRACEL·LULAR EN CARDIOMIÒCITS.

1. La hipòxia activa la producció de PIIINP, Apelina i VEGF i disminueix l'expressió de TIMP-1 en cardiomiòcits ventriculars humans.

Per investigar si la tensió reduïda d'oxigen constitueix un estímul específic de la secreció de components de recanvi de matriu extracel·lular i factors de creixement en els cardiomiòcits ventriculars humans adults, van incubar-se cèl·lules AC16 en condicions de normòxia o d'hipòxia durant diferents períodes de temps i es va determinar la concentració de PIIINP, TIMP-1, HA, apelina i VEGF en el medi de cultiu. No van observar-se diferències en la viabilitat cel·lular, determinada per l'assaig MTT entre les cèl·lules incubades en condicions normòxiques i hipòxiques. Les cèl·lules AC16 van augmentar progressivament la secreció de PIIINP, TIMP-1 i HA durant les 48 hores d'incubació. A més, la secreció de PIIINP va ser significativament superior a les 24 i 48 hores d'exposició a hipòxia (figura 1A). En concret, la concentració de PIIINP va ser de 2 a 3 vegades superior en el medi de les cèl·lules hipòxiques que en el de les cèl·lules normòxiques. Pel contrari, la secreció de TIMP-1 va ser significativament inferior a les 48 hores d'exposició a hipòxia (figura 1B). La secreció d'HA no va mostrar cap modificació provocada per la exposició a hipòxia. La secreció d'apelina va ser significativament superior a les 24 i 48 hores d'exposició a hipòxia (figura 1C). La inducció d'apelina per la hipòxia es va veure acompanyada per un increment paral·lel del VEGF, factor conegut de resposta a hipòxia (figura 1D).

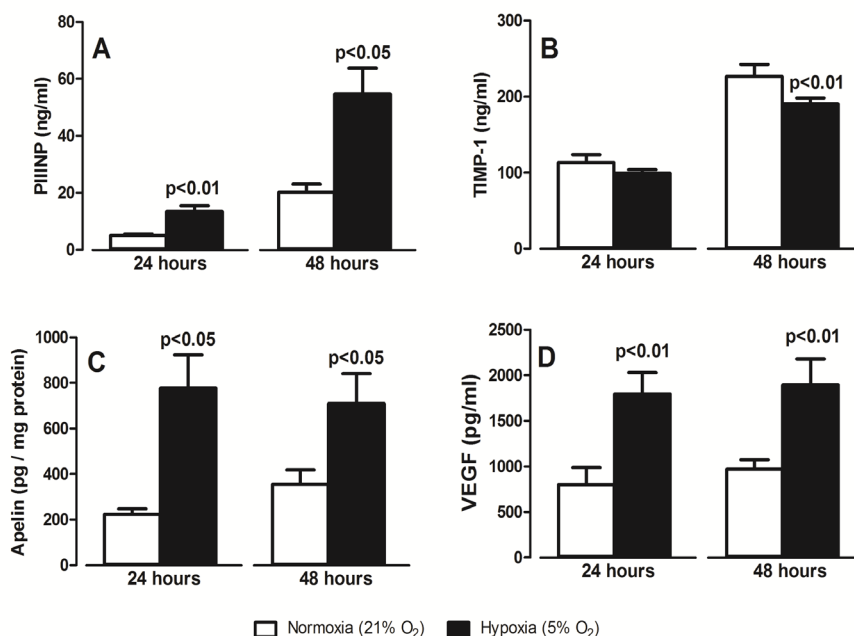


Figura 1. Producció del propèptid aminoterminal del procol·lagen tipus III (PIIINP) (A), inhibidor tissular de metal·loproteïnases tipus 1 (TIMP-1) (B), apelina (C) i factor de creixement endotelial vascular (VEGF) (D) després de 24 i 48 hores d'incubació en condicions normòxiques (21% O₂) o hipòxiques (5% O₂). p<0,05 o p<0,01 vs condicions normòxiques (prova t de Student); n=6 mesures idèntiques.

2. La hipòxia inhibeix l'expressió gènica dels TIMPs i activa la d'apelina i VEGF en cardiomiòcits ventriculars humans.

L'efecte de la hipòxia sobre el remodelat cardíac i els factors de creixement va avaluarse també a nivell de l'ARNm. Va mesurar-se l'expressió gènica de TIMP-1, TIMP-2, apelina, VEGF, PDGFR β , TGF β R1, MMP2, Col1 α 1 i Col1 α 2. El gen GAPDH va utilitzar-se com a control endogen i no van observar-se diferències en la seva expressió en funció de l'exposició a hipòxia o normòxia. L'anàlisi per PCR en temps real indica que l'exposició a hipòxia disminueix l'ARNm de TIMP-1 i TIMP-2 i augmenta el d'apelina i VEGF (taula 1). S'observa una tendència a una menor expressió de PDGFR β i TGF β R1 en les cèl·lules exposades a un 5% d'O₂, tot i que les diferències no són estadísticament significatives. Tampoc s'observen diferències significatives en l'expressió gènica de MMP2, Col1 α 1 i Col1 α 2 entre les cèl·lules cultivades en condicions normòxiques o hipòxiques (taula 1).

Taula 1. Expressió gènica de l'inhibidor tissular de metal·loproteïnases tipus 1 (TIMP-1) i TIMP-2, apelina, factor de creixement endotelial vascular (VEGF), receptor beta del factor de creixement derivat de plaquetes (PDGFR β), receptor 1 del factor de creixement transformant beta (TGF β R1), metal·loproteïnasa 2 (MMP2), col·lagen-1 α 1 (Col1 α 1) i col·lagen-1 α 2 (Col1 α 2) determinada en les cèl·lules AC16 cultivades en condicions normòxiques (21% O₂) o hipòxiques (5% O₂). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard (prova t de Student).

Gens (Fold Change)	Normòxia (21% O ₂)	Hipòxia (5% O ₂)	Significació
TIMP-1	1,04 \pm 0,19	0,48 \pm 0,06	p<0,05
TIMP-2	1,01 \pm 0,11	0,51 \pm 0,13	p<0,05
Apelina	1,01 \pm 0,29	4,36 \pm 0,69	p<0,005
VEGF	1,17 \pm 0,19	4,66 \pm 0,73	p<0,01
PDGFR β	1,06 \pm 0,26	0,66 \pm 0,24	0,32
TGF β R1	1,05 \pm 0,23	0,65 \pm 0,21	0,27
MMP2	1,01 \pm 0,12	0,96 \pm 0,12	0,76
Col1 α 1	0,93 \pm 0,24	1,00 \pm 0,14	0,83
Col1 α 2	1,17 \pm 0,46	0,92 \pm 0,48	0,72

3. HIF-1 regula la secreció d'apelina i de VEGF però no dels components de recanvi de matriu extracel·lular en cardiomiòcits ventriculars humans.

Seguidament es va avaluar si HIF-1 mediava els canvis observats en els components de recanvi de matriu extracel·lular durant l'exposició a hipòxia. Les concentracions de PIIINP i TIMP-1 en el medi de cultiu no es van veure modificades en els experiments realitzats en presència o absència de CoCl₂ (estabilitzador de HIF-1). A més, l'incubació amb rotenona (inhibidor de HIF-1) tampoc va modificar l'efecte de la hipòxia sobre la secreció de PIIINP i TIMP-1 en els cardiomiòcits. En contraposició a l'efecte observat en els components de recanvi de matriu extracel·lular, sí va observar-se una implicació de HIF-1 en la inducció de la secreció d'apelina i VEGF per la hipòxia en els cardiomiòcits. Les anàlisis de PCR en temps real van mostrar que l'exposició a CoCl₂ té un efecte semblant a la hipòxia sobre l'expressió d'apelina i VEGF en cardiomiòcits humans (figura 2). L'efecte regulador directe de HIF-1 va confirmar-se en determinar

que la rotenona evita la secreció dels factors de creixement induïda per la hipòxia en els cardiomiòcits. Les cèl·lules hipòxiques tractades amb rotenona no mostraren una activació de HIF-1 en comparació amb les cèl·lules incubades en condicions de normòxia, indicant que la rotenona inhibeix l'activació de HIF-1 en les cèl·lules hipòxiques. A més, la rotenona va prevenir l'augment de la secreció d'apelina induïda per la hipòxia (777 ± 146 vs 371 ± 59 pg/mg proteïna; $p<0.01$), així como de VEGF (1922 ± 129 vs 223 ± 22 pg/ml; $p<0,01$), en el medi de cultiu cel·lular de les cèl·lules AC16, indicant que el mecanisme d'estimulació per la hipòxia de la secreció d'apelina i VEGF ve determinat per l'activació de HIF-1.

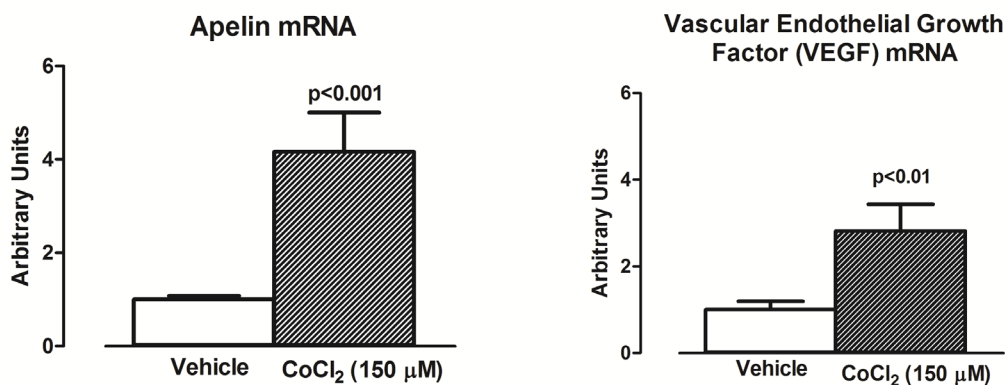


Figura 2. Expressió gènica d'apelina i VEGF en les cèl·lules AC16. Les cèl·lules van exposar-se a vehicle o CoCl_2 durant 6 hores. Es va obtenir l'ARN total i es va analitzar l'expressió d'ARNm mitjançant PCR a temps real. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard. $p<0,01$ vs vehicle (prova t de Student); $n=4$ mesures independents.

4. La $\text{IL1}\beta$, però no $\text{TNF}\alpha$, activa els components de recanvi de matriu extracel·lular en cardiomiòcits ventriculars humans.

Per investigar si les citocines proinflamàtores poden ser estímuls específics per a la secreció de components de recanvi de matriu extracel·lular, es van incubar cardiomiòcits amb $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml), $\text{IL1}\beta$ (20 ng/ml) o vehicle durant 24 hores i es van mesurar les concentracions en el medi de cultiu de PIIINP, TIMP-1 i HA. L'estimulació amb $\text{IL1}\beta$ va provocar un augment significatiu de PIIINP, TIMP-1 i HA (figura 3). Les

concentracions de PIIINP i HA en els medis de cultiu de les cèl·lules estimulades amb IL1 β van ser, respectivament, més de dues i quatre vegades superiors que en els medis de les cèl·lules tractades amb vehicle. Pel contrari, l'estimulació amb TNF α no va modificar el patró de secreció dels components de recanvi de matriu extracel·lular en els cardiomiòcits.

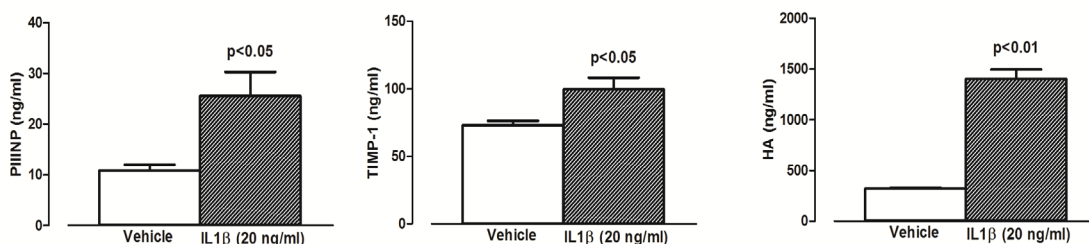


Figura 3. Producció del propèptid aminoterminal del procòl·lagen tipus III (PIIINP), inhibidor tissular de metal·loproteïnases tipus 1 (TIMP-1) i àcid hialurònic en les cèl·lules AC16 exposades a IL1 β (20 ng/ml) o vehicle durant 24 hores. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard. $p < 0,05$ o $p < 0,01$ vs vehicle (prova t de Student); $n = 6$ mesures independents.

5. TNF α , però no IL1 β , augmenta la síntesi i secreció d'apelina en cardiomiòcits ventriculars humans.

Per investigar si les citocines proinflamàtores poden ser estímuls específics per a la secreció de factors de creixement cardíacs, van incubar-se cardiomiòcits amb TNF α (20 ng/ml), IL1 β (20 ng/ml) o vehicle durant 24 hores i van mesurar-se les concentracions d'apelina i VEGF en el medi de cultiu. L'estimulació dels cardiomiòcits amb TNF α va provocar un increment significatiu d'aproximadament dues vegades en la secreció d'apelina i VEGF (figura 4). La incubació de les cèl·lules AC16 amb IL1 β no va produir canvis significatius en la producció d'apelina (307 ± 43 vs 297 ± 38 pg/mg proteïna), però va augmentar la secreció de VEGF (436 ± 46 vs 2728 ± 75 pg/ml; $p < 0,01$).

A nivell de l'expressió gènica, va observar-se un comportament similar al de la secreció proteïca d'Apelina i VEGF en resposta a l'estimulació amb TNF α o IL1 β . A les

3 hores d'incubació, el TNF α va induir un augment de 1,5 cops l'ARNm d'apelina i VEGF (figura 4). A més, la IL1 β va induir 1,6 cops l'ARNm de VEGF però no va modificar l'expressió de apelina.

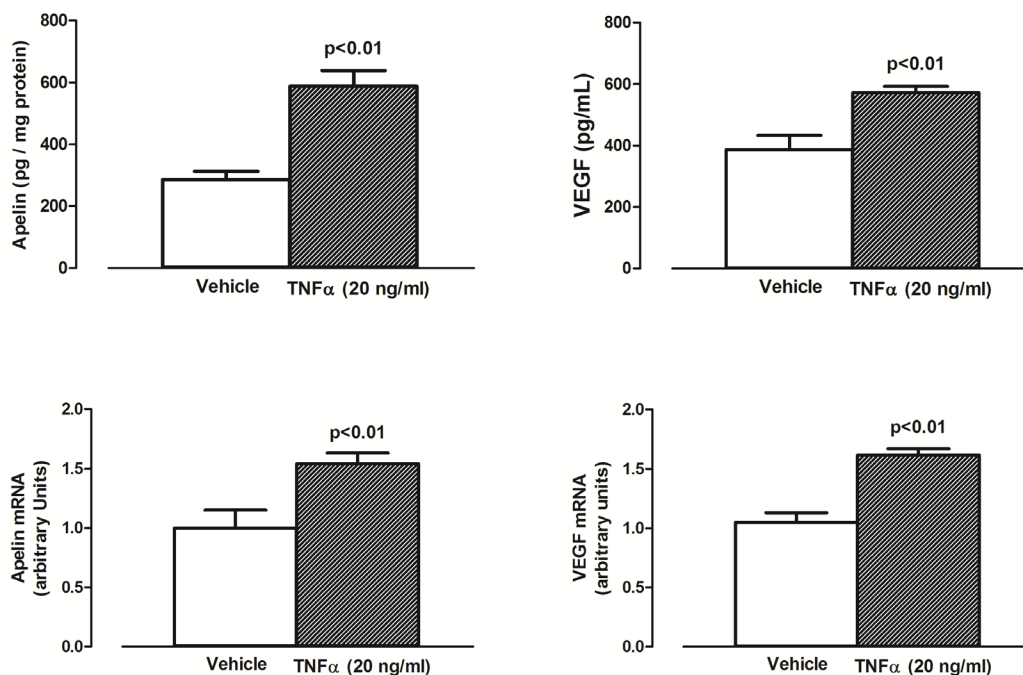


Figura 4. Efecte del TNF α (20 ng/ml) sobre l'expressió d'apelina i el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) en les cèl·lules AC16. Les cèl·lules es van estimular amb TNF α durant 24 o 3 hores per a la determinació de la proteïna o l'expressió gènica respectivament. Es van recollir els medis de cultiu i els extractes cel·lulars per mesurar la concentració proteica i l'abundància d'ARNm d'apelina i VEGF. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard. $p < 0,01$ vs vehicle (prova t de Student); $n = 4$ mesures independents.

6. La IL1 β augmenta l'activitat gelatinolítica en els cardiomiòcits ventriculars humans.

La zimografia dels medis de les cèl·lules AC16 va demostrar la presència d'activitat MMP. L'activitat gelatinolítica va concentrar-se en l'àrea corresponent al rang de pes molecular de 62 kDa, suggestiu de la forma activa de la MMP-2. Els medis de les cèl·lules incubades amb IL1 β van mostrar una activitat proteolítica augmentada en comparació amb les cèl·lules incubades amb vehicle ($1,04 \pm 0,04$ vs $2,04 \pm 0,11$ unitats

arbitraries densitomètriques, $p < 0,05$). En canvi, l'activitat proteolítica dels medis cel·lulars incubats en condicions d'hipòxia no va estar significativament augmentada en comparació amb la de les cèl·lules incubades en condicions normòxiques.

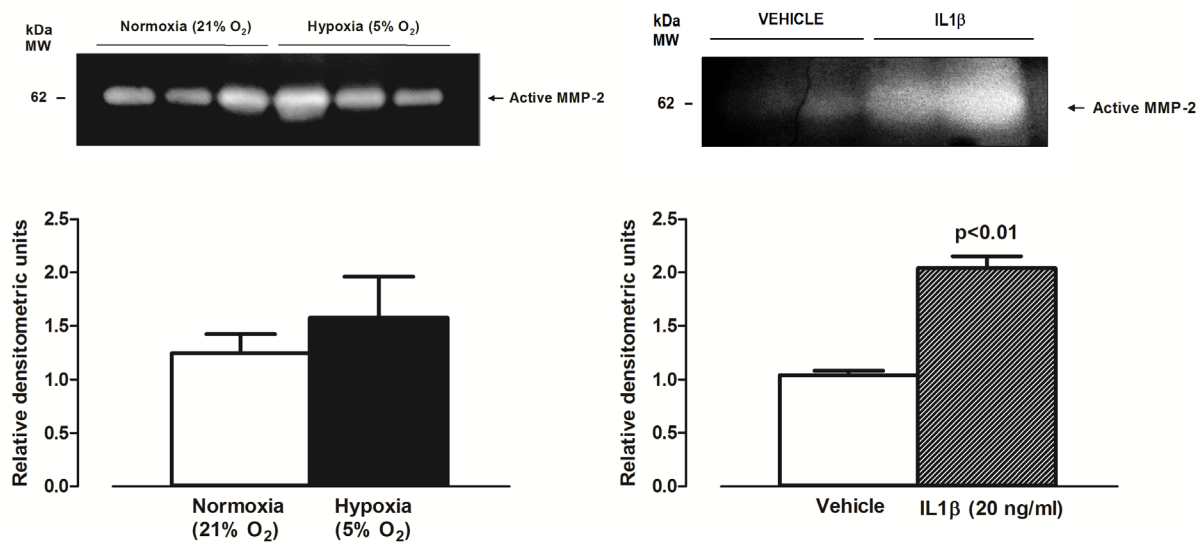


Figura 5. Efecte de la hipòxia i la IL1 β sobre l'activitat MMP en els medis de cultiu de les cèl·lules AC16 cells (100 μ g de proteïna per carril). Zimografia que mostra l'efecte sobre l'activitat MMP en els medis induïda per l'exposició a hipòxia (5%O₂) o tractament amb IL1 β (20 ng/ml) de les cèl·lules AC16. MW: Pes molecular. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard. $p < 0,01$ vs vehicle (prova t de Student); n=3 mesures independents.

PART II: EFECTE DE LA HIPÒXIA SOBRE LA SECRECIÓ DEL PÈPTID NATRIURÈTIC TIPUS B (BNP) EN CARDIOMIÒCITS VENTRICULARS HUMANS.

1. La hipòxia augmenta la producció de BNP i VEGF en cardiomiòcits ventriculars humans.

Per investigar si la tensió reduïda d'oxigen constitueix un estímul específic per a la secreció de BNP, els cardiomiòcits ventriculars humans van ser incubats en condicions hipòxiques (5% O₂) durant intervals de temps creixents. La concentració de BNP, ANP i VEGF va determinar-se en el medi de cultiu cel·lular al final de cada període d'incubació. Els cardiomiòcits ventriculars van augmentar de forma temps dependent la secreció de BNP durant les 48 hores d'incubació. A més, la secreció de BNP per part les cèl·lules incubades en condicions hipòxiques durant 12, 24 i 48 hores va ser significativament superior en comparació amb la de les cèl·lules incubades en condicions normòxiques durant els mateixos intervals de temps (figura 1A). En concret, les concentracions de BNP en el medi de les cèl·lules incubades en condicions hipòxiques van ser de dos a tres vegades majors que les incubades en condicions normòxiques. En canvi, la secreció d'ANP va ser molt reduïda i no es va veure modificada per l'exposició a hipòxia (figura 1A). La inducció hipòxica de la secreció de BNP es va veure acompanyada d'un comportament similar del VEGF, factor conegut de resposta a hipòxia (figura 1B). Així, la cinètica de producció de VEGF també va diferir significativament entre les cèl·lules incubades en condicions normòxiques o hipòxiques. Les concentracions de VEGF en el medi de les cèl·lules cultivades a 5% O₂ van ser de 1,5 a 2,5 vegades majors que en el medi cèl·lules cultivades a 21% O₂. L'estudi de viabilitat cel·lular mitjançant assaig MTT no va mostrar diferències entre els cardiomiòcits incubats en hipòxia o normòxia. La viabilitat cel·lular després de la incubació durant 48 hores en condicions d'hipòxia o normòxia va ser respectivament del 101± 6% i 101 ± 3%.

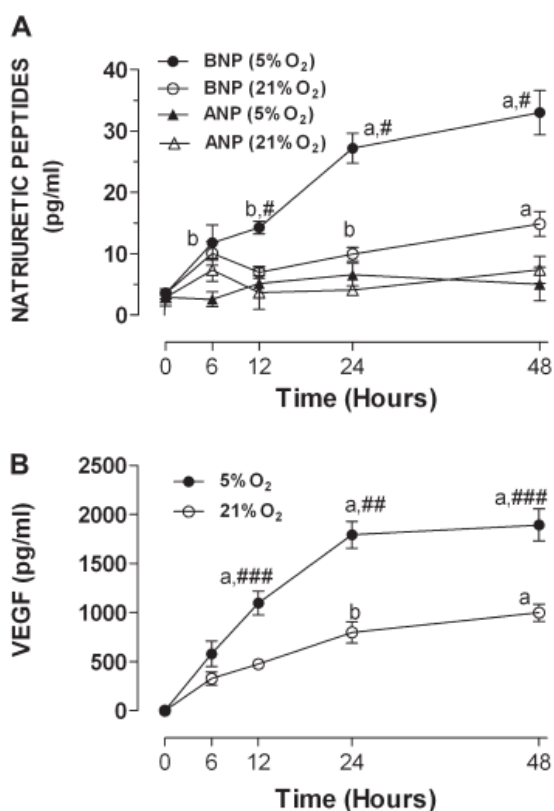


Figura 1. Cinètica de producció dels pèptids natriurètics (A) i VEGF (B) en les cèl·lules AC16 en condicions normòxiques (21% O₂) o hipòxiques (5% O₂). ^ap<0,001 i ^bp<0,005 vs valors basals (ANOVA i Bonferroni test). [#]p<0,001, ^{##}p<0,005, i ^{###}p<0,01 vs condicions normòxiques en els mateixos períodes de temps (prova t de Student); n= 8 mesures independents de pèptid natriurètic tipus B (BNP) i pèptid natriurètic auricular (ANP); n= 6 mesures independents de VEGF.

2. La hipòxia augmenta l'expressió gènica de BNP i VEGF en cardiomiòcits ventriculars humans.

Per determinar si l'augment de la secreció de BNP durant l'exposició a hipòxia dels cardiomiòcits ventriculars s'acompanya d'una inducció de l'expressió gènica de BNP, van obtenir-se cèl·lules incubades en condicions normòxiques o hipòxiques per a la determinació de l'ARNm del BNP. GAPDH va ser el gen utilitzat com a control endogen. No van observar-se diferències significatives en l'ARNm del GAPDH en els diferents períodes experimentals en els que les cèl·lules van ser incubades en condicions de normòxia o hipòxia.

L'anàlisi per PCR en temps real mostra que l'exposició a hipòxia va comportar un increment de 2,8 vegades els nivells d'ARNm del BNP a les 6 hores d'incubació. L'augment de l'ARNm del BNP en condicions hipòxiques manté la significació estadística a les 12 hores d'incubació (figura 2). A les 24 hores, tot i que no estadísticament significatiu, també existeix una tendència a presentar nivells majors de l'ARNm del BNP en hipòxia. Un patró d'expressió similar va observar-se quan es va analitzar l'expressió gènica del VEGF. Els cardiomiòcits incubats en condicions d'hipòxia van presentar un increment de 4 vegades en els nivells d'ARNm del VEGF a les 6 hores d'incubació. A les 12 i 24 hores d'exposició a hipòxia, però, els nivells d'ARNm del VEGF van ser semblants als observats en condicions de normòxia (figura 2). No van observar-se diferències en l'expressió gènica d'ANP entre les cèl·lules cultivades en normòxia o hipòxia en cap dels períodes de temps avaluats.

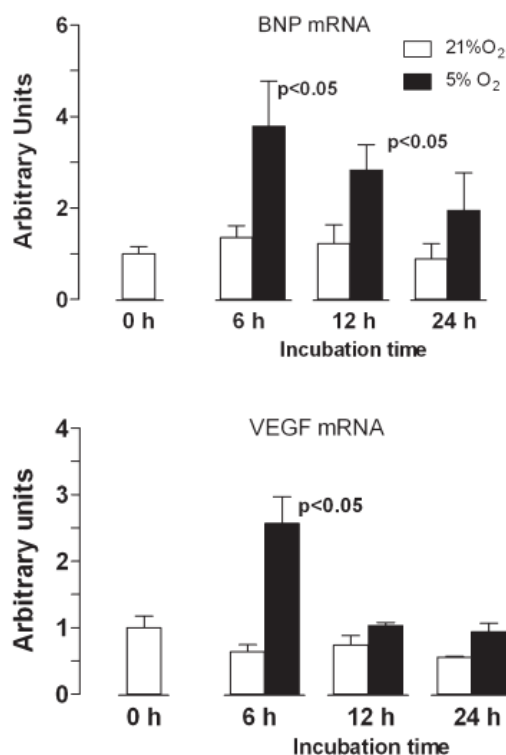


Figura 2. Expressió gènica de BNP (part superior) i VEGF (part inferior) en les cèl·lules AC16 determinada per PCR a temps real després de la incubació en condicions normòxiques (21% O₂) o hipòxiques (5% O₂). Els resultats s'expressen com a mitjana±error estàndard. $p < 0,05$ vs condicions normòxiques en el mateix període de temps (prova *t* de Student); $n = 8$ mesures independents.

3. La hipòxia indueix l'activació de HIF-1 en cardiomiòcits ventriculars humans.

L'activitat de HIF-1 en condicions d'hipòxia o normòxia va determinar-se mitjançant la capacitat d'unió de HIF-1 a una seqüència específica d'oligonucleòtids d'un element de resposta a hipòxia. Després de la incubació durant 1, 3 i 6 hores, les cèl·lules exposades a hipòxia van mostrar una activació de HIF-1, respectivament, 2,0, 2,4, i 3,0 superior que les cèl·lules incubades en normòxia (figura 3).

Les cèl·lules tractades amb rotenona i incubades en hipòxia no van mostrar un increment en l'activitat de HIF-1 en comparació amb les cèl·lules incubades en normòxia (figura 3), indicant que la rotenona inhibeix l'activació de HIF-1 en les cèl·lules hipòxiques.

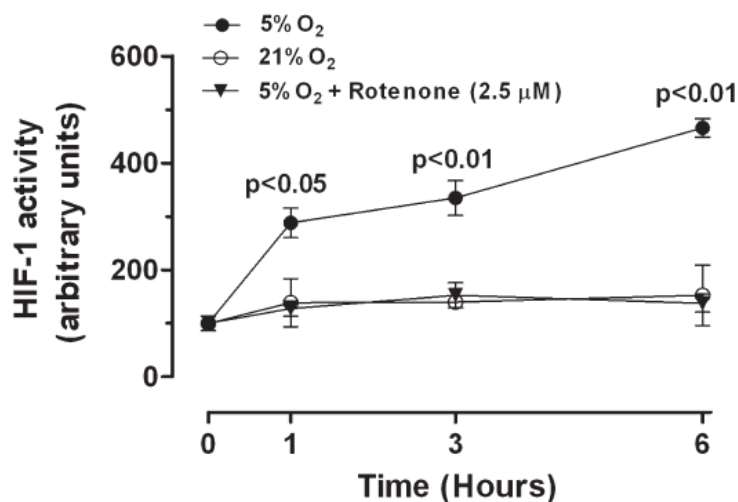


Figura 3. Efecte de la hipòxia sobre l'activitat del factor induïble per hipòxia 1 (HIF-1) en les cèl·lules AC16. Les cèl·lules van incubar-se durant intervals de temps variables en condicions de normòxia (21% O₂) o hipòxia (5% O₂) en presència o absència de rotenona (2,5 μM). Les cèl·lules van ser exposades a rotenona 40 minuts abans de l'exposició a hipòxia i mantingudes en aquesta condició. Després de la incubació, les cèl·lules van ser lisades i es va mesurar la capacitat d'unió de l'ADN dels extractes nuclears a una sonda que contenia la seqüència d'un element de resposta a hipòxia. La presència del factor de transcripció unit a l'ADN es va detectar seguidament mitjançant anticossos anti-HIF-1 i es va revelar per colorimetria; n=8 mesures independents.

4. La inhibició de HIF-1 disminueix la producció de BNP i VEGF induïda per la hipòxia en cardiomiòcits ventriculars humans.

Per demostrar que HIF-1 està directament implicat en l'activació de la producció de BNP en condicions d'hipòxia, va determinar-se si la inhibició de HIF-1 amb rotenona evita la secreció de BNP induïda per la hipòxia en els cardiomiòcits ventriculars. Els resultats mostren que la hipòxia provoca un augment de la concentració de BNP en el medi de cultiu, però aquest efecte no s'observa en els cardiomiòcits incubats en presència de rotenona (figura 4). L'efecte inhibidor de rotenona en la secreció de BNP va ser similar a l'observat en la producció de VEGF (figura 4). En conjunt, els resultats indiquen que el mecanisme de la secreció del BNP induïda per la hipòxia ve determinat per l'activació del factor de transcripció HIF-1.

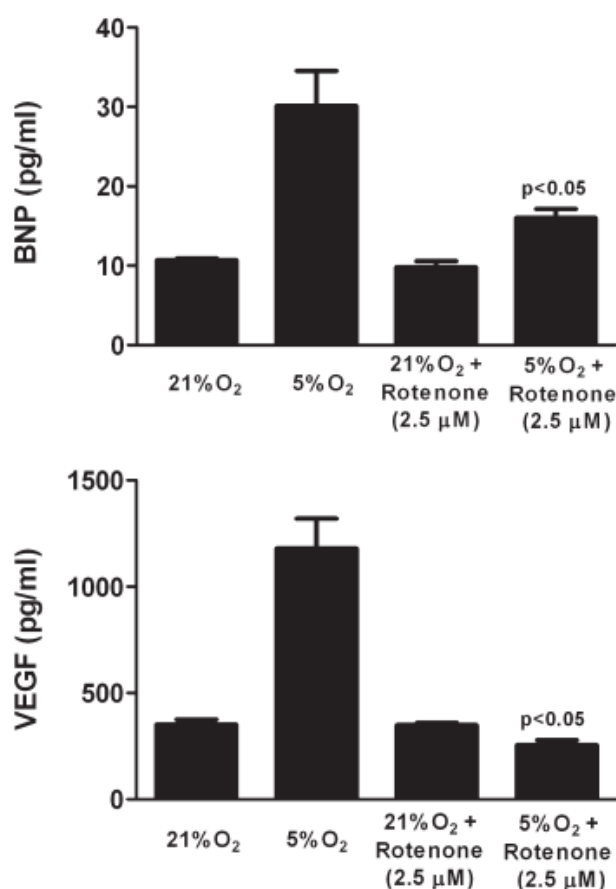


Figura 4. Producció de BNP (part superior) i VEGF (part inferior) després de 24 hores d'exposició a normòxia (21% O₂), hipòxia (5% O₂), i exposició a hipòxia i normòxia amb l'inhibidor de l'activació de HIF-1 rotenona (2,5 µM). Les cèl·lules van ser exposades a rotenona 40 minuts abans de l'exposició a hipòxia o normòxia i mantingudes en aquesta condició. $p < 0,05$ vs 5% O₂; $n=8$ mesures independents.

PART III. ESTUDI DE LA SIGNIFICACIÓ CLÍNICA DE LES CONCENTRACIONS PLASMÀTIQUES DE BNP EN PACIENTS AMB SÍNDROME CORONÀRIA AGUDA.

1. Característiques de la població estudiada.

Es van incloure a l'estudi un total de 1806 pacients amb SCA. El 73% dels pacients van ser homes i l'edat mitjana dels pacients va ser de $67,9 \pm 17,7$ anys. El 84% dels pacients van ser classificats com a classe funcional Killip 1. El diagnòstic va ser d'IAM amb elevació del segment ST (STEMI) en el 29,7 % de dels casos, IAM sense elevació del ST (NSTMEI) en el 44,4% i angina inestable en el 25,9%. Va realitzar-se una angiografia coronària en el 84% dels pacients, una intervenció coronària percutània en el 41,1% i un bypass coronari en el 3,8%. Els pacients van ser dividits en dos grups en funció de si presentaven una LVEF preservada (LVEFp; $LVEF \geq 55\%$) o reduïda (LVEFr; $LVEF < 55\%$). Es va obtenir informació de la LVEF de 1698 pacients: 744 (43,8%) tenien LVEFp i 954 (56,2%) tenien LVEFr. En les taules 1 i 2 es mostren les característiques demogràfiques, els factors de risc cardiovascular, la LVEF i les característiques clíniques, angiogràfiques i bioquímiques dels pacients estudiats. Els pacients amb LVEFp i LVEFr tenien una edat semblant però la proporció d'homes va ser major en el grup de LVEFr. La LVEF mitjana de tots els pacients va ser del $48,7 \pm 12,5\%$. La LVEF mitjana dels pacients LVEFp i LVEFr va ser del $60,0 \pm 4,7\%$ i $39,8 \pm 8,9\%$ respectivament. El percentatge de pacients amb hipertensió arterial, dislipèmia, diabetis mellitus i tabaquisme va ser semblant entre el grup de LVEFp i LVEFr. Els pacients amb LVEFr van presentar un major grau en la classificació Killip, un major nombre de vasos afectats, un menor nombre d'angiografies coronàries i d'intervencions coronàries percutànies, i un major nombre de STEMI. Els pacients amb LVEFr presentaven majors concentracions circulants de TnI, CK-MB, HbA1C, PCRus i BNP, així com pitjor funció renal.

Taula 1. Característiques demogràfiques i factors de risc cardiovascular dels pacients estudiats.

	Tots els pacients n=1806	Pacients amb LVEF ≥55% n=744	Pacients amb LVEF <55% n=954	p
Homes	1312 (72,6%)	508 (68,3%)	737 (77,3%)	<0,001
Edat en anys	67,9 (12,7)	67,0 (12,1)	68,0 (13,1)	ns
Hipertensió arterial	1355 (75,0%)	547 (73,5%)	725 (76,0%)	ns
Dislipèmia	1033 (57,2%)	434 (58,3%)	538 (56,4%)	ns
Diabetes mellitus	618 (34,2%)	244 (32,8%)	337 (35,3%)	ns
Fumador actiu	549 (30,4%)	231 (31,0%)	285 (29,9%)	ns

LVEF: Fracció d'ejecció ventricular esquerra. ns: significatiu. Els valors d'edat es presenten com a mitjana (desviació estàndard). La resta de resultats es presenten com a nombre absolut de pacients (percentatge sobre el grup).

Taula 2. Característiques clíniques, angiogràfiques i bioquímiques dels pacients estudiats.

	Tots els pacients n=1806	Pacients amb LVEF≥55% n=744	Pacients amb LVEF<55% n=954	p
Classificació killip				
I	1510 (83,6%)	705 (94,8%)	727 (76,2%)	
II	154 (8,5%)	28 (3,8%)	120 (12,6%)	<0,001
III	79 (4,4%)	9 (1,2%)	59 (6,2%)	
IV	63 (3,5%)	2 (0,3%)	48 (5,0%)	
Diagnòstic				
STEMI	537 (29,7%)	125 (16,8%)	384 (40,3%)	
NSTEMI	802 (44,4%)	338 (45,4%)	417 (43,7%)	<0,001
Angina inestable	467 (25,9%)	281 (37,8%)	153 (16,0%)	
Angiografia coronària	1522 (84,3%)	658 (88,4%)	809 (84,8%)	0,028
PCI	742 (41,1%)	364 (48,9%)	351 (36,8%)	<0,001
CABG	68 (3,8%)	25 (3,4%)	38 (4,0%)	ns
CAD (nº vasos afectats)	1,47 (0,89)	1,32 (0,89)	1,59 (0,87)	<0,001
CK-MB màxima (IU/l)	71,8 (113,3)	42,0 (81,6)	93,5 (127,5)	<0,001
TnI màxima (ng/ml)	43,9 (119,7)	12,1 (46,5)	67,6 (148,3)	<0,001
Glucosa a l'ingrés (mg/dl)	162,1 (78,7)	148,2 (68,8)	172,8 (84,0)	<0,001
Glucosa en dejú (mg/dl)	123,6 (49,3)	116,5 (42,7)	128,3 (52,1)	<0,001
MDRD (ml/min/1,73 m ²)	81,4 (31,7)	86,2 (32,2)	79,1 (30,8)	<0,001
MDRD<30 (ml/min/1,73 m ²)	46 (2,5)	16 (2,2)	24 (2,5)	ns
HbA1c (%)	5,73 (1,52)	5,64 (1,46)	5,83 (1,59)	0,022
PCRus (mg/dl)	2,85 (4,16)	1,92 (2,82)	3,50 (4,77)	<0,001
BNP (pg/ml)	221,6 (352,8)	97,2 (121,8)	310,9 (432,9)	<0,001
BNP>150 pg/ml	397 (22,0)	83 (11,2)	295 (30,9)	<0,001

LVEF: fracció d'ejecció ventricular esquerra. STEMI: infart de miocardi amb elevació del segment ST. NSTEMI: infart de miocardi sense elevació del segment ST. PCI: intervenció coronària percutània. CABG: cirurgia de revascularització coronària. CAD: malaltia arterial coronària. CK-MB: fracció MB de la creatin kinasa. TnI: troponina I. MDRD: Modification of Diet in Renal Disease. HbA1c: hemoglobina A1C. PCRus: proteïna C reactiva ultrasensible. BNP: pèptid natriurètic tipus B. Els resultats de classe killip, diagnòstic, angiografia coronària, PCI i CABG es presenten com a nombre absolut de pacients (percentatge sobre el grup). La resta de resultats es presenten com a mitjana (desviació estàndard)

2. Les concentracions plasmàtiques de BNP es troben elevades en pacients amb SCA i LVEFp.

D'acord amb el major grau de disfunció ventricular esquerra, les concentracions plasmàtiques de BNP van ser superiors en els pacients amb LVEFr en comparació amb els pacients amb LVEFp ($310,9 \pm 432,9$ vs $97,2 \pm 121,8$ pg/ml; $p < 0,01$). Les concentracions plasmàtiques de BNP en els pacients amb LVEFp, però, van ser superiors a les d'un grup control amb dolor toràcic de causa no isquèmica i LVEF semblant ($97,2 \pm 121,8$ pg/ml vs $60,0 \pm 12,0$ pg/ml; $p < 0,0001$), (figura 1). Un 11,2% dels pacients amb SCA i LVEFp va presentar concentracions plasmàtiques de BNP per sobre de 150 pg/ml.

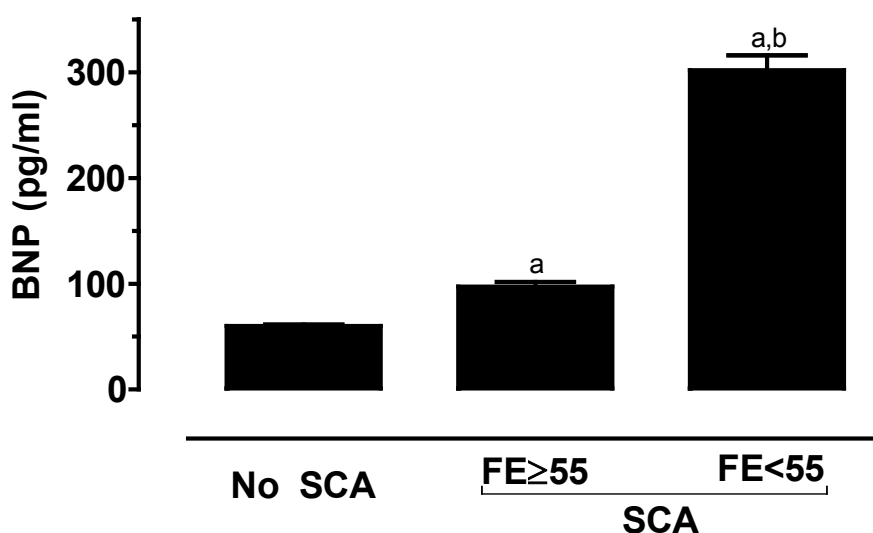


Figura 1. Concentracions plasmàtiques de BNP en pacients amb dolor toràcic no isquèmic (No SCA), pacients amb SCA i FE \geq 55, i pacients amb SCA i FE<55. ^a $p < 0,0001$ vs No SCA, ^b $p < 0,0001$ vs FE \geq 55. Prova estadística t-Student. Valors expressats com a mitjana \pm error estàndard.

3. Les concentracions plasmàtiques de BNP a l'ingrés tenen valor pronòstic en pacients amb SCA i LVEFp.

En la taula 3 es mostren els esdeveniments adversos durant el seguiment. El temps de seguiment mig va ser d'aproximadament 13 mesos (393,7 dies), durant el qual el 9,1% de tots els pacients presentaren esdeveniments adversos. L'aparició d'un nou SCA i/o mortalitat va ser més freqüent en el grup amb LVEFr que en el grup amb LVEFp (10,0% vs 7,9%). Aquesta diferència està relacionada principalment amb la mortalitat, que va ser del 5,3% en el grup amb LVEFr i del 2,8% en el grup amb LVEFp ($p < 0,003$). En canvi, l'aparició d'un nou SCA va ser del 7,0% en els pacients amb LVEFp i del 8,0% en els pacients amb LVEFr, diferències que no van ser estadísticament significatives. La figura 2 mostra les corbes Kaplan-Meier de supervivència lliure de mort i/o de presentació de nous episodis de SCA en funció de les concentracions plasmàtiques de BNP a l'ingrés. Els pacients amb $BNP > 150$ pg/ml presentaren una probabilitat significativament augmentada de presentar mort i/o nou SCA durant el seguiment ($p = 0,008$).

Es van seleccionar les variables que presentaren diferències significatives entre el grup de pacients amb LVEFp i LVEFr en l'anàlisi univariat (taules 1 i 2) per la construcció d'un model multivariat que permetés identificar factors predictius independents d'esdeveniments adversos durant el seguiment. En l'anàlisi de regressió logística, només les concentracions de BNP a l'ingrés van estar associades de forma independent amb l'aparició d'esdeveniments adversos. El valor independent de BNP com a factor predictiu d'esdeveniments adversos es va mantenir després de l'ajustament per edat, sexe, classe Killip, concentració plasmàtica de Tnl, concentració plasmàtica de glucosa a l'ingrés, funció renal i, també, per LVEF.

Taula 3. Esdeveniments adversos durant el seguiment.

	Tots els pacients n=1806	Pacients amb LVEF≥55% n=744	Pacients amb LVEF<55% n=954	p
<i>Endpoint</i> primari	164 (9.1)	59 (7.9)	95 (10.0)	0.052
Nova SCA	136 (7.5)	52 (7.0)	76 (8.0)	ns
Mortalitat	78 (4.3)	21 (2.8)	51 (5.3)	0.003
Seguiment (dies)	393.7 (210.4)	402.9 (213.7)	389.3 (209.1)	ns

LVEF: fracció d'ejecció ventricular esquerra. SCA: síndrome coronària aguda. ns: no significatiu. Els resultats d'*endpoint primari*, nou ACS i mortalitat es presenten com a nombre absolut de pacients (percentatge sobre el grup). Els resultats de seguiment es presenten com a mitjana (desviació estàndard)

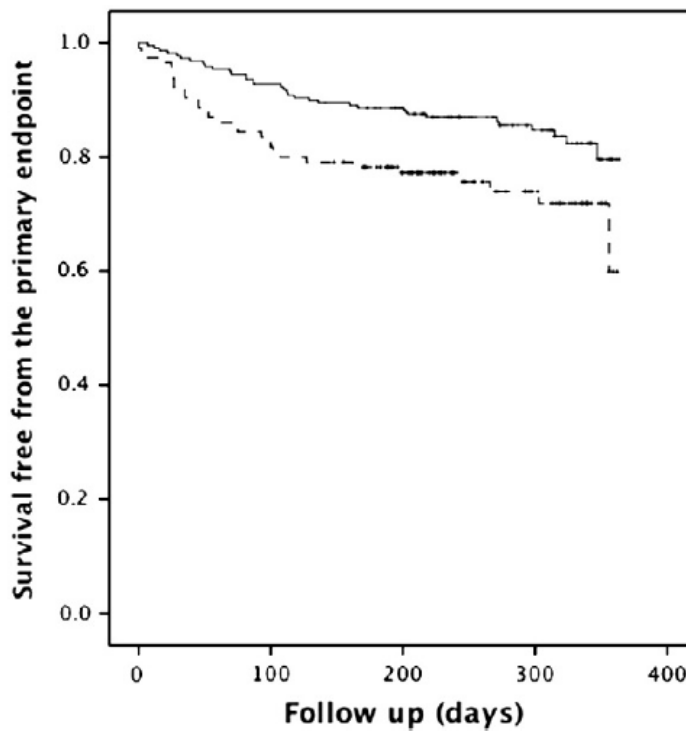


Figura 2. Supervivència lliure de l'*endpoint primari* en funció de les concentracions plasmàtiques de BNP en el moment de l'ingrés (≤ 150 pg/ml: línia contínua; > 150 pg/ml: línia discontinua).

DISCUSSIÓ

La isquèmia cardíaca té un paper principal en l'aparició del remodelat miocardiàc advers, base fisiopatològica de l'afectació morfològica i funcional cardíaca que afecta a gran part dels pacients amb cardiopatia isquèmica. Amb l'objectiu d'identificar els mecanismes moleculars que tradueixen la isquèmia miocardiàca en remodelat ventricular, s'ha investigat si la hipòxia i les citocines proinflamatòries són inductors específics de senyals de remodelat de matriu extracel·lular en cardiomiòcits ventriculars humans. La identificació dels factors específics implicats a nivell molecular és important en qualsevol aproximació terapèutica racional del remodelat cardíac induït per la isquèmia, ja que els canvis en la matriu extracel·lular cardíaca induïts per la isquèmia poden conduir a alteracions importants de la funció miocardiàca.

En aquest sentit, les modificacions en l'equilibri entre la deposició de matriu i la seva degradació constitueixen un factor principal en el remodelat advers que, en últim terme, condueix a fibrosi i dilatació cardíaca. En el primer estudi d'aquesta tesi s'observa que la disminució de la tensió d'oxigen provoca un augment de la secreció de PIIINP i una disminució de TIMP-1 en els cardiomiòcits ventriculars humans. Malgrat això, l'activitat de les MMP no es veu afectada significativament per la hipòxia, indicant que aquesta no tindria un paper principal en la degradació de matriu extracel·lular però sí en un augment de la síntesi de col·lagen III.

La disminució de la tensió d'oxigen en els cardiomiòcits ventriculars també va produir un augment la síntesi d'apelina, pèptid amb importants accions inhibidores de la fibrosi cardíaca i del remodelat ventricular (113,114,303,304). En models experimentals, s'ha observat que l'expressió gènica d'apelina augmenta en resposta a la isquèmia miocardiàca i es normalitza després de la reperfusió (138). Per tant, el resultat obtingut en cardiomiòcits ventriculars suggereix que la inducció miocardiàca de l'apelina per la isquèmia es relaciona amb una tensió reduïda d'oxigen en el miocardi isquèmic.

El VEGF és un dels factors cel·lulars protectors més importants induïts per la hipòxia. Té una gran rellevància en la morfogènesi i determinació de la funció cardíaca i,

semblantment a l'apelina, exerceix efectes cardioprotectors que inclouen la inhibició de la fibrosi (218,305). Els experiments realitzats en els cardiomiòcits incubats en condicions d'hipòxia mostren un augment de la síntesi i secreció de VEGF similar a la de l'apelina, suggerint que ambdós factors es troben regulats de forma similar per la hipòxia, constituint un mecanisme homeostàtic dirigit a contrarestar el dany isquèmic.

Donat que HIF-1 és el principal factor de transcripció que intervé en les respostes cel·lulars en condicions de disponibilitat reduïda d'oxigen, es va investigar si aquest factor regula els canvis observats en el remodelat de matriu extracel·lular i en els factors de creixement en resposta a la hipòxia en els cardiomiòcits. No va observar-se relació entre l'activació de HIF-1 i les senyals de recanvi de matriu extracel·lular. En canvi, sí va poder-se establir una intervenció directa de HIF-1 en la inducció d'apelina i VEGF en condicions hipòxiques. Així, els cardiomiòcits en hipòxia van presentar un augment de la síntesi i secreció d'apelina, fenomen que no es va observar quan els cardiomiòcits es van incubar amb rotenona, inhibidor de l'estabilització de HIF-1 α en hipòxia (306,307). A més, la síntesi d'apelina va augmentar quan els cardiomiòcits es van incubar amb CoCl₂, inductor químic de HIF-1 que evita la degradació de HIF-1 α i indueix la seva expressió (308). L'acció inhibidora de la rotenona i l'efecte estimulador del CoCl₂ sobre la producció de VEGF van ser semblants als observats sobre apelina, indicant que el mecanisme d'inducció per la hipòxia es relaciona directament amb l'estabilització de HIF-1 i confirmant l'existència d'un mecanisme de regulació transcripcional de la secreció d'ambdós factors en resposta a la disminució reduïda d'oxigen en els cardiomiòcits ventriculars humans. Aquests resultats concorden amb l'observació prèvia de llocs d'unió possibles de HIF-1 en la regió promotora del gen d'apelina (143) i la descripció d'un patró d'activació d'apelina i gens diana de HIF-1 coneguts com VEGF en cors de rata en situació d'isquèmia (129). Des d'un punt de vista funcional, les accions cardioprotectors d'apelina i VEGF estan en congruència amb l'activació a través de HIF-1 de gens generalment relacionats amb protecció

cel·lular. Per tant, l'activació d'apelina i VEGF en resposta a la hipòxia pot interpretar-se com un mecanisme protector endogen contra el dany isquèmic miocardiàc.

A més de per la hipòxia, el miocardi isquèmic es caracteritza per la presència d'una pronunciada resposta inflamatòria. Els pacients amb insuficiència cardíaca isquèmica presenten concentracions circulants i intracardíaques elevades de citocines proinflamatòries com TNF α o IL1 β (309). En els cardiomiòcits humans, la IL1 β (però no el TNF α) va produir un augment important de la secreció de PIIINP i TIMP-1, indicant que aquesta citocina proinflamatòria actua directament sobre el remodelat de la matriu extracel·lular. La zimografia va evidenciar que la IL1 β produeix un augment important de l'activitat de les MMP, demostrant un efecte funcional d'aquesta citocina sobre la degradació de la matriu extracel·lular. A més d'augmentar la producció de PIIINP i l'activitat de MMPs, la IL1 β va produir un augment important en la secreció d'HA, un altre constituent important de la matriu extracel·lular. En conjunt, els resultats indiquen que la IL1 β és un factor principal en la inducció de remodelat de matriu extracel·lular en el miocardi isquèmic.

L'estimulació dels cardiomiòcits amb TNF α va produir un increment de la secreció d'apelina, probablement en relació amb un augment precoç de la transcripció. TNF α es troba elevat en els pacients amb IAM i insuficiència cardíaca i està estretament relacionat amb la resposta inflamatòria present en la isquèmia cardíaca (124,125,310-314). En el teixit adipós, s'ha observat una relació entre l'expressió d'apelina i TNF α (123). També s'ha descrit que l'apelina redueix la formació d'aneurisma bloquejant els macròfags i la producció de citocines en aortes aneurismàtiques (121). En macròfags en cultiu, s'ha demostrat un efecte antiinflamatori directe d'apelina (incloent la disminució de l'expressió de TNF α) (121). Per tant, l'augment de la síntesi i secreció d'apelina provocada per TNF α en els cardiomiòcits pot representar una resposta antiinflamatòria compensadora en el miocardi isquèmic. En els cardiomiòcits ventriculars, l'estimulació amb TNF α va produir sobre la secreció de VEGF un efecte

semblant a l'observat sobre la secreció d'apelina. En canvi, la IL1 β va induir la secreció de VEGF però no va modificar la secreció d'apelina. La inducció de VEGF per la IL1 β ha estat observada prèviament en cardiomiòcits de rata (315,316) a través de l'activació de MAPK i s'ha proposat que aquest efecte pot ser beneficiós en el miocardi isquèmic contribuint a la formació de vasos col·laterals.

En global, els resultats de la primera part de la tesi contribueixen al coneixement del paper específic de la inflamació i la hipòxia sobre el remodelat cardíac del miocardi isquèmic. La hipòxia activa la producció de col·lagen III, mentre que la IL1 β activa la síntesi i recanvi de matriu extracel·lular en els cardiomiòcits ventriculars humans. La hipòxia, a través del factor de transcripció HIF-1, i TNF α activen la síntesi i secreció dels factors de creixement cardíacs antifibrogènics apelina i VEGF. En conjunt, els resultats suggereixen que la IL1 β contribueix a la dilatació ventricular i insuficiència cardíaca a través de la inducció del remodelat de matriu extracel·lular en el miocardi isquèmic. En canvi, HIF-1 α i TNF α exerceixen accions cardioprotectores a través de l'activació dels factors de creixement cardíacs apelina i VEGF.

En la segona part de la tesi va avaluar-se específicament si la hipòxia estimula directament la producció de BNP, pèptid amb accions cardioprotectores i antifibrogèniques. Els resultats mostren que, semblantment a l'apelina, la secreció de BNP en cardiomiòcits ventriculars humans augmenta en resposta a la tensió reduïda d'oxigen. Donat que l'elevació en la secreció de BNP ve precedida per un augment de l'expressió gènica, les alteracions induïdes per la hipòxia en l'activació de BNP tenen lloc a nivell transcripcional. L'observació que l'activació de HIF-1 ocorre abans que l'augment en l'expressió de BNP, conjuntament amb l'observació que l'activació de BNP per la hipòxia ve acompanyada per un comportament similar d'expressió gènica i secreció del VEGF, factor diana conegut de HIF-1, suggereix un paper d'aquest factor de transcripció en l'activació del BNP per la hipòxia. En global aquestes dades són consistents amb un paper significatiu de HIF-1 però no proporcionen evidència directa

de la seva implicació. Per aquest motiu, es va procedir a la inhibició de l'activació de HIF-1 en els cardiomiòcits incubats en hipòxia amb rotenona. Els resultats mostren que la inhibició del factor de transcripció HIF-1 inhibeix la secreció de BNP (i VEGF) induïda per la hipòxia, mostrant que un mecanisme de regulació transcripcional dependent de l'estabilització d'aquest factor és el responsable de l'augment de secreció de BNP en resposta a la disminució d'oxigen en cardiomiòcits ventriculars humans.

A més de l'efecte de la hipòxia sobre la secreció cardíaca de BNP, també es va avaluar la producció d'ANP i VEGF per validar la sensibilitat i especificitat cel·lular de la resposta a hipòxia. L'ANP és un pèptid natriurètic de síntesi principalment auricular. Contràriament que en el cas del BNP, la producció d'ANP pels cardiomiòcits ventriculars no es va veure incrementada per l'exposició a hipòxia. A pesar que ambdós pèptids natriurètics presenten mecanismes fisiològics reguladors semblants, els resultats mostren que aquest no és el cas pel que fa a la secreció induïda per hipòxia en cardiomiòcits ventriculars. Els resultats suggereixen que la disminució de la tensió d'oxigen és un estímul important per la producció d'ANP en cardiomiòcits auriculars (242) però no en cardiomiòcits ventriculars. En contraposició, la demostració que la hipòxia regula la producció de BNP en cardiomiòcits ventriculars, que constitueixen gran part del volum cardíac, suggereix que aquesta cèl·lula pot representar una font de producció important de BNP en condicions d'isquèmia miocardiàca. L'avaluació de la significació clínica d'aquest aspecte va desenvolupar-se en la part III d'aquesta tesi.

Els resultats obtinguts en la determinació de l'expressió de l'ARNm del BNP, VEGF i ANP en els cardiomiòcits ventriculars en condicions d'hipòxia, també recolzen l'existència d'un mecanisme de regulació mediat per la tensió d'oxigen en l'alliberació de BNP. Les cèl·lules cultivades amb una tensió d'oxigen disminuïda van presentar una major abundància d'ARNm del BNP i el VEGF en comparació amb les cèl·lules

cultivades en normòxia. Malgrat tot, s'observa una diferència en el patró d'expressió gènica induït per la hipòxia de VEGF i BNP. L'activació de VEGF és significativa a les 6 hores d'hipòxia, mentre que l'activació de BNP ho és a les 6 i 12 hores. Aquesta discrepància pot reflectir diferències en els mecanismes postraduccionals de processament d'ambdós pèptids o inclús l'existència de vies de regulació addicionals alternatives implicades en l'activació de BNP.

Consistent amb les accions de la majoria de gens regulats per HIF-1, l'augment de la producció de BNP en resposta a la hipòxia miocardiàca pot estar lligat a efectes beneficiosos endocrins i paracrins. El BNP és un important factor endogen natriurètic, diürètic i vasodilatador que antagonitza l'activitat vasoconstrictora del sistema renina-angiotensina-aldosterona i inhibeix el sistema nerviós simpàtic (317,318). A més d'aquests efectes endocrins, el BNP actua paracrinament proporcionant efectes cardioprotectors que inclouen la regulació del creixement dels cardiomiòcits i la inhibició de la proliferació dels fibroblasts cardíacs i del dipòsit de matriu extracel·lular (207,319). L'administració de BNP a cors perfosos de rata aïllats, abans i durant l'oclusió de l'artèria coronària principal esquerra, provoca una reducció de la mida de l'infart que és dependent de la concentració de BNP infosa i s'associa a un augment de la concentració de GMPc miocardiàc (320). El BNP participa en la vasodilatació de les artèries coronàries, suggerint un efecte regulador en el subministrament de sang al miocardi (321-323). En resum, la inducció de BNP observada pot constituir un mecanisme homeostàtic protector adreçat a preservar l'hemodinàmica cardiovascular i prevenir processos fibroproliferatius en el teixit cardíac en situació d'hipòxia.

L'ús de cardiomiòcits ventriculars humans en cultiu (cèl·lules AC16) ha permès identificar l'efecte específic de la hipòxia i la inflamació sobre el remodelat de matriu extracel·lular i la secreció de pèptids antifibrogènics en cardiomiòcits ventriculars i establir-ne el mecanisme. Les cèl·lules utilitzades han estat objecte d'una àmplia caracterització (59), els resultats de la qual mostren la presència de característiques

moleculars, genètiques, ultraestructurals i immunocitoquímiques de cardiomiòcits que les constitueixen en un model únic per avaluar l'efecte de factors específics relacionats amb la isquèmia cardíaca sobre els cardiomiòcits ventriculars. En el cas concret dels experiments realitzats en condicions d'hipòxia, per exemple, s'observa que la hipòxia activa HIF-1 en aquestes cèl·lules i que, al seu torn, HIF-1 regula la síntesi de VEGF. A més, no va observar-se l'activació del factor de transcripció HIF-1 ni l'augment de secreció de VEGF induïdes per la hipòxia quan les cèl·lules van incubar-se en presència d'un inhibidor de HIF-1. En conjunt, aquestes dades mostren la validesa del model cel·lular per a l'estudi de l'efecte de la hipòxia a nivell molecular en els cardiomiòcits ventriculars. Malgrat tot, el model *in vitro* utilitzat pot presentar també les seves limitacions. La introducció del gen SV40 permet que els cardiomiòcits primaris re-entrin el cicle cel·lular, proporcionant un model cel·lular que presenta la gran majoria de propietats característiques dels cardiomiòcits primaris humans, però que alhora impedeix l'expressió d'algunes característiques com la presència d'un aparell contràctil organitzat o la disminució en l'expressió d'alguns factors de transcripció (59). També és important recordar la major complexitat de l'organisme *in vivo* a l'hora d'explicar diferències entre alguns resultats *in vitro* i les observacions en pacients en un escenari clínic. Així, els resultats *in vitro* mostren que la hipòxia produeix un augment transitori de l'expressió gènica de BNP fins a les 12 hores, que no és significatiu a les 24 hores. Pel contrari, s'ha descrit que els pacients amb malaltia cardíaca isquèmica presenten concentracions plasmàtiques elevades de BNP, cosa que podria reflectir una activació de l'expressió gènica més sostinguda. En aquest sentit, més enllà de les característiques del model *in vitro*, s'ha de tenir en compte la presència *in vivo* d'altres inductors de la secreció de BNP com neurohormones, citocines i factors de creixement (324).

Amb independència dels efectes del BNP sobre el cor isquèmic, l'observació que la hipòxia estimula directament la síntesi i secreció de BNP pels cardiomiòcits ventriculars permet formular la hipòtesi que els pacients amb isquèmia cardíaca

presenten concentracions circulants de BNP elevades en relació al grau d'hipòxia cel·lular cardíaca. Diversos estudis clínics han mostrat l'existència d'una relació directa entre la gravetat de la insuficiència cardíaca i les concentracions plasmàtiques de BNP (244,250), conseqüència de l'estimulació de l'alliberació de BNP per l'estirament miocardiàc (199,325,326). Aquest fet està en la base del progressiu ús creixent de les determinacions de BNP com a marcador diagnòstic i pronòstic en la insuficiència cardíaca (246,301,326-329). Posteriorment a l'observació dels valors elevats de BNP en els pacients amb insuficiència cardíaca, es va descriure que també els pacients amb SCA presentaven un augment en les concentracions plasmàtiques de BNP (280,292,330). Donat que tant l'IAM clínic com experimental s'associen a importants alteracions en la càrrega i distensió ventricular, l'elevació de la concentració de BNP s'ha associat tradicionalment a un augment de la secreció miocardiàca provocada per aquestes alteracions hemodinàmiques. L'augment de BNP estaria, per tant, relacionat de forma secundària amb la isquèmia. En la part II d'aquesta tesi, però, es demostra que la reducció en la tensió d'oxigen estimula directament la síntesi i secreció de BNP pels cardiomiòcits ventriculars humans en absència d'estímuls hemodinàmics o neurohormonals, suggerint que la hipòxia miocardiàca contribueix directament a les concentracions plasmàtiques de BNP elevades en pacients amb isquèmia cardíaca. Així, les concentracions plasmàtiques de BNP podrien constituir un indicador d'isquèmia miocardiàca en pacients sense estirament ventricular i aportar informació clínica rellevant. Això ens va moure a avaluar el valor clínic d'aquest marcador en pacients amb isquèmia cardíaca, amb l'anàlisi específic de les diferències entre els pacients amb LVEFp i LVEFr. Donat l'important grau d'estirament miocardiàc associat a una LVEFr, es van separar els pacients amb LVEFr i LVEFp amb l'objectiu de facilitar l'avaluació del comportament de les concentracions plasmàtiques de BNP com a indicadores d'isquèmia cardíaca. La majoria d'estudis que avaluen el paper de les concentracions plasmàtiques de BNP com a indicador d'isquèmia cardíaca no valoren específicament les diferències entre aquest dos grups. El punt de tall usat per definir

LVEFp va ser una LVEF \geq 55%, superior a l'habitualment usat en la majoria d'estudis (LVEF \geq 50%), amb l'objectiu de minimitzar encara més l'efecte de l'estirament miocardiàc sobre les concentracions plasmàtiques de BNP en aquest grup de pacients.

En la població estudiada, els pacients amb SCA sense insuficiència cardíaca i LVEFp van presentar concentracions plasmàtiques de BNP augmentades. Aquests resultats estan en concordança amb l'observació *in vitro* de la major producció de BNP en cardiomiòcits sotmesos a hipòxia, suggerint que la producció cardíaca de BNP en els pacients amb SCA i LVEFp es relaciona directament amb la isquèmia miocardiàca. En conjunt, els resultats indiquen que l'augment de síntesi i secreció de BNP pels cardiomiòcits en situació d'hipòxia condueix a un increment de la concentració plasmàtica de BNP en els pacients amb isquèmica cardíaca.

La concentració plasmàtica de BNP en la població estudiada va constituir un factor predictiu independent de la presentació d'esdeveniments adversos (mortalitat i/o nou SCA) a l'any de l'episodi de SCA, també després d'ajustar per la LVEF. Aquest fet suggereix que les concentracions plasmàtiques de BNP elevades indiquen major gravetat en relació al grau d'isquèmia miocardiàca en els pacients amb SCA i LVEFp. Les concentracions plasmàtiques de BNP s'han mostrat com un factor de risc pronòstic i predictiu en diverses situacions clíniques, especialment en la insuficiència cardíaca i els SCA. Els resultats de la part III de la tesi mostren que el valor predictiu de la concentració plasmàtica de BNP es manté també en els pacients amb SCA que presenten una fracció d'ejecció conservada. S'identifica el valor de BNP $>$ 150 pg/ml com a punt de tall òptim per la predicció de major probabilitat de presentar esdeveniments adversos. Aquesta dada pot ser útil en l'avaluació de la SCA en la pràctica clínica per a una ràpida identificació dels pacients amb major risc.

CONCLUSIONS

- La citocina proinflamatòria IL1 β estimula la síntesi i secreció de PIIINP, TIMP-1 i HA i augmenta l'activitat de MMP2 en cardiomiòcits ventriculars humans, constituint un inductor específic del procés de remodelat en el miocardi isquèmic.
- La disminució de la tensió d'oxigen provoca l'activació del factor de transcripció induïble per hipòxia (HIF-1) en cardiomiòcits ventriculars humans.
- La disminució de la tensió d'oxigen, a través del factor de transcripció HIF-1, i TNF α estimulen la síntesi i secreció dels factors de creixement cardíacs antifibrogènics apelina i VEGF en cardiomiòcits ventriculars humans.
- La disminució de la tensió d'oxigen no té efecte sobre la síntesi i secreció d'ANP en cardiomiòcits ventriculars humans.
- La disminució de la tensió d'oxigen estimula la síntesi i secreció de BNP en cardiomiòcits ventriculars humans a través d'un mecanisme depenent del factor de transcripció HIF-1.
- Els pacients amb síndrome coronària aguda (SCA) i fracció d'ejecció preservada presenten concentracions plasmàtiques de BNP elevades.
- Els pacients amb fracció d'ejecció preservada i una concentració plasmàtica de BNP superior a 150 pg/ml dins les primeres 48 hores posteriors a un episodi de SCA presenten major risc de mortalitat i/o de presentar nous episodis de SCA.

BIBLIOGRAFIA

1. Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th Edition. The McGraw-Hill Companies. <http://www.accessmedicine.com/resourceToc.aspx?resourceID=4>
2. Granger CB, Goldberg RJ, Dabbous O, Pieper KS, Eagle KA, Cannon CP, et al. Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch Intern Med* 2003;163:2345-53
3. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010; 121:948-54
4. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* 2002; 88:119-24
5. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, et al. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med* 2007; 356:2388-98
6. Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; 117:e25-e146
7. Summary estimates of mortality for WHO Member States for the year 2008. http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/global_burden_disease_death_estimates_sex_2008.xls
8. Ergin A, Muntner P, Sherwin R, He J. Secular trends in cardiovascular disease mortality, incidence, and case fatality rates in adults in the United States. *Am J Med* 2004; 117:219-27
9. Arciero TJ, Jacobsen SJ, Reeder GS, et al. Temporal trends in the incidence of coronary disease. *Am J Med* 2004; 117:228-33
10. Gordon T, Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM. Menopause and coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1978; 89:157-161
11. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986;111:383-90
12. Kannel WB. Prevalence and clinical aspects of unrecognized myocardial infarction and sudden unexpected death. *Circulation* 1987;75:114-5
13. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2525-38
14. Eagle KA, Lim MJ, Dabbous OH, Pieper KS, Goldberg RJ, Van de Werf F, et al. A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month postdischarge death in an international registry. *JAMA* 2004;291:2727-33.
15. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Acute coronary syndromes. February 2007. Guideline 93. <http://www.sign.ac.uk/guidelines/fulltext/93/>
16. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de SG, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, cDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123:e18-e209
17. Dargie H. Heart failure post-myocardial infarction: a review of the issues. *Heart* 2005;91 Suppl 2:ii3-6; discussion ii31, ii43-8

18. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* 1982;65:1446-50
19. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Bulkley BH. Global cardiac remodeling after acute myocardial infarction: a study in the rat model. *J Am Coll Cardiol* 1985;5:1355-62
20. Korup E, Dalsgaard D, Nyvad O, et al. Comparison of degrees of left ventricular dilation within three hours and up to six days after onset of first acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997;80:449-53
21. Giannuzzi P, Temporelli PL, Bosimini E, et al. Heterogeneity of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico-3 Echo Substudy. *Am Heart J* 2001;141:131-8
22. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, et al. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986;74:693-702.
23. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993;87:755-63
24. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82
25. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-72.
26. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 2006;367:356-67
27. Gabrielsen A, Lawler PR, Yongzhong W, Steinbrüchel D, Blagoja D, Paulsson-Berne G, Kastrup J, Hansson GK. Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:870-83
28. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007;87:1285-342
29. Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y, Yoshimi T, Takashi M. Hypoxic Induction of Prolyl 4-Hydroxylase α (I) in Cultured Cells. *J Biol Chem* 2000;275:14139-46
30. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007;117:3810-20
31. Chen H, Li D, Roberts GJ, Saldeen T, Mehta JL. Eicosapentanoic acid inhibits hypoxia-reoxygenation-induced injury by attenuating upregulation of MMP-1 in adult rat myocytes. *Cardiovasc Res* 2003;59:7-13
32. Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res* 2002;90:784-91
33. Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:537-544
34. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 1997;81:627-35

35. Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor- α . *Circulation* 1998;97:1375–81
36. Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2001;104:826–31
37. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1201-6
38. Muller AL, Dhalla NS. Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 2012;17:395-409
39. Siwik DA, Colucci WS. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev* 2004;9:43-51
40. Hu CP, Dandapat A, Liu Y, Hermonat PL, Mehta JL. Blockade of hypoxia-reoxygenation-mediated collagen type I expression and MMP activity by overexpression of TGF- β 1 delivered by AAV in mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1833 - H1838
41. Madani S, De Girolamo S, Munoz DM, Li RK, Sweeney G. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2005;69:716–25
42. Parkes JG, Liu Y, Sirna JB, Templeton DM. Changes in gene expression with iron loading and chelation in cardiac myocytes and non-myocytic fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32: 233-46
43. Vanhoutte, M. Schellings, Y. Pinto, S. Heymans. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. *Cardiovasc Res* 2006;69:604-13
44. A.M. Romanic, C.L. Burns-Kurtis, B. Gout, I. Berrebi-Bertrand and E.H. Ohlstein, Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit, *Life Sci* 2001;68:799–814
45. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin. Invest* 1996;98:2512–23
46. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann. Thorac Surg* 1995;60:12-8
47. Champion DR. The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* 1984;87:225–51
48. Claycomb C, Palazzo MC. Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell: a light and scanning electron microscope study. *Dev Biol* 1980;80:466–82
49. Marvin Jr WJ, Robinson RB, Hermsmeyer K. Correlation of function and morphology of neonatal rat and embryonic chick cultured cardiac and vascular muscle cells. *Circ Res* 1979;45:528-40
50. Steinhilber ME, Lanson Jr NA, Dresdner KP, Delcarpio JB, Wit AL, Claycomb WC et al., Proliferation in vivo and in culture of differentiated adult atrial cardiomyocytes from transgenic mice. *Am J Physiol* 1990;259:H1826–H1834
51. Jaffredo T, Chestier A, Bachnou N, Dieterlen-Lievre F. MC29-immortalized clonal avian heart cell lines can partially differentiate in vitro. *Exp Cell Res* 1991;192 :481-91

52. Katz EB, Steinhilber ME, Delcarpio JB, Daud AI, Claycomb WC, Field LJ. Cardiomyocyte proliferation in mice expressing alpha-cardiac myosin heavy chain-SV40 T-antigen transgenes. *Am J Physiol* 1992;262:H1867–H1876
53. Negishi Y, Kudo A, Obinata A, Kawashima K, Hirano H, Yanai N, et al. Multipotency of a bone marrow stromal cell line, TBR31-2, established from ts-SV40 T antigen gene transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:450–5
54. Brunskill EW, Witte DP, Yutzey KE, Potter SS. Novel cell lines promote the discovery of genes involved in early heart development. *Dev Biol* 2001;235:507–20
55. Wang YC, Neckelmann N, Mayne A, Herskowitz A, Srinivasan A, Sell KW et al. Establishment of a human fetal cardiac myocyte cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991;27:63-74
56. Li R, Mickle D, Weisel R, Carson S, Omar S, Tumiah LC, et al. Human pediatric and adult ventricular cardiomyocytes in culture: assessment of phenotypic changes with passaging. *Cardiovasc Res* 1996;32:362–73
57. Goldman BI, Wurzel J. Human fetal cardiocytes in enriched culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995;31:731-4
58. Claycomb W, Lanson N, Stallworth B, Egeland D, Delcaprio J, Bahinski A, et al. HL1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2979–84
59. Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, Protas L, Hirano M, Isaac ND. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:133-7
60. Semenza GL. Life with oxygen. *Science* 2007;318:62-4
61. Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008;30:393-402
62. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JGN, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105:659–69
63. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: Oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:176-82
64. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5510-4
65. Kaelin WG. Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol* 2007;2:45-73
66. Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, and Conaway JW. Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10430-5
67. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006;70:1469-80
68. Coleman ML, Ratcliffe PJ. Signalling cross talk of the HIF system: involvement of the FIH protein. *Curr Pharm Des* 2009;15:3904-7
69. D. Peet, S. Linke, Regulation of HIF: Asparaginyl hydroxylation. *Novartis Found. Symp* 2006;272:37-49
70. Semenza GL. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010;2:336-61

71. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002;16:1466-71
72. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 2003;116:1319-26
73. Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, Leshchinsky I, Srinivas V, Caro J. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* 2003;278:14013-9
74. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5680-4.
75. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997;272:20055-62
76. Bianchi L, Tacchini L, Cairo G. HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4223-7
77. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* 2000;275:21048-54
78. Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* 2000;6:1047-1052
79. Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 1995;182:1683-93
80. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 1997;272:5375-81
81. Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;245:894-9
82. Nguyen SV, Claycomb WC. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:382-6
83. Eckhart AD, Yang N, Xin X, Faber JE. Characterization of the alpha1B adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9487-92
84. Kietzmann T, Roth U, Jungermann K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 1999;94:4177-85
85. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:3436-44
86. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002;16:1151-62
87. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001;276:9519-25
88. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 2002;277:23111-5

89. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999;59:3915-8
90. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32
91. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature (Lond)* 1998;394:485-90
92. Brunelle JK, Chandel NS. Oxygen deprivation induced cell death: an update. *Apoptosis* 2002;7:475-82
93. McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, Thompson CB, Hay N, Chandel NS. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Mol Cell Biol* 2002;22:94-104
94. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1527-33
95. Schuler M and Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2001;29:684-8
96. Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2002;2:331-41
97. Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR. Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:821-6
98. Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 α -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2170-4
99. Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:297-310
100. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal* 2005;17:415-26
101. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernandez-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, Jimenez W. The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology*. 2008;48:1193-201
102. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 2000;74:34-41
103. Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept* 2004;118:119-25
104. Szokodi I, Tavi P, Földes G, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002;91:434-40
105. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, et al. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 2004;110(11 Suppl. 1):II187-93
106. Ashley EA, Powers J, Chen M, et al. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 2005;65:73-82
107. Japp AG, Newby DE. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:1882-92

108. Japp AG, Cruden NL, Barnes G, van Gemeren N, Mathews J, Adamson J, et al. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2010;121:1818-27
109. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2011;99:87–92
110. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10464-9
111. Japp AG, Cruden NL, Amer DAB, et al. Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:908–13
112. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, et al. Regulatory roles for APJ, a seven transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:26274–9
113. Siddiquee K, Hampton J, Khan S, Zadory D, Gleaves L, Vaughan DE, Smith LH. Apelin protects against angiotensin II-induced cardiovascular fibrosis and decreases plasminogen activator inhibitor type-1 production. *J Hypertens* 2011;29:724-31
114. Pchejetski D, Foussal C, Alfarano C, Lairez O, Calise D, Guilbeau-Frugier C, Schaak S, Seguelas MH, Wanecq E, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J* 2012;33:2360-9.
115. Gao LR, Zhang NK, Bai J, et al. The apelin–APJ pathway exists in cardiomyogenic cells derived from mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Cell Transplant* 2010;19:949–58
116. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:471–6
117. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:162-71
118. Chen MM, Ashley EA, Deng DX, et al. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 2003;108:1432-9
119. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006;8:355-60
120. Francia P, Salvati A, Balla C, De Paolis P, Pagannone E, Borro M, et al. Cardiac resynchronization therapy increases plasma levels of the endogenous inotrope apelin. *Eur J Heart Fail* 2007;9:306-9
121. Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashley EA, et al. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H1329-35
122. Han S, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley GH, Jr. Involvement of a Stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G1068-78
123. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, et al. TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J*. 2006;20:1528-30
124. Pasqui AL, Di Renzo M, Auteri A, Puccetti L. Cytokines in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2005;105:355-6

125. Rakhit RD, Seiler C, Wustmann K, Zbinden S, Windecker S, Meier B, et al. Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 release during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction is related to coronary collateral flow. *Coron Artery Dis* 2005;16:147-52
126. Iwanaga Y, Kihara Y, Takenaka H, Kita T. Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin II-angiotensin type 1 receptor system. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:798-806
127. Barnes G, Japp AG, Newby DE. Translational promise of the apelin--APJ system. *Heart* 2010;96:1011-6
128. Atluri P, Morine KJ, Liao GP, Panlilio CM, Berry MF, Hsu VM, et al. Ischemic heart failure enhances endogenous myocardial apelin and APJ receptor expression. *Cell Mol Biol Lett* 2007;12:127-38
129. Sheikh AY, Chun HJ, Glassford AJ, Kundu RK, Kutschka I, Ardigo D, et al. In vivo genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H88-98
130. Foldes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, et al. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:480-5
131. Jia YX, Pan CS, Zhang J, et al. Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Regul Pept* 2006;133:147-54
132. Pitkin SL, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man. *Br J Pharmacol.* 2010;160:1785-95
133. Goetze JP, Rehfeld JF, Carlsen J, et al. Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease. *Regul Pept* 2006;133:13-8
134. Miettinen KH, Magga J, Vuolteenaho O, et al. Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy. *Regul Pept* 2007;140:178-84
135. Weir RA, Chong KS, Dalzell JR, et al. Plasma apelin concentration is depressed following acute myocardial infarction in man. *Eur J Heart Fail* 2009;11:551-8
136. Kadoglou NP, Lampropoulos S, Kapelouzou A, et al. Serum levels of apelin and ghrelin in patients with acute coronary syndromes and established coronary artery disease – KOZANI STUDY. *Transl Res* 2010;155:238-46
137. Simpkin JC, Yellon DM, Davidson SM, Lim SY, Wynne AM, Smith CC. Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2007;102:518-28
138. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448-60
139. Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, et al. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res* 2008;103:432-40
140. Han S, Wang G, Qi X, Lee HM, Englander EW, Greeley GH, Jr. A possible role for hypoxia-induced apelin expression in enteric cell proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:R1832-9

141. Glassford AJ, Yue P, Sheikh AY, Chun HJ, Zarafshar S, Chan DA, et al. HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E1590-6
142. Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hanninen SL, Leskinen H, Ruas JL, Pereira T, et al. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J* 2007;21:1821-30
143. Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 2006;296:177-89
144. Zeng XJ, Zhang LK, Wang HX, Lu LQ, Ma LQ, Tang CS. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides* 2009;30:1144-52
145. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res* 1956;4:85-90
146. Kisch B. Electronmicroscopy of the atrium of the heart. *Exp Med Surg* 1956;14:99-112
147. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981;28:89-94
148. Jiménez W, Martínez-Pardo A, Arroyo V, Gaya J, Rivera F, Rodés J. Atrial natriuretic factor: reduced cardiac content in cirrhotic rats with ascites. *Am J Physiol* 1986;250:F749-52
149. Flynn, M.L. de Bold and A.J. de Bold, The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties, *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:859-65
150. Sudoh, K. Kangawa, N. Minamino and H. Matsuo, A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332:78-81
151. Minamino, M. Aburaya, S. Ueda, K. Kangawa and H. Matsuo. The presence of brain natriuretic peptide of 12,000 Daltons in porcine heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;155:740-6
152. Aburaya M, Minamino N, Hino J, Kangawa K, Matsuo H. Distribution and molecular forms of brain natriuretic peptide in the central nervous system, heart and peripheral tissue of rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:880-7
153. Hosoda K, Nakao K, Mukoyama M, et al. Expression of brain natriuretic peptide gene in human heart. Production in the ventricle. *Hypertension* 1991;17:1152-5
154. Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 1986;324:473-6
155. Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 1987;326:697-8
156. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:863-70
157. Vollmar AM, Gerbes AL, Nemer M, Schulz R. Detection of C-type natriuretic peptide (CNP) transcript in the rat heart and immune organs. *Endocrinology* 1993;132:1872-4
158. Scotland S, Ahluwalia A, Hobbs AJ. C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease, *Pharmacol Ther* 2005;105:85-93
159. Horio T, Tokudome T, Maki T, et al. Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology* 2003;144:2279-84

160. Kalra PR, Clague JR, Bolger AP, Anker SD, Poole-Wilson PA, Struthers AD, Coats AJ. Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure. *Circulation* 2003;107:571-3
161. Oikawa S, Imai M, Ueno A et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature* 1984;309:724-6
162. Porter JG, Arfsten A, Palisi T, Scarborough RM, Lewicki JA, Seilhamer JJ. Cloning of a cDNA encoding porcine brain natriuretic peptide. *J Biol Chem* 1989;264:6689-92
163. Misono KS, Grammer RT, Fukumi H, Inagami T. Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:444-51
164. Singh S, Lowe DG, Thorpe DS, et al. Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases. *Nature* 1988;334:708-12
165. Gerzer R, Witzgall H, Tremblay J, Gutkowska J, Hamet P. Rapid increase in plasma and urinary cyclic GMP after bolus injection of atrial natriuretic factor in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:1217-9
166. Tremblay J, Gerzer R, Vinay P, Pang SC, Beliveau R, Hamet P. The increase of cGMP by atrial natriuretic factor correlates with the distribution of particulate guanylate cyclase. *FEBS Lett* 1985;181:17-22
167. Drewett JG, Garbers DL. The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr Rev* 1994;15:135-62
168. Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, et al. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 1995;378:65-8
169. Oliver PM, Fox JE, Kim R, et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14730-5
170. Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Rehemudula D, Kanmatsuse K, Furuya K. Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. *Circ Res* 2000;86:841-5
171. Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV. Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 1989;341:68-72
172. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 1991;252:120-3
173. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, et al. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem* 1988;263:9395-9401
174. Maack T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol* 1992;54:11-27
175. Cohen D, Koh GY, Nikonova LN, Porter JG, Maack T. Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides. *J Biol Chem* 1996;271:9863-69
176. Seidman CE, Bloch KD, Zisfein J, et al. Molecular studies of the atrial natriuretic factor gene. *Hypertension* 1985;7:131-134
177. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I. Natriuretic peptides. *J Hypertens* 1992;10:907-12

178. Nemer M, Lavigne JP, Drouin J, Thibault G, Gannon M, Antakly T. Expression of atrial natriuretic factor gene in heart ventricular tissue. *Peptides* 1986;7:1147-52
179. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* 2011;57:131-40
180. Flynn TG, Davies PL, Kennedy BP, de Bold ML, de Bold AJ. Alignment of rat cardionatrin sequences with the preprocardionatrin sequence from complementary DNA. *Science* 1985;228:323-5
181. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8525-9
182. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, et al. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 1988;62:191-5
183. Yasue H, Obata K, Okumura K, et al. Increased secretion of atrial natriuretic polypeptide from the left ventricle in patients with dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1989;83:46-51
184. Saito Y, Nakao K, Arai H, et al. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest* 1989;83:298-305
185. Sudoh T, Maekawa K, Kojima M, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1427-34
186. Sawada Y, Suda M, Yokoyama H, et al. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J Biol Chem* 1997;272:20545-54
187. Seilhamer JJ, Arfsten A, Miller JA, Lundquist P, Scarborough RM, Lewicki JA, Porter JG. Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:650-8
188. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Brain natriuretic peptide-32: N-terminal six amino acid extended form of brain natriuretic peptide identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:726-32
189. Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, Suga S, Yoshimasa T, Uehira M, Matsuda S, Shiono S, Nishimoto H, Nakao K. Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest* 1994;93:1911-21
190. Kojima M, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for rat brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1420-26
191. Grepin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T, Nemer M. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14:3115-29
192. Thuerlauf DJ, Hanford DS, Glembotski CC. Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem* 1994;269:17772-5
193. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991;87:1402-12

194. Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, et al. Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats. The ventricle is a major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. *Circ Res* 1991;69:491–500
195. Yasue H, Yoshiura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994;90:195-203
196. Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, et al. Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med* 1990;323:757-8.
197. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, et al. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1993;87:464-9
198. Magga J, Marttila M, Mantymaa P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Brain natriuretic peptide in plasma, atria, and ventricles of vasopressin- and phenylephrine-infused conscious rats. *Endocrinology* 1994;134:2505 -15
199. Kinnunen P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Mechanism of the atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. *Endocrinology* 1993;132:1691-70
200. Mantymaa P, Vuolteenaho O, Marttila M, Ruskoaho H. Atrial stretch induces rapid increase in brain natriuretic peptide but not in atrial natriuretic peptide gene expression in vitro. *Endocrinology* 1993;133:1470-3
201. Qi W, Kjekshus J, Hall C. Differential responses of plasma atrial and brain natriuretic peptides to acute alteration in atrial pressure in pigs. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:55-63
202. Hystad ME, Geiran OR, Attramadal H, Spurkland A, Vege A, Simonsen S, et al. Regional cardiac expression and concentration of natriuretic peptides in patients with severe chronic heart failure. *Acta Physiol Scand* 2001;171:395-403
203. Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, et al. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol* 1998;274:H1684-1689
204. Qi W, Kjekshus J, Hall C. Differential responses of plasma atrial and brain natriuretic peptides to acute alteration in atrial pressure in pigs. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:55 –63.
205. LaPointe MC. Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides* 2005;26:944-56
206. Ma KK, Banas K, de Bold AJ. Determinants of inducible brain natriuretic peptide promoter activity. *Regul Pept* 2005;128:169-76
207. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006;27:47-72
208. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2006;69:318-28
209. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4239-44
210. Cao L, Gardner D. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 1995; 25:227-234
211. Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC Jr. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res* 2002;91:1127-34

212. Caretti A, Morel S, Milano G, Fantacci M, Bianciardi P, Ronchi R, Vassalli G, von Segesser LK, Samaja M. Heart HIF-1alpha and MAP kinases during hypoxia: are they associated *in vivo*? *Exp Biol Med* (Maywood) 2007;232:887-94
213. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkentin JD, Zou Y, Komuro I. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 2007;446:444-8
214. Kamat CD, Thorpe JE, Shenoy SS, Ceriello A, Green DE, Warnke LA, Ihnat MA. A long-term "memory" of HIF induction in response to chronic mild decreased oxygen after oxygen normalization. *BMC Cardiovasc Disord* 2007;7-4
215. Zampino M, Yuzhakova M, Hansen J, *et al.* Sex-related dimorphic response of HIF-1 alpha expression in myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H957-64
216. Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase *via* hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res* 2000;86:319-25
217. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006;281: 9030-7
218. Dai Y, Xu M, Wang Y, Pasha Z, Li T, Ashraf M. HIF-1alpha induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42:1036-44
219. Jürgensen JS, Rosenberger C, Wiesener MS, Warnecke C, Hörstrup JH, Gräfe M, Philipp S, Griethe W, Maxwell PH, Frei U, Bachmann S, Willenbrock R, Eckardt KU. Persistent induction of HIF-1 α and -2 α in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *FASEB J* 2004;18:1415-17
220. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000;342:626-33
- 221 Resar JR, Roguin A, Voner J, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α polymorphism and coronary collaterals in patients with ischemic heart disease. *Chest* 2005;128:787-91
222. Hlatky MA, Quertermous T, Boothroyd DB, *et al.* Polymorphisms in hypoxia inducible factor 1 and the initial clinical presentation of coronary disease. *Am Heart J* 2007;154:1035-42
223. Shohet RV, Garcia JA. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med* 2007;85:1309-15
224. Qutub AA, Popel AS. Three autocrine feedback loops determine HIF1alpha expression in chronic hypoxia. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1511-25.
- 225..Kido M, Du L, Sullivan CC, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:2116-24
226. Eckle T, Kehler D, Lehmann R, El Kasmi K, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* 2008;118:166-75
227. Hyvarinen J, Hassinen IE, Sormunen R, *et al.* Hearts of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 hypomorphic mice show protection against acute ischemia-reperfusion injury. *J Biol Chem* 2010;285:13646-57
- 228.H. Ischer M, Silter M, Krull S, *et al.* Cardiomyocyte-specific prolyl-4-hydroxylase domain 2 knock out protects from acute myocardial ischemic injury. *J Biol Chem* 2011;286:11185-94

229. Luo Y, Jiang C, Belanger AJ, Akita GY, Wadsworth SC, Gregory RJ, Vincent KA. A constitutively active hypoxia-inducible factor-1 α /VP16 hybrid factor activates expression of the human B-type natriuretic peptide gene. *Mol Pharmacol* 2006;69:1953-62
230. Goetze JP, Gore A, Moller CH, Steinbruchel DA, Rehfeld JF, Nielsen LB. Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. *FASEB J* 2004;18:1928-30
231. Perhonen M, Takala TE, Vuolteenaho O, Mañntymaa P, Leppäluoto J, Ruskoaho H. Induction of cardiac natriuretic peptide gene expression in rats trained in hypobaric hypoxic conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1997;273:R344–R352.
232. Toth M, Vuorinen KH, Vuolteenaho O, Hassinen IE, Uusimaa PA, Leppäluoto J, Ruskoaho H. Hypoxia stimulates release of ANP and BNP from perfused rat ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994;266:H1572-H1580
233. Hama N, Itoh H, Shirakami G, Nakagawa O, Suga S, Ogawa Y, Masuda I, Nakanishi K, Yoshimasa T, Hashimoto Y, et al. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 1995;92:1558-64
234. He Q, Wang D, Yang XP, Carretero OA, LaPointe MC. Inducible regulation of human brain natriuretic peptide promoter in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H368–H376
235. Baertschi AJ, Hausmaninger C, Walsh RS, Mentzer RM, Wyatt DA, Pence RA. Hypoxia-induced release of atrial natriuretic factor (ANF) from the isolated rat and rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;140:427-33
236. Baertschi AJ, Adams JM, Sullivan MP. Acute hypoxemia stimulates atrial natriuretic factor secretion in vivo. *Am J Physiol* 1988;255:H295–300
237. Lew RA, Baertschi AJ. Mechanisms of hypoxia-induced atrial natriuretic factor release from rat hearts. *Am J Physiol* 1988;257:H147–56
238. Chen YF, Durand J, Claycomb WC. Hypoxia stimulates atrial natriuretic peptide gene expression in cultured AT-1 cardiac myocytes. *Hypertension* 1997;29:75-82
239. Klinger JR, Pietras L, Warburton R, Hill NS. Reduced oxygen tension increases atrial natriuretic peptide release from atrial cardiocytes. *Exp Biol Med* 2001;226:847-53
240. Block KD, Seidman JG, Naftilan JD, Fallon JT, Seidman CE. Neonatal atria and ventricles secrete atrial natriuretic factor via tissue-specific pathways. *Cell* 1986;47:695-702
241. De Young MB, Keller KC, Graham RM, Wildey GM. Brefeldin A defines distinct pathways for atrial natriuretic factor secretion in neonatal rat atrial and ventricular myocytes. *Circ Res* 1994;74:33-40
242. Chen YF. Atrial natriuretic peptide in hypoxia *Peptides* 2005;26:1068-77
243. Maisel A. B-type natriuretic peptide levels: diagnostic and prognostic in congestive heart failure: what's next? *Circulation* 2002;105:2328-31
244. de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003;362:316-22
245. McCullough PA, Nowak RM, McCord J, et al. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation* 2002;106:416-22
246. McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, et al. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet* 1998;351:9-13
247. Cowie MR, Struthers AD, Wood DA, et al. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet* 1997;350:1349-53

248. Knudsen CW, Omland T, Clopton P, et al. Diagnostic value of B-Type natriuretic peptide and chest radiographic findings in patients with acute dyspnea. *Am J Med* 2004;116:363-8
249. Rodeheffer RJ. Measuring plasma B-type natriuretic peptide in heart failure: good to go in 2004? *J Am Coll Cardiol* 2004;44:740-9
250. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:161-7
251. Maisel AS, Koon J, Krishnaswamy P, et al. Utility of B-natriuretic peptide as a rapid, point-of-care test for screening patients undergoing echocardiography to determine left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 2001;141:367-74
252. Krishnaswamy P, Lubien E, Clopton P, et al. Utility of B-natriuretic peptide levels in identifying patients with left ventricular systolic or diastolic dysfunction. *Am J Med* 2001;111:274-9
253. Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, et al. Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002;105:595-601
254. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000;355:1126-30
255. Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, Aupetit JF, Aumont MC, Galinier M, Eicher JC, Cohen-Solal A, Juillière Y. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1733-9
256. Pfisterer M, Buser P, Rickli H, Gutmann M, Erne P, Rickenbacher P, Vuillomenet A, Jeker U, Dubach P, Beer H, Yoon SI, Suter T, Osterhues HH, Schieber MM, Hilti P, Schindler R, Brunner-La Rocca HP; TIME-CHF Investigators. BNP guided vs symptomguided heart failure therapy: the Trial of Intensified vs Standard Medical Therapy in Elderly Patients With Congestive Heart Failure (TIME-CHF) randomized trial. *JAMA* 2009;301:383-92
257. O'Donoghue M, Braunwald E. Natriuretic peptides in heart failure: should therapy be guided by BNP levels? *Nat Rev Cardiol* 2010;7:13-20
258. Jessup M, Abraham WT, Casey DE, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Konstam MA, Mancini DM, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 2009;119:1977-2016
259. Heart Failure Society of America. Executive summary: HFSA 2010 comprehensive heart failure practice guideline. *J Cardiac Failure* 2010;16:475-539
260. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail* 2008;10:933-89
261. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, et al. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2003;107:1278-83

262. de Groote P, Dagorn J, Soudan B, et al. B-type natriuretic peptide and peak exercise oxygen consumption provide independent information for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1584-9
263. Koglin J, Pehlivanli S, Schwaiblmair M, et al. Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1934-41
264. Berger R, Huelsman M, Strecker K, et al. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2002;105:2392-7
265. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, et al. High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1587-93
266. Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, et al. Neurohumoral prediction of benefit from carvedilol in ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *Circulation* 1999;99:786-92
267. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1997;96:509-16
268. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Plasma brain natriuretic peptide level as a biochemical marker of morbidity and mortality in patients with asymptomatic or minimally symptomatic left ventricular dysfunction. Comparison with plasma angiotensin II and endothelin-1. *Eur Heart J* 1999;20:1799-807
269. Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, Glasziou P. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *BMJ* 2005;330:625
270. Logeart D, Thabut G, Jourdain P, et al. Predischarge B-type natriuretic peptide assay for identifying patients at high risk of re-admission after decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:635-41
271. Fonarow GC, Peacock WF, Phillips CO, Givertz MM, Lopatin M; ADHERE Scientific Advisory Committee and Investigators. Admission B-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1943-50
272. Tang WH, Francis GS, Morrow DA, Newby LK, Cannon CP, Jesse RL, Storrow AB, Christenson RH, Apple FS, Ravkilde J, Wu AH; National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine practice guidelines: Clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Circulation* 2007;116:e99-e109
273. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension* 2000;36:355-59
274. Kroll MH, Twomey PJ, Srisawasdi P. Using the single-compartment ratio model to calculate half-life, NT-proBNP as an example. *Clin Chim Acta* 2007;380:197-202
275. D'Souza SP, Yellon DM, Martin C, et al B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via KATP channel opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1592-H1600.
276. Goetze J P, Christoffersen C, Perko M. et al Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia. *FASEB J* 2003;17:1105-7
277. Pascual-Figal DA, Antolinos MJ, Bayes-Genis A, Casas T, Nicolas F, Valdes M. B-type natriuretic peptide release in the coronary effluent after acute transient ischaemia in humans. *Heart* 2007;93:1077-80

278. Talwar S, Squire IB, Downie PF, Davies JE, Ng LL. Plasma N terminal probrain natriuretic peptide and cardiostrophin 1 are raised in unstable angina. *Heart* 2000;84:421-4
279. Kyriakides ZS, Markianos M, Michalis L, Antoniadis A, Nikolaou NI, Kremastinos DT. Brain natriuretic peptide increases acutely and much more prominently than atrial natriuretic peptide during coronary angioplasty. *Clin Cardiol* 2000;23:285-8
280. Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, Mukoyama M, Nakao K. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:82-91
281. Nagaya N, Goto Y, Nishikimi T, Uematsu M, Miyao Y, Kobayashi Y, Miyazaki S, Hamada S, Kuribayashi S, Takamiya M, Matsuo H, Kangawa K, Nonogi H. Sustained elevation of plasma brain natriuretic peptide levels associated with progressive ventricular remodelling after acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 1999;96:129-36
282. Selvais PL, Donckier JE, Robert A, Laloux O, van Linden F, Ahn S, et al. Cardiac natriuretic peptides for diagnosis and risk stratification in heart failure: influences of left ventricular dysfunction and coronary artery disease on cardiac hormonal activation. *Eur J Clin Invest* 1998;28:636-42
283. Bibbins-Domingo K, Ansari M, Schiller NB, Massie B, Whooley MA. B-type natriuretic peptide and ischemia in patients with stable coronary disease: data from the Heart and Soul study. *Circulation* 2003;108:2987-92
284. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Omland T, Desai MY, Tanasijevic M et al. Acute changes in circulating natriuretic peptide levels in relation to myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1988-95
285. Tateishi J, Masutani M, Ohyanagi M, Iwasaki T. Transient increase in plasma brain (B-type) natriuretic peptide after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin Cardiol* 2000;23:776-80
286. Nadir MA, Witham MD, Szwejkowski BR, Struthers AD. Meta-analysis of B-type natriuretic peptide's ability to identify stress induced myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 2011;107:662-7
287. Di Angelantonio E, Chowdhury R, Sarwar N, Ray KK, Gobin R, Saleheen D, Thompson A, Gudnason V, Sattar N, Danesh J. B-type natriuretic peptides and cardiovascular risk: systematic review and meta-analysis of 40 prospective studies. *Circulation* 2009;120:2177-87
288. Omland T, Aakvaag A, Bonarjee VV, Caidahl K, Lie RT, Nilsen DW, Sundsfjord JA, Dickstein K. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation* 1996;93:1963-9
289. Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, Hartford M, Caidahl K. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;106:2913-8
290. Mega JL, Morrow DA, De Lemos JA, Sabatine MS, Murphy SA, Rifai N, Gibson CM, Antman EM, Braunwald E. B-type natriuretic peptide at presentation and prognosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: an ENTIRE-TIMI-23 substudy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:335-9
291. Khan SQ, Quinn P, Davies JE, Ng LL. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide is better than TIMI risk score at predicting death after acute myocardial infarction. *Heart* 2008;94:40-3
292. de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, Hall C, Cannon CP, Braunwald E. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001;345:1014-21

293. Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury JG, Troughton RW, Elliott J, Frampton C, Turner J, Crozier IG, Yandle TG. B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:2786-92
294. Tapanainen JM, Lindgren KS, Mäkikallio TH, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, Huikuri HV. Natriuretic peptides as predictors of non-sudden and sudden cardiac death after acute myocardial infarction in the beta-blocking era. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:757-63
295. Morrow DA, de Lemos JA, Blazing MA, Sabatine MS, Murphy SA, Jarolim P, White HD, Fox KA, Califf RM, Braunwald E; A to Z Investigators. Prognostic value of serial B-type natriuretic peptide testing during follow-up of patients with unstable coronary artery disease. *JAMA* 2005;294:2866-71
296. Blankenberg S, McQueen MJ, Smieja M, Pogue J, Balion C, Lonn E, Rupprecht HJ, Bickel C, Tiret L, Cambien F, Gerstein H, Münzel T, Yusuf S; HOPE Study Investigators. Comparative impact of multiple biomarkers and N-Terminal pro-brain natriuretic peptide in the context of conventional risk factors for the prediction of recurrent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation* 2006;114:201-8
297. Kistorp C. Risk stratification in secondary prevention: advances in multimarker profiles, or back to basics? *Circulation* 2006;114:184-6
298. James SK, Lindahl B, Siegbahn A, Stridsberg M, Venge P, Armstrong P, Barnathan ES, Califf R, Topol EJ, Simoons ML, Wallentin L et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation* 2003;108:275-81
299. Heeschen C, Hamm CW, Mitrovic V, Lantelme NH, White HD; Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Investigators. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels for dynamic risk stratification of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2004;110:3206-12
300. Costello-Boerrigter LC, Burnett JC Jr. The prognostic value of N-terminal proB-type natriuretic peptide. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;2:194-201
301. Weber M, Hamm C. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart* 2006;92:843-9
302. Omland T. B-type natriuretic peptides: prognostic markers in stable coronary artery disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:217-25
303. Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, Leschnik M, Leibbrandt A, Markovic M, Schwaighofer J, Beetz N, Musialek R, Neely GG, Komnenovic V, Kolm U, Metzler B, Ricci R, Hara H, Meixner A, Nghiem M, Chen X, Dawood F, Wong KM, Sarao R, Cukerman E, Kimura A, Hein L, Thalhammer J, Liu PP, Penninger JM. Impaired heart contractility in apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res* 2007;101:e32-e42
304. Li L, Zeng H, Chen JX. Apelin-13 increases myocardial progenitor cells and improves repair of post-myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;303:H605-18
305. Vera Janavel G, Crottogini A, Cabeza Meckert P, Cuniberti L, Mele A, Papouchado M, Fernández N, Bercovich A, Criscuolo M, Melo C, Laguens R. Plasmid-mediated VEGF gene transfer induces cardiomyogenesis and reduces myocardial infarct size in sheep. *Gene Ther* 2006;13:1133-42
306. Liu Y, Veena CK, Morgan JB, Mohammed KA, Jekabsons MB, Nagle DG, Zhou YD. Methylalpinumisoflavone inhibits hypoxia-inducible factor-factor-1 (HIF-1) activation by simultaneously targeting multiple pathways. *J Biol Chem* 2009;284:5859-68
307. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize

hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem* 2000;275:25130–8

308. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: Implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993;82:3610-5

309. Bozkurt B, Mann DL, Deswal A: Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Fail Rev* 2010;15:331-41

310. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schomig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995;92:748-55

311. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce tnfr-alpha mrna and peptide in the myocardium. *Shock* 2002;17:114-9

312. Basaran Y, Basaran MM, Babacan KF, Ener B, Okay T, Gok H, Ozdemir M. Serum tumor necrosis factor levels in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *Angiology* 1993;44:332-7

313. Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA, Ayala A, Cain BS, Shames BD, Ao L, Banerjee A, Harken AH. Human myocardial tissue tnfr-alpha expression following acute global ischemia in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1683-9

314. Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: Sequential appearance of il-1 beta and il-6. *Am J Physiol* 1995;269:R229-R2335

315. Maruyama K, Mori Y, Murasawa S, Masaki H, Takahashi N, Tsutusmi Y, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Shibuya M, Inada M, Matsubara H, Iwasaka T. Interleukin-1 beta upregulates cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR/flk-1 via activation of protein tyrosine kinases. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:607-17

316. Tanaka T, Kanai H, Sekiguchi K, Aihara Y, Yokoyama T, Arai M, Kanda T, Nagai R, Kurabayashi M. Induction of VEGF gene transcription by IL-1 beta is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 sites in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000 ;32:1955-67

317. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail* 2004;6:257–60

318 McGrath MF, de Bold ML, de Bold AJ. The endocrine function of the heart. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:469–477

319. D'Souza Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther* 2004;101:113–129

320. Ren B, Shen Y, Shao H, Qian J, Wu H, Jing H. Brain natriuretic peptide limits myocardial infarct size dependent of nitric oxide synthase in rats. *Clin Chim Acta* 2007;377:83-7

321. Okumura K, Yasue H, Fuji H, Kugiyama K, Matsuyama K, Yoshimura M, Jougasaki M, Kikuta K, Kato H, Tanaka H, et al. Effects of brain (B-type) natriuretic peptide on coronary artery diameter and coronary hemodynamic variables in humans: comparison with effects on systemic hemodynamic variables. *J Am Coll Cardiol* 1995;25,342–8

322. Supaporn T, Wennberg P W, Wei CM, Kinoshita M, Matsuda Y, Burnett JC. Role for the endogenous natriuretic peptide system in the control of basal coronary vascular tone in dogs. *Clin Sci* 1996;90:357–62

323. Zellner C, Protter AA, Ko E, Pothireddy MR, DeMarco T, Hutchison SJ, Chou T. M, Chatterjee K, Sudhir K. Coronary vasodilator effects of BNP: mechanisms of action in coronary conductance and resistance arteries. *Am J Physiol* 1999;276:H1049–H1057

324. Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H17–H29
325. Liang F, Gardner DG. Mechanical strain activates BNP gene transcription through p38/NF-kappaB-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1999;104:1603-12
326. Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*. 1999;341:577-85
327. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2357-68
328. Roig E. Utilidad clínica de los marcadores neurohormonales en la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol* 2004;57:347-56
329. Almenar L, Martínez-Dolz L. Péptidos natriuréticos en insuficiencia cardiaca. *Rev Esp Cardiol* 2006;6:5-26
330. Kikuta K, Yasue H, Yoshimura M, Morita E, Sumida H, Kato H, Kugiyama K, Ogawa H, Okumura K, Ogawa Y, Nakao K. Increased plasma levels of B-type natriuretic peptide in patients with unstable angina. *Am Heart J* 1996;132:101-7
331. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54
332. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1440-63.
333. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-70

ANNEX

Gregori Casals, Josefa Ros, Alessandro Sionis, Mercy M. Davidson, Manuel Morales-Ruiz and Wladimiro Jiménez

Am J Physiol Heart Circ Physiol 297:550-555, 2009. First published Jun 19, 2009;
doi:10.1152/ajpheart.00250.2009

You might find this additional information useful...

This article cites 39 articles, 24 of which you can access free at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/297/2/H550#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/297/2/H550>

Additional material and information about *AJP - Heart and Circulatory Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpheart>

This information is current as of August 13, 2009 .

AJP - Heart and Circulatory Physiology publishes original investigations on the physiology of the heart, blood vessels, and lymphatics, including experimental and theoretical studies of cardiovascular function at all levels of organization ranging from the intact animal to the cellular, subcellular, and molecular levels. It is published 12 times a year (monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2005 by the American Physiological Society. ISSN: 0363-6135, ESN: 1522-1539. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.

Hypoxia induces B-type natriuretic peptide release in cell lines derived from human cardiomyocytes

Gregori Casals,¹ Josefa Ros,^{1,3} Alessandro Sionis,⁴ Mercy M. Davidson,⁵ Manuel Morales-Ruiz,^{1,3} and Wladimiro Jiménez^{1,2,3}

¹Service of Biochemistry and Molecular Genetics, ²Department of Physiology I, ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, and ⁴Department of Cardiology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ⁵Department of Neurology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, New York

Submitted 12 March 2009; accepted in final form 16 June 2009

Casals G, Ros J, Sionis A, Davidson MM, Morales-Ruiz M, Jiménez W. Hypoxia induces B-type natriuretic peptide release in cell lines derived from human cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H550–H555, 2009. First published June 19, 2009; doi:10.1152/ajpheart.00250.2009.—B-type natriuretic peptide (BNP) is a peptide hormone of myocardial origin with significant cardioprotective properties. Patients with myocardial ischemia present with high levels of BNP in plasma and elevated expression in the myocardium. However, the molecular mechanisms of BNP induction in the ischemic myocardium are not well understood. The aim of the investigation was to assess whether myocardial hypoxia induces the production of BNP in human ventricular myocytes. To test the hypothesis that reduced oxygen tension can directly stimulate BNP gene expression and release in the absence of hemodynamic or neurohormonal stimuli, we used an in vitro model system of cultured human ventricular myocytes (AC16 cells). Cells were cultured under normoxic (21% O₂) or hypoxic (5% O₂) conditions for up to 48 h. The accumulation of BNP, atrial natriuretic peptide (ANP), and vascular endothelial growth factor (VEGF) was then measured. Hypoxia stimulated the protein release of BNP and VEGF but not ANP. In concordance, the increased mRNA levels of BNP and VEGF but not ANP were found on culturing AC16 cells under hypoxic conditions. The analysis of the transcriptional activity of the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in nuclear extracts showed that HIF-1 activity was induced under hypoxic conditions. Finally, the treatment of AC16 cells with the HIF-1 inhibitor rotenone in hypoxia inhibited BNP and VEGF release. In conclusion, these data indicate that hypoxia induces the synthesis and secretion of BNP in human ventricular myocytes, likely through HIF-1-enhanced transcriptional activity.

B-type natriuretic peptides; hypoxia-inducible factor 1; myocardial ischemia; heart failure; vascular endothelial growth factor

B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE (BNP) is an endogenous substance belonging to the natriuretic isopeptide family. It is mainly synthesized in the ventricular myocardium (32, 40) and plays an important role in body fluid homeostasis as well as in the regulation of blood pressure (26). In addition, BNP possesses antihypertrophic and antifibrotic properties, conferring it with powerful cardioprotective effects (32).

Several clinical studies have recently demonstrated the existence of a direct relationship between disease severity and the circulating levels of BNP in patients with heart failure (HF) (8, 25). This is not surprising, taking into account that myocardial stretching has been demonstrated to be the major stimulus for

BNP release by cardiomyocytes (19), which, in turn, has laid the rationale for the increasing use of BNP levels as a diagnostic and prognostic marker in HF (6, 38). However, there is growing evidence indicating that an impaired oxygen availability in myocardial cells could also be a specific inducer of BNP synthesis and release. Arguments in favor of this hypothesis include recent findings showing increased plasma levels of BNP in ischemic patients regardless of whether they have normal or impaired left ventricular ejection fraction (13, 28). On the other hand, an increased gene expression of BNP has been found in heart preparations of rats and pigs exposed to hypoxia (14, 31, 36) and the activation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) has been observed in the myocardium of rats exposed to hypoxia or undergoing coronary artery ligation (17). Nevertheless, a direct regulatory effect of cardiac hypoxia on BNP synthesis and release in human ventricular cardiomyocytes, as well as the molecular mechanisms involved in this phenomenon, has not been completely established. This is likely due to difficulties in differentiating the hypoxic stimulus from the concomitant effects of other known inducers of BNP production (i.e., hemodynamic changes, myocyte stretching, and neurohormonal stimulus) when the experimental setting is conducted in in vivo and ex vivo preparations. Moreover, the availability of human ventricular cardiomyocytes cell lines is limited because cultures of cardiac tissue have a finite life span in vitro.

In the current study we used an in vitro model system of cultured human ventricular myocytes (AC16 cells) (7) to test the hypothesis of whether reduced oxygen tension can directly stimulate BNP production in the absence of hemodynamic or neurohormonal stimuli. Our results demonstrate that hypoxia directly enhances the synthesis and secretion of BNP in AC16 cells, through a HIF-1 α -dependent mechanism. These results indicate that myocardial hypoxia likely contributes to the increased BNP levels in patients with myocardial ischemia and further support the use of BNP levels as a surrogate biomarker of ischemic heart disease.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. AC16 cells were generated from primary human ventricular cardiomyocytes, as previously described (7). This immortalized, stable cell line can be repeatedly frozen, thawed, and propagated. Cells were seeded (1×10^6 cells/well) in gelatin-coated six-well plates and grown to confluence for 36 h in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-F-12), supplemented with 12.5% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. Thereafter, the cells were switched to serum-free DMEM-F12 for 10 h and subsequently incubated

Address for reprint requests and other correspondence: W. Jiménez, Service of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic Univ., Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain (e-mail: wjimenez@clinic.ub.es).

(37°C) at variable time intervals in DMEM-F12 containing 0.1 mg/ml of bovine serum albumin under normoxic (21% O₂-5% CO₂-74% N₂) or hypoxic (5% O₂-5% CO₂-90% N₂) conditions in a controlled O₂ water-jacketed CO₂ incubator (Forma Scientific Series II, 3131, Marietta, OH). When indicated, the cell culture medium also contained the HIF-1 inhibitor rotenone (2.5 μM) or vehicle (0.001% DMSO in cell culture medium). Cell bioavailability was assessed on AC16 cells under hypoxic or normoxic conditions cultured for up to 48 h by adding 0.4 mg of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, MO) and incubated at 37°C during 90 min. The media was discarded, and 200 μl of *N*-propanol was added to each well. After 5–10 min of reaction, 50 μl of the solution was taken from each well and transferred into a 96-well plate and the optical density was measured at 570 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Effect of hypoxia on natriuretic peptides and VEGF production in AC16 cells. Following cell culture under normoxic or hypoxic conditions, culture medium samples were obtained on completing the incubation period to measure atrial natriuretic peptide (ANP), BNP, and VEGF. Samples were centrifuged (2,000 rpm, 4°C) and frozen at -20°C until further analysis. ANP extracted from cell culture medium on Sep Pack C-18 cartridges from Waters Associates (Milford, MA) was measured by radioimmunoassay (Euro-Diagnostica, Arnhem, The Netherlands). BNP was measured using a chemiluminometric immunoassay run on the ADVIA Centaur Immunochemistry analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY). VEGF was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine, Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN) (16, 30). Eight independent measurements were performed for BNP and ANP at each time point. Six independent measurements were performed for VEGF.

Hypoxia-induced messenger RNA expression in AC16 cells. Total RNA was extracted from AC16 cells cultured under normoxic or hypoxic conditions using a commercially available kit (RNeasy, Qiagen). All samples were DNase treated before transcription using the TURBO DNA-free kit (Ambion, Austin, TX), and the RNA concentration was determined by spectrophotometric analysis (ND-100 Spectrophotometer, Nanodrop Technology). DNase-treated total RNA (1 μg) was reverse transcribed (RT) using a complementary DNA synthesis kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers for BNP (left, 5'-gatggtgcaagggtctg-3'; and right, 5'-cctcttaatgccgctca-3'), VEGF-A (left, 5'-gcagcttgagtttaaacgaac-3'; and right, 5'-ggttcccgaacacctgag-3'), ANP (left, 5'-gagcggactggctgtaac-3'; and right, 5'-ggagcctcttcagctgtc-3'), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), used as an endogenous standard (left, 5'-agccacatcgctcagacac-3'; and right, 5'-cgccaatagacacaaat-3') were designed according to human BNP, VEGF-A, ANP, and GAPDH sequences (GenBank accession numbers NM_002521, NM_001025366, NM_006172, and NM_002046, respectively). The primers and probes used for the different genes studied were designed to include intron spanning using the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche Applied Science, <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>). Real-time quantitative PCR was performed in duplicate and analyzed with Opticon 2 (MJ Research, Capital Court, Reno, NV). Total volume reaction (20 μl) of diluted 1:16 cDNA, 200 nM primer dilution, 100 nM prevalidated 9-mer probe (Universal ProbeLibrary, Roche Diagnostics), and FastStart TaqMan Probe Master (Roche Diagnostics) was used in each PCR reaction. The fluorescence signal was captured during each of the 45 cycles (denaturing 10 s at 95°C, annealing 30 s at 60°C, and extension 30 s at 72°C). GAPDH was used as the reference gene for normalization, and water was used as the negative control. The relative quantification was calculated using the comparative threshold cycle (C_T), which is inversely related to the abundance of mRNA in the initial sample. The mean C_T of duplicate measurements was used to calculate ΔC_T as the difference in C_T for the target and reference. The relative quantity of product was expressed as the fold induction of the target gene compared with the reference gene according to the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$,

where ΔΔC_T represents ΔC_T values normalized with the mean ΔC_T of basal samples. Eight independent measurements were performed at each time point.

Effect of hypoxia on HIF-1 activation in AC16 cells. The intranuclear activity of HIF-1 was determined in nuclear extracts of AC16 cells obtained following hypoxic or normoxic exposure using a nuclear extract kit (Active Motif, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The cells were collected and lysed, and the cytosolic fraction was removed. The nuclear pellets were homogenized, and the nuclear extracts were collected. The protein concentration in the nuclear extracts was determined using the Bradford assay (1). The activation of HIF-1 was quantified using a TransAM kit (Active Motif), which measures binding to a 26-bp hypoxia response element oligonucleotide from the erythropoietin gene attached to a 96-well plate (22). Nuclear extract (6 μg) were used per sample. Nuclear extracts from COS-7 cells treated with the HIF-1α-stabilizer CoCl₂ which were provided with the kit, were used as positive control. CoCl₂ prevents HIF-1α ubiquitination and degradation in addition to inducing its expression (37). Nuclear extracts incubated with an HIF-1-specific competitor oligonucleotide served as a negative control. To assess the effect of inhibiting HIF-1 activation, the AC16 cells were exposed to rotenone (2.5 μM), an inhibitor of hypoxic HIF-1α stabilization (21), for 40 min, followed by an exposure to hypoxia (5% O₂) or normoxia (21% O₂) for 1, 3, 6, and 24 h. Thereafter, HIF-1 activity was determined and the medium was collected for further determination of VEGF and BNP concentrations as described in *Effect of hypoxia on natriuretic peptides and VEGF production in AC16 cells*. Eight independent measurements were performed at each time point.

Statistical analysis. The experimental data are presented as means ± SE from at least six independent experiments. The time-course production of natriuretic peptides and VEGF under hypoxic and normoxic conditions was analyzed by one-way analysis of variance and post hoc Bonferroni *t*-test. Comparisons between normoxic and hypoxic conditions in the same time conditions were performed with the unpaired Student's *t*-test. This test was also used to compare the effect of rotenone on BNP and VEGF production under hypoxic conditions in AC16 cells. Differences were considered significant at a value of *P* < 0.05.

RESULTS

Hypoxia increases BNP production in AC16 cells. To investigate whether reduced oxygen tension could be a specific stimulus for BNP secretion in human cardiomyocytes, we incubated AC16 cells under hypoxic conditions for increasing time periods and the BNP concentration in the cell culture medium was assessed. We also measured AC16 secretion of ANP, another member of the natriuretic isopeptide family produced by the human heart.

AC16 cells time-dependently increased BNP levels within the 48-h incubation period. Moreover, the secretion of this peptide was significantly higher at 12, 24 and 48 h of hypoxic exposure than under normoxic conditions (Fig. 1). In fact, BNP levels in the media of hypoxic cells were two- to threefold higher than those in normoxic cells. By contrast, the secretion of ANP was almost negligible and did not experience any modification due to hypoxic exposure for up to 48 h (Fig. 1). The hypoxic induction of BNP was accompanied by a parallel augmentation of the known hypoxia-sensitive factor VEGF (Fig. 1). The kinetics of VEGF production significantly differ in normoxic or hypoxic AC16 cells. The levels of VEGF in the media of cells cultured at 5% O₂ were between 1.5 to 2.5-fold higher than in the media of 21% O₂ AC16 cells. No differences in cell viability, as assessed by the MTT assay, were observed

H552

HYPOXIA AND BNP IN HUMAN-DERIVED CARDIAC CELL LINES

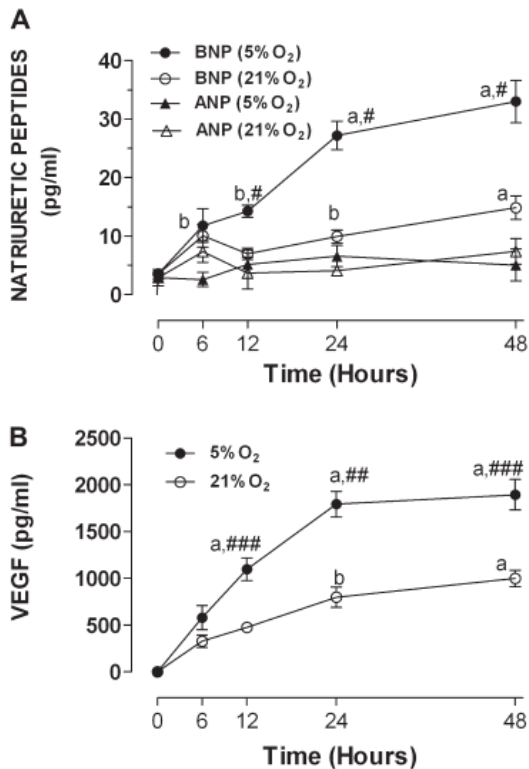


Fig. 1. Time-course production of natriuretic peptides (A) and VEGF (B) in AC16 cells under normoxic (21% O₂) or hypoxic (5% O₂) conditions. * $P < 0.001$ and ^b $P < 0.005$ vs. basal values (1-way ANOVA and Bonferroni test). # $P < 0.001$, ## $P < 0.005$, and ### $P < 0.01$ vs. normoxic conditions in the same time conditions (unpaired Student's *t*-test); $n = 8$ independent measurements for B-type natriuretic peptide (BNP) and atrial natriuretic peptide (ANP), and $n = 6$ independent measurements for VEGF.

between normoxic or hypoxic cells. Cell viability after the incubation of AC16 cells for 48 h in normoxic or hypoxic conditions was $101 \pm 6\%$ and $101 \pm 3\%$, respectively.

Hypoxia increases the messenger expression of VEGF and BNP in AC16 cells. To determine whether the increased BNP release during hypoxic exposure was accompanied by an induction of BNP mRNA, we harvested the cells from the same plates for the measurement of BNP gene expression. GAPDH was used as an endogenous control, and no significant differences in GAPDH mRNA expression were found over the experimental periods in both normoxia- and hypoxia-exposed AC16 cells. Real-time PCR analysis indicated that hypoxic exposure resulted in a 2.8-fold increase in BNP mRNA levels within 6 h, with this difference being sustained for up to 12 h under this condition (Fig. 2). There was a trend toward higher BNP mRNA levels in AC16 cells exposed for to 5% O₂ for 24 h, although the differences did not reach statistical significance. A similar behavior was observed at assessing the pattern expression of VEGF mRNA. Six hours following hypoxic exposure, the AC16 cells showed a fourfold increase in VEGF mRNA compared with normoxic control cells. However, VEGF mRNA levels dropped to normoxic control levels after

12 and 24 h of hypoxic exposure (Fig. 2). No differences in ANP mRNA expression were found between cells cultured at normoxic or hypoxic conditions at any of the investigated time periods (data not shown).

Hypoxia induces HIF-1 activation in AC16 cells. The time course activation of HIF-1 under hypoxic conditions assessed as HIF-1 DNA binding to a specific hypoxia responsive element oligonucleotide sequence is shown in Fig. 3. Following 1, 3, and 6 h of hypoxia exposure, AC16 cells showed a 2.0-, 2.4-, and 3.0-fold over normoxic HIF-1 DNA binding, respectively. Hypoxic cells pretreated with rotenone did not increase HIF-1 DNA binding compared with cells exposed to normoxic conditions, indicating that rotenone is able to inhibit HIF-1 DNA binding in hypoxic cells (Fig. 3).

The inhibition of HIF-1 decreases hypoxia-induced BNP and VEGF production in AC16 cells. Although the data presented in Fig. 4 are consistent with a significant role of HIF-1 in BNP expression, they do not provide direct evidence for its involvement. Therefore, we next sought to determine whether HIF-1 inhibition by rotenone may prevent hypoxic BNP-induced secretion in AC16 cells. The repression of hypoxic VEGF secretion by rotenone was assessed as well. As anticipated, hypoxia resulted in a significant 180% increase in BNP levels in the media of AC16 cells. However, this effect was fully

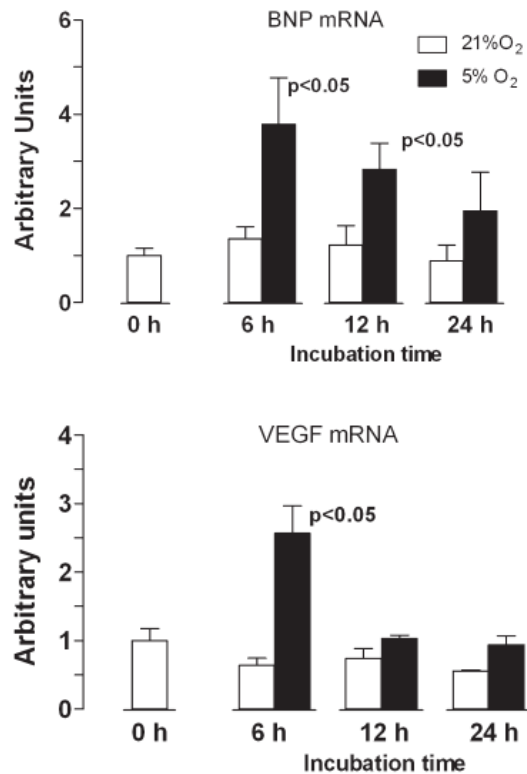


Fig. 2. BNP (top) and VEGF (bottom) mRNA expression in AC16 cells assessed by real-time PCR after exposure to normoxic (21% O₂) or hypoxic (5% O₂) conditions. Results are means \pm SE. $P < 0.05$ vs. normoxic conditions in the same time conditions (unpaired Student's *t*-test); $n = 8$ independent measurements.

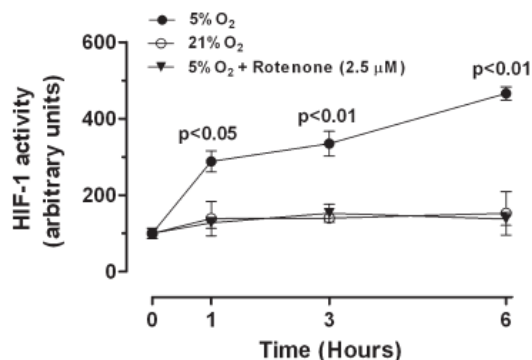


Fig. 3. Effect of hypoxia on hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA binding activity in AC16 cells. Cells were incubated for variable time intervals in either normoxia (21% O₂) or hypoxia (5% O₂) in the presence or in the absence of rotenone (2.5 μM). Cells were exposed to rotenone 40 min before hypoxia treatment and kept under this condition thereafter. Following incubation, the cells were lysed and nuclear extracts were tested for DNA binding to a probe containing a hypoxia responsive element sequence. The presence of the DNA-bound transcription factor was then detected by anti-HIF-1α antibodies and revealed by colorimetry; *n* = 8 independent measurements.

abolished when cardiomyocytes were incubated in the presence of rotenone. The inhibitory action of rotenone on BNP secretion was paralleled by an identical effect on VEGF production (Fig. 4), indicating that the mechanisms of hypoxia-stimulated BNP and VEGF secretion are mediated by an increased HIF-1 DNA binding.

DISCUSSION

The current study shows that the BNP messenger expression and peptide release by cultured human ventricular myocytes (AC16 cells) is enhanced in response to reduced oxygen tension. When myocytes were exposed to hypoxia, the elevation in BNP secretion was preceded by the augmentation of BNP gene expression, suggesting that the hypoxia-induced alterations in BNP activity were determined at the transcriptional level. The activation of HIF-1 occurred earlier than the elevation of BNP gene expression, and the hypoxic induction of BNP was paralleled by a similar expression pattern and protein secretion of the known HIF-1 target factor VEGF, suggesting a role of the transcription factor HIF-1 in BNP activation by hypoxia. Lastly, hypoxia-induced BNP protein secretion was significantly attenuated by rotenone, a well-known inhibitor of HIF-1 activation.

At present, it is widely accepted that the elevation of BNP secretion in the ischemic heart is the result of ventricular wall distension secondary to myocardial ischemia (33). However, there is also increasing evidence suggesting that reduced oxygen availability may directly influence BNP release. This is supported by studies showing that patients presenting with acute myocardial infarction or acute coronary syndromes display transient elevations of BNP (9, 18, 27). Moreover, it has also been reported that patients with coronary artery disease and normal left ventricular function display an elevation in plasma BNP levels which are associated with increased BNP expression in myocardial tissue (13). Altogether, these results support the concept that cardiac ischemia enhances BNP release in the absence of myocardial stretch.

It is known that the mRNA expression and protein concentration of BNP are augmented in the failing heart by a mechanism dependent on the stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase and the activation of the transcription factor NF-κB in the cardiac myocyte (20). However, the underlying pathophysiological mechanisms of BNP induction in cardiac ischemia have not been identified. Hypoxia is a critical component of the ischemic myocardium, which may explain the changes in BNP expression associated with ischemia. In the current study, we used AC16 ventricular myocytes to determine the mechanisms regulating BNP secretion under reduced oxygen tension. The AC16 cell line is a proliferating human cardiomyocyte cell line derived from nonproliferating primary cultures of adult ventricular heart tissue. The AC16 cell line closely resembles adult human cardiomyocytes with regard to various antigenic determinants, thus constituting a valuable tool for the study of the signaling pathways involved in BNP synthesis and release (7, 29). In particular, we assessed whether hypoxia specifically triggers BNP production in the absence of other known stimuli of BNP such as hemodynamic, neural, and hormonal factors (24). The effect of hypoxia on VEGF and ANP production by the cardiomyocyte cell line was also evaluated to validate the sensitivity and specificity of the AC16 cells response to hypoxia. VEGF is a well-known hypoxia-responsive gene (35), whereas ANP is a cardiac BNP isopep-

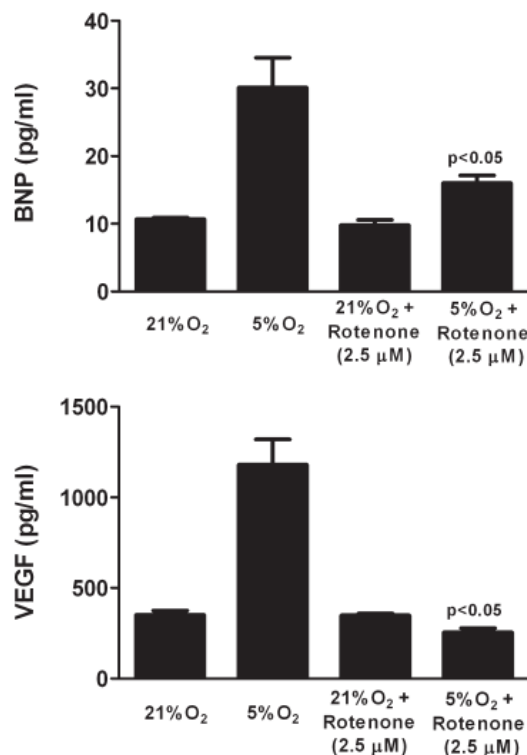


Fig. 4. BNP (top) and VEGF (bottom) production after 24 h of normoxic exposure (21% O₂), hypoxic exposure (5% O₂), and hypoxic and normoxic exposure with the HIF-1 activation inhibitor rotenone (2.5 μM). Cells were exposed to rotenone 40 min before normoxia or hypoxia and kept under this condition thereafter. *P* < 0.05 vs. 5% O₂; *n* = 8 independent measurements.

tide mainly secreted by atrial myocytes that is much less accurate than BNP for the diagnosis of HF (4, 10).

Cells cultured under hypoxic conditions experienced a significant increase in BNP but not in ANP production. Despite both natriuretic peptides displaying similar physiological mechanisms, this different response following hypoxic stimulation is not surprising. Decreased oxygen tension is a powerful stimulus for ANP production in atrial myocytes (3) but not in ventricular cardiomyocytes. Atrial myocytes are the major source and storage site of ANP, but ventricular myocytes secrete ANP by a constitutive pathway and store only a minor part of the peptide (3). Contrary to what occurs in the atrial tissue, the lack of stored ANP prevents ventricular cardiocytes from increasing ANP secretion in response to reduced oxygen tension. In contrast, whether hypoxia regulates BNP production in ventricular myocytes, a potentially larger source of BNP, it is still under discussion. Goetze et al. (14) used freshly harvested pig ventricular cells incubated under oxygen-deprived conditions, and their findings suggest an effect of hypoxia on BNP synthesis at the transcriptional level. Furthermore, the hypoxic induction of BNP mRNA has recently been described in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes (39). All these previous investigations corroborate our findings, showing a clear stimulatory effect of hypoxia on BNP secretion in human cardiomyocyte cell lines, and suggest the existence of an oxygen-regulated BNP pathway in these cells. This hypothesis is further supported by our results that show a marked increased VEGF production in AC16 cells cultured under hypoxic conditions. In fact, it is well known that oxygen tension closely regulates the signaling pathways, resulting in an increased VEGF production by different cell types (35).

The results obtained at assessing messenger expression of BNP, VEGF, and ANP in AC16 cells under hypoxic conditions additionally sustained the concept of an oxygen-mediated regulatory mechanism for BNP release in the human-derived cardiomyocyte cell line. Cells cultured at low oxygen tension contained higher BNP and VEGF mRNA abundance than cells cultured in normoxia, a difference not observed when ANP mRNA was measured. Nevertheless, it should be noted that there is a difference in the expression pattern induced by hypoxia between VEGF and BNP. This discrepancy may underlie differences in posttranslational mechanisms or even in alternative regulatory pathways involved in BNP activation.

HIF-1 is a heterodimeric transcription factor that is considered a crucial mediator of the cellular response found under conditions of diminished free oxygen availability. HIF-1 is composed of an inducibly expressed HIF-1 α subunit and a constitutively expressed HIF-1 β subunit. HIF-1 α is sensitive to hypoxia and is rapidly degraded by the ubiquitin proteasomal pathway under normoxic conditions. Under hypoxic conditions, HIF-1 α degradation is blocked, thus allowing HIF-1 accumulation and migration to the nucleus, where it plays a key role in the transcriptional activation of the hypoxia-inducible genes such as VEGF by binding to specific hypoxia response elements in their regulatory region (35). There is evidence that HIF-1 may induce BNP production in cardiomyocytes. Putative HIF-1 binding sites have been identified within the promoter of the BNP gene (23), and experimental studies have shown that animals exposed to hypoxia display an increased myocardial BNP gene expression (14, 31, 36). Moreover, the activation of HIF-1 α has been observed in the

ischemic myocardium (17), and the hypoxic induction of BNP mRNA expression has recently been described through a HIF-1-dependent mechanism in cultured adult rat cardiomyocytes and in different noncardiac human cell lines (39). In the present study, hypoxic cell cultures depicted enhanced HIF-1 α activity, a phenomenon that was not seen when the cells were incubated with rotenone, a well-known inhibitor of HIF-1 α stabilization in hypoxia (12, 21, 34). Rotenone abolishes the hypoxic stabilization of HIF-1 α protein by inhibiting mitochondrial complex I activity (34), likely by blocking the electron flow proximally to complex III, thereby ablating the generation of reactive oxygen species during hypoxia (2). The HIF-1 inhibitor also abolished the enhanced hypoxic production of BNP and VEGF in AC16 cells. These results indicate that the hypoxia-induced increase in BNP and VEGF secretion in AC16 cells is closely related to HIF-1 α stabilization, further emphasizing the existence of a transcriptionally regulated mechanism for BNP secretion in response to a decreased oxygen tension in human ventricular cardiomyocytes.

It is important to remark, however, the potential limitations of our findings as a consequence of using the AC16 cell line. In fact, the introduction of the SV40 gene allows primary cardiomyocytes to reenter in the cell cycle, thus providing an *in vitro* model that shows most of the characteristic features of primary human cardiac cells. Nevertheless, the presence of the SV40 gene may also prevent the expression of some phenotypic manifestations of cardiomyocytes, including the loss of organized contractile apparatus, low action potential, or down-regulation of transcription factors (7). This in turn may help to explain the differences between the *in vitro* results and those obtained in a more clinical scenario. In fact, hypoxia induced a transitory 12-h increase in BNP mRNA expression, but at 24 h in culture, no differences were found between normoxic or hypoxic cells. However, patients with ischemic heart disease present high-circulating levels of BNP (6), which likely reflect a persistent activation of BNP mRNA in the cardiac tissue. Moreover, beyond the particular characteristic of the *in vitro* model, other well-known inducers of BNP secretion including neurohormones, cytokines, and growth factors (5) should be taken into account when explaining the differences between *in vitro* and *in vivo* findings.

The elevation of BNP in response to myocardial hypoxia may have beneficial endocrine and paracrine effects. BNP is a powerful endogenous natriuretic, diuretic, and vasodilatation peptide that antagonizes the vasoconstrictor activity of the renin-angiotensin-aldosterone system and inhibits the sympathetic nervous system (15, 26). In addition to the endocrine effects of BNP, there are increasing data pointing to BNP as a paracrine factor exerting cardioprotective functions in the heart, including the regulation of myocyte growth and the inhibition of cardiac fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition (11, 32). Consequently, the observed induction of BNP may constitute a homeostatic mechanism addressed to preserve cardiovascular hemodynamics and prevent fibroproliferative processes in the hypoxic heart.

GRANTS

This work was supported by Dirección General de Investigación Científica y Técnica Grant SAF06-07053 (to W. Jiménez) and SAF07-63069 (to M. Morales-Ruiz). G. Casals is a recipient of a "Contrato post Formación Sanitaria Especializada" from the Instituto de Salud Carlos III (FIS CM07/00043). The

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCES

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275: 25130–25138, 2000.
- Chen YF. Atrial natriuretic peptide in hypoxia. *Peptides* 26: 1068–1077, 2005.
- Clerico A, Iervasi G, Del Chicca MG, Emdin M, Maffei S, Nannipieri M, Sabatino L, Forini F, Manfredi C, Donato L. Circulating levels of cardiac natriuretic peptides (ANP and BNP) measured by highly sensitive and specific immunoradiometric assays in normal subjects and in patients with different degrees of heart failure. *J Endocrinol Invest* 21: 170–179, 1998.
- Clerico A, Recchia FA, Passino C, Emdin M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H17–H29, 2006.
- Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 50: 2357–2368, 2007.
- Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, Protas L, Hirano M, Isaac ND. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 39: 133–147, 2005.
- de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 362: 316–322, 2003.
- de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, Hall C, Cannon CP, Braunwald E. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 345: 1014–1021, 2001.
- Doust JA, Glasziou PP, Pietrzak E, Dobson AJ. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. *Arch Intern Med* 164: 1978–1984, 2004.
- D'Souza Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther* 101: 113–129, 2004.
- Glassford AJ, Yue P, Sheikh AY, Chun HJ, Zarafshar S, Chan DA, Reaven GM, Quettermous T, Tsao PS. HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1590–E1596, 2007.
- Goetze JP, Christoffersen C, Perko M, Arendrup H, Rehfeld JF, Kastrop J, Nielsen LB. Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia. *FASEB J* 17: 1105–1107, 2003.
- Goetze JP, Gore A, Moller CH, Steinbruechel DA, Rehfeld JF, Nielsen LB. Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. *FASEB J* 18: 1928–1930, 2004.
- Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail* 6: 257–260, 2004.
- Jimenez W, Gutkowska J, Gines P, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Molecular forms and biological activity of atrial natriuretic factor in patients with cirrhosis and ascites. *Hepatology* 14: 601–607, 1991.
- Jürgensen JS, Rosenberger C, Wiesener MS, Warnecke C, Hörstrup JH, Gräfe M, Philipp S, Griethe W, Maxwell PH, Frei U, Bachmann S, Willenbrock R, Eckardt KU. Persistent induction of HIF-1 α and -2 α in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *FASEB J* 18: 1415–1417, 2004.
- Kikuta K, Yasue H, Yoshimura M, Morita E, Sumida H, Kato H, Kugiyama K, Ogawa H, Okumura K, Ogawa Y, Nakako K. Increased plasma levels of B-type natriuretic peptide in patients with unstable angina. *Am Heart J* 132: 101–107, 1996.
- Kinnunen P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. *Endocrinology* 132: 1961–1970, 1993.
- Liang F, Gardner DG. Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF- κ B-dependent mechanism. *J Clin Invest* 104: 1603–1612, 1999.
- Liu Y, Veena CK, Morgan JB, Mohammed KA, Jekabsons MB, Nagle DG, Zhou YD. Methylalpinumisoflavone inhibits hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) activation by simultaneously targeting multiple pathways. *J Biol Chem* 284: 5859–5868, 2009.
- Loboda A, Stachurska A, Florczyk U, Rudnicka D, Jazwa A, Wegrzyn J, Kozakowska M, Stalinska K, Poellinger L, Levonen AL, Yla-Herttuala S, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 induction attenuates Nrf2-dependent IL-8 production in human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. In press.
- Luo Y, Jiang C, Belanger AJ, Akita GY, Wadsworth SC, Gregory RJ, Vincent KA. A constitutively active hypoxia-inducible factor-1 α /VP16 hybrid factor activates expression of the human B-type natriuretic peptide gene. *Mol Pharmacol* 69: 1953–1962, 2006.
- Ma KK, Banas K, de Bold AJ. Determinants of inducible brain natriuretic peptide promoter activity. *Regul Pept* 128: 169–176, 2005.
- Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA; Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 347: 161–167, 2002.
- McGrath MF, de Bold ML, de Bold AJ. The endocrine function of the heart. *Trends Endocrinol Metab* 16: 469–477, 2005.
- Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, Mukoyama M, Nakao K. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 88: 82–91, 1993.
- Palazzuoli A, Calabria P, Vecchiato L, Quatrini I, Carrera A, Bruni F, Puccetti L, Pastorelli M, Pasqui AL, Auteri A. Plasma brain natriuretic peptide levels in coronary heart disease with preserved systolic function. *Clin Exp Med* 3: 44–49, 2004.
- Palomer X, Alvarez-Guardia D, Rodriguez-Calvo R, Coll T, Laguna JC, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Vázquez-Carrera M. TNF- α reduces PGC-1 α expression through NF- κ B and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res* 81: 703–712, 2009.
- Perez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Colmenero J, Ruiz-del-Arbol L, Cejudo P, Claria J, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Jimenez W. Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 29: 1057–1063, 1999.
- Perhonen M, Takala TE, Vuolteenaho O, Mäntymaa P, Leppälüoto J, Ruskoaho H. Induction of cardiac natriuretic peptide gene expression in rats trained in hypobaric hypoxic conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R344–R352, 1997.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27: 47–72, 2006.
- Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Omland T, Desai MY, Tanasijevic M, Hall C, McCabe CH, Braunwald E. Acute changes in circulating natriuretic peptide levels in relation to myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 44: 1988–1995, 2004.
- Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L922–L931, 2002.
- Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88: 1474–1480, 2000.
- Tóth M, Vuorinen KH, Vuolteenaho O, Hassinen IE, Uusimaa PA, Leppälüoto J, Ruskoaho H. Hypoxia stimulates release of ANP and BNP from perfused rat ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 266: H1572–H1580, 1994.
- Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82: 3610–3615, 1993.
- Weber M, Hamm C. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart* 93: 843–849, 2006.
- Weidemann A, Klanke B, Wagner M, Volk T, Willam C, Wiesener MS, Eckardt KU, Warnecke C. Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1 α , is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction. *Biochem J* 409: 233–242, 2008.
- Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 90: 195–203, 1994.

Admission B-type natriuretic peptide retains prognostic value in patients with acute coronary syndrome and preserved left ventricular ejection fraction

G. Casals^{a,b,*}, L. Azzalini^c, C. Tomas^d, S. Marfa^{a,b}, M. Morales-Ruiz^{a,b}, M. Heras^e, W. Jimenez^{a,b,f}, A. Sionis^c

^a Service of Biochemistry and Molecular Genetics, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERED), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Department of Cardiology, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

^d Department of Cardiology, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

^e Department of Cardiology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^f Department of Physiology I, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2012

Accepted 4 May 2012

Available online 26 May 2012

Keywords:

B-type natriuretic peptide

Acute coronary syndrome

Left ventricular ejection fraction

Cardiac ischemia

Patients with acute coronary syndrome (ACS) often present with increased plasma levels of B-type natriuretic peptide (BNP) [1,2] that have a high prognostic value [3]. However, there is little information concerning whether the clinical value of this cardiac marker is different between ACS patients with preserved left ventricular ejection fraction (LVEF) (pLVEF) and patients with reduced LVEF (rLVEF). In the current study, we aimed to evaluate plasma levels of BNP in patients with ACS in order to compare the clinical information provided by this parameter between patients with pLVEF and rLVEF.

Consecutive patients with ACS admitted within the first 24 h after the onset of symptoms were included in this cohort study. A standard echocardiogram was performed within 48 h after admission. Post-ACS LVEF was calculated using the biplane Simpson's method [4]. Blood samples were collected within 24 h after admission to measure creatine kinase MB isoenzyme (CK-MB), troponin I (TnI), glucose, glycosylated hemoglobin, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), BNP and other routine biochemical and hematological variables. Plasma BNP was measured using a chemiluminometric immunoassay run on the ADVIA Centaur Immunochemistry analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). The endpoint of this study was a composite of all-cause mortality and new ACS. We divided the whole cohort according to admission LVEF into two groups: pLVEF ($\geq 55\%$) and rLVEF ($< 55\%$). We conducted a multivariate analysis (back-step logistic regression) to identify independent predictors of the endpoint. We used Kaplan-Meier curves and the log-rank test to identify an optimal BNP cut-off level to stratify patients with ACS according to their probability of presenting the endpoint during follow up. The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology [5].

The baseline, clinical, angiographic and biochemical characteristics of the patients are outlined in Tables 1 and 2. A total of 1806 subjects were included; 73% were male, with a mean age of 67.9 ± 12.7 years, and 34.2% were diabetics. Eighty-four percent were in Killip class I. The final diagnosis was ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) in 29.7% of the cases, non-ST segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) in 44.4% and unstable angina in 25.9%. In 84% of the patients coronary angiography was performed and 41.1% underwent percutaneous coronary intervention (PCI). Only 3.8% underwent coronary artery by-pass graft (CABG). The mean LVEF was $48.7 \pm 12.5\%$.

We divided patients according to whether they presented with pLVEF or rLVEF (Table 1). Information on LVEF was available in 1698 patients: 744 (43.8%) had pLVEF and 954 (56.2%) had rLVEF. The rLVEF group had a similar mean age but with a higher proportion of male patients. Subjects with rLVEF also presented with a higher Killip class, less frequently underwent coronary angiography and PCI and had more severe coronary artery disease (CAD) than those with pLVEF. TnI, CK-MB, glucose, glycosylated hemoglobin, hs-CRP and BNP were higher in patients with

Table 1
Demographic characteristics and cardiovascular risk factors of the population.

	All patients (n = 1806)	LVEF $\geq 55\%$ (n = 744)	LVEF $< 55\%$ (n = 954)	p
Male	1312 (72.6)	508 (68.3)	737 (77.3)	<0.001
Age (years)	67.9 (12.7)	67.0 (12.1)	68.0 (13.1)	ns
Hypertension	1355 (75.0)	547 (73.5)	725 (76.0)	ns
Dyslipidemia	1033 (57.2)	434 (58.3)	538 (56.4)	ns
Diabetes mellitus	618 (34.2)	244 (32.8)	337 (35.3)	ns
Active smoking	549 (30.4)	231 (31.0)	285 (29.9)	ns

Legend. LVEF: left ventricular ejection fraction. ns: non significant.

Table 2
Clinical, angiographic and biochemical characteristics of the population.

	All patients (n = 1806)	LVEF $\geq 55\%$ (n = 744)	LVEF $< 55\%$ (n = 954)	p
Killip class				
I	1510 (83.6)	705 (94.8)	727 (76.2)	<0.001
II	154 (8.5)	28 (3.8)	120 (12.6)	
III	79 (4.4)	9 (1.2)	59 (6.2)	
IV	63 (3.5)	2 (0.3)	48 (5.0)	
Coronary angiography	1522 (84.3)	658 (88.4)	809 (84.8)	0.028
PCI	742 (41.1)	364 (48.9)	351 (36.8)	<0.001
CABG	68 (3.8)	25 (3.4)	38 (4.0)	ns
CAD	1.47 (0.89)	1.32 (0.89)	1.59 (0.87)	<0.001
Peak CK-MB (IU/l)	71.8 (113.3)	42.0 (81.6)	93.5 (127.5)	<0.001
Peak troponin I (ng/ml)	43.9 (119.7)	12.1 (46.5)	67.6 (148.3)	<0.001
Glucose on admission (mg/dl)	162.1 (78.7)	148.2 (68.8)	172.8 (84.0)	<0.001
Fasting glucose (mg/dl)	123.6 (49.3)	116.5 (42.7)	128.3 (52.1)	<0.001
MDRD (ml/min/1.73 m ²)	81.4 (31.7)	86.2 (32.2)	79.1 (30.8)	<0.001
MDRD < 30 ml/min/1.73 m ²	46 (2.5)	16 (2.2)	24 (2.5)	ns
HbA1c (%)	5.73 (1.52)	5.64 (1.46)	5.83 (1.59)	0.022
CRP (mg/dl)	2.85 (4.16)	1.92 (2.82)	3.50 (4.77)	<0.001
BNP (pg/ml)	221.6 (352.8)	97.2 (121.8)	310.9 (432.9)	<0.001
BNP > 150 pg/ml	397 (22.0)	83 (11.2)	295 (30.9)	<0.001
LVEF (%)	48.7 (12.5)	60.0 (4.7)	39.8 (8.9)	<0.001
Diagnosis				
STEMI	537 (29.7)	125 (16.8)	384 (40.3)	<0.001
NSTEMI	802 (44.4)	338 (45.4)	417 (43.7)	
Unstable angina	467 (25.9)	281 (37.8)	153 (16.0)	

Legend. LVEF: left ventricular ejection fraction. PCI: percutaneous coronary intervention. CABG: coronary artery bypass graft. CAD: coronary artery disease (number of diseased vessels). CK-MB: creatine kinase MB-fraction. MDRD: modification of diet in renal disease. HbA1c: glycosylated hemoglobin. CRP: C-reactive protein. BNP: B-type natriuretic peptide. STEMI: ST-elevation myocardial infarction. NSTEMI: non-ST-elevation myocardial infarction. ns: non significant.

* Corresponding author. Tel.: +34 932275518.
E-mail address: casals@clinic.ub.es (G. Casals).

Table 3
Events during follow up.

	All patients (n = 1806)	LVEF ≥ 55% (n = 744)	LVEF < 55% (n = 954)	p
Primary endpoint	164 (9.1)	59 (7.9)	95 (10.0)	0.052
New ACS	136 (7.5)	52 (7.0)	76 (8.0)	ns
Death	78 (4.3)	21 (2.8)	51 (5.3)	0.003
Follow up (days)	393.7 (210.4)	402.9 (213.7)	389.3 (209.1)	ns

Legend. LVEF: left ventricular ejection fraction. ACS: acute coronary syndrome. ns: non significant.

rLVEF, while renal function (assessed with the MDRD formula) was worse. The mean LVEF was $60.0 \pm 4.7\%$ in pLVEF and $39.8 \pm 8.9\%$ in rLVEF. STEMI was more frequent in rLVEF (40.3% versus 16.8%, rLVEF versus pLVEF, respectively).

The mean follow up was approximately 13 months. We observed adverse events in 9.1% during follow up in the whole cohort (Table 3). When we analyzed data according to LVEF, the primary endpoint occurred more frequently in the rLVEF group than in the pLVEF (10.0% versus 7.9%). This difference was mainly related to death, which was twice as frequent in rLVEF than in pLVEF (5.3% versus 2.8%).

Fig 1 shows the Kaplan–Meier curves of survival free of the primary endpoint according to BNP plasma levels on admission. Patients with BNP > 150 pg/ml had a significantly higher probability of presenting the primary endpoint during follow up ($p = 0.008$ with the log-rank test).

We selected variables with significant statistical differences between the pLVEF and rLVEF groups on univariate analysis (see Tables 1 and 2) to build a multivariate model to identify independent predictors of adverse events during follow up. On back-step logistic regression analysis, only admission BNP proved to be independently associated with adverse events during follow up: OR 1.001 (95% CI: 1.000 to 1.002, $p = 0.018$). The independent contribution of BNP to the prediction of adverse events was maintained even after adjustment for age, sex, Killip Class, Tnl peak, fasting glucose, renal function and LVEF.

Our study shows that admission BNP is an independent predictor of cardiovascular events even in patients with ACS and pLVEF.

It is known that BNP release increases in patients with heart failure due to large myocardial infarctions. These patients are typically older, with more comorbidities, more frequently present with STEMI, have more severe CAD and lower LVEF. In our cohort, BNP was also elevated in subjects with ACS without acute heart failure presenting with pLVEF. Additionally, BNP proved to be an independent predictor of adverse events at one year, even after adjustment for LVEF.

We identified an optimal BNP cut-off value of 150 pg/ml: patients with higher BNP levels on admission had a significantly higher probability of presenting the endpoint during follow up. This finding may be useful in clinical practice for rapid identification of high-risk patients.

Several mechanisms have been proposed as responsible for an elevation in natriuretic peptides in patients with ACS, stretch and inflammation among others [6]. In patients with ACS and pLVEF hypoxia could also play a key role. We previously demonstrated a direct effect of hypoxia on BNP secretion in human ventricular myocytes [7].

Our study has several limitations. This is a single-center study and our results need to be confirmed in larger studies, including patients from different geographical areas, with more genetic diversity. Moreover, this was an observational study: even though the baseline characteristics of the patients with preserved and reduced LVEF were similar (except for gender distribution) and logistic regression was used to identify independent predictors of adverse events, we cannot rule out the possibility that variables not studied could have confounded the results.

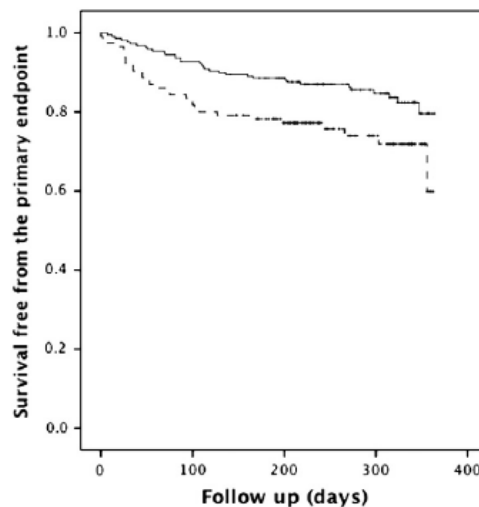


Fig 1. Survival free from the primary endpoint, according to BNP levels on admission (≤ 150 pg/ml: solid line; > 150 pg/ml: broken line).

Our data suggest that, in patients with ACS, BNP retains its prognostic value in patients with ACS and preserved LVEF. Patients with BNP on admission > 150 pg/ml have a significantly higher probability of presenting death or new ACS during follow up.

BNP should be routinely measured at admission in all patients with ACS independent of LVEF and the presence of symptoms or signs of heart failure.

This work was supported by Grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Grant SAF09-08839 to W.J.), from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (SGR 2009/1496), from the Ministerio de Economía y Conocimiento, Instituto de Salud Carlos III, (Red HERACLES RD06/0009 to MH) and from a non-restricted grant from GSK. The Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD) is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

References

- [1] Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:82–91.
- [2] Kikuta K, Yasue H, Yoshimura M, Morita E, Sumida H, Kato H, et al. Increased plasma levels of B-type natriuretic peptide in patients with unstable angina. *Am Heart J* 1996;132:101–7.
- [3] de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001;345:1014–21.
- [4] Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1440–63.
- [5] Coats AJS, Shewan LG. Statement on authorship and publishing ethics in the International Journal of Cardiology. *Int J Cardiol* Dec 2 2011;153(3):239–40.
- [6] LaPointe MC. Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides* 2005;26:944–56.
- [7] Casals G, Ros J, Sionis A, Davidson MM, Morales-Ruiz M, Jimenez W. Hypoxia induces B-type natriuretic peptide release in cell lines derived from human cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H550–5.

AGRAÏMENTS

Al Dr. Wladimiro Jiménez, per la direcció d'aquesta tesi doctoral i per haver-me donat l'oportunitat de formar part de l'excel·lent grup de recerca que dirigeix. Per la seva dedicació rigorosa i estímul constant.

A tots i cadascun dels companys de recerca amb els que he tingut el privilegi de treballar durant aquests anys. A la Pepa Ros, Manuel Morales i Guillermo Fernández, agrair especialment la seva acollida, generositat a l'hora de compartir els seus coneixements i suport i bona disposició en els inicis, que s'han mantingut inalterats durant aquests anys. A Pedro Melgar, Vedrana Reichenbach, Javier Muñoz, Sònia Tugues, Montse Pauta, Santi Marfà, Denise Oró, Bernardino González, Jon Rodríguez, Jordi Ribera i tots els companys de recerca també moltes gràcies per la seva col·laboració i bona disposició en tot el que fa referència a la tesi i al dia a dia. A la Dra. Vedrana Reichenbach també agrair-li l'ajuda en la modernització de la presentació de la memòria. A l'Esperanza Baltasar vull agrair el seu continu suport.

Als altres companys del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic, que des de l'any 2002 he tingut la sort d'anar coneixent.

Al Dr. Alessandro Sionis i a tots aquells que d'una manera o altra m'han ajudat, encara que el seu nom no figuri en aquestes línies.

Als meus pares, pel seu incomparable exemple, als meus germans i a la Varinia.

