

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, MEDICINA Y CIENCIAS
BIOSANITARIAS

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES DE HIF2 α
EN FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR EN RESPUESTA
A HIPOXIA CRÓNICA**

TERESA ALBENDEA GÓMEZ

DIRECTORA: DRA. SILVIA MARTÍN PUIG

MARZO, 2025, MADRID

*A mis padres y hermana, quienes me dieron las alas para empezar esta
aventura.*

El camino del progreso no es ni rápido ni fácil.

Marie Curie

La ciencia y la vida cotidiana no pueden y no deben estar separadas.

Rosalind Franklin

A veces hay que traspasar la barrera del miedo para ver la belleza que hay al otro lado.

El viaje de Arlo

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the title text.

AGRADECIMIENTOS

¿Quién me iba a decir a mí que lo más difícil de escribir de la tesis fueran precisamente los agradecimientos? La frase: "Te lo dije", resuena en mi cabeza cuando pienso en la aventura que he recorrido durante estos casi 6 años. Miro atrás y veo a mis padres diciendo que algún día sería Doctora y me veo a mí, insistiendo y diciendo: "No voy a hacer el doctorado, no insistáis más, no hay nada que me guste tanto como para dedicar todos esos años investigando una misma cosa". Qué equivocada estaba... Claro que lo había, aunque como todo en la vida, no ha sido un camino fácil. ¿Bonito? Sí, ¿Duro? También. Pero a día de hoy, no me arrepiento para nada de haber tomado la decisión de emprender este viaje y por ese motivo, creo que mi tesis debe comenzar con los agradecimientos, ya que son la base de toda esta experiencia.

En primer lugar, tengo que agradecer a la **Dra. Silvia Martín Puig** por creer en mí cuando le dije que "la cardio" siempre había sido mi sueño desde que era una niña y darme la oportunidad de hacer ese sueño realidad. La temática de la tesis iba a ser bien distinta, pero el destino quiso que finalmente mi proyecto fuera de hipoxia pura, volviendo a tus orígenes, aunque con animales *in vivo*. Gracias por darme las riendas de esta investigación tan bonita, pero que sin duda, nos ha traído más de un quebradero de cabeza. Gracias por enseñarme el valor de las cosas, del tiempo y el conocimiento en el laboratorio y gracias por no dejar que me rindiera aun cuando todo parecía negro. Sin duda, si tengo que quedarme con tan sólo uno de los aprendizajes, es ese, no rendirme. Me diste un arma de doble filo: por un lado, me has enseñado a no tirar la toalla frente a los experimentos, aunque no hayan salido bien a la primera (siempre y cuando tuvieran sentido), obligándome a buscar otros caminos, más complejos, con los que conseguir mis objetivos. Y por otro, me has enseñado a no rendirme frente a mis ideas, a luchar por lo que creo que puede ser bueno para la investigación, lo que en alguna ocasión me hizo llevar a cabo experimentos encubiertos. Claro está que todo lo que he hecho no lo habría conseguido sola, así que por último, te doy las gracias por dejarme formar parte de tu equipo que, aunque pequeño, es el mejor del mundo.

Ese pequeño equipo, durante al menos dos años, lo formábamos mi súper compi **Bea** y yo. Colegui, éramos dos, pero no había nada que no pudiéramos hacer si estábamos juntas. Desde el día de la entrevista sentí que íbamos a hacer buenas migas y no me confundía. Pasaste de ser mi compañera de laboratorio a mi hermana mayor tan rápido que ni siquiera sé cómo pasó. Has estado ahí en los buenos y en los malos momentos dentro y fuera del labo. Me has acompañado en mis risas, mis llantinas y mis locuras, haciendo que todo fuese un poquito más fácil si estabas a mi lado. A ti te debo gran parte de lo que soy hoy en día como científica. Tú has sido mi referente en el día a día del laboratorio durante mucho tiempo y estoy orgullosa de saber que mis manos, son tus manos. Desde el genotipaje o la disección de embriones hasta

las mil técnicas de uso diario para conseguir nuestros objetivos. Gracias por tu paciencia y enseñanzas, que suerte tuve al tenerte como maestra y que suerte tengo de tenerte como amiga.

Otra de las cosas que hiciste, Bea, fue integrarme en la gran familia del CNIC, consiguiendo que desde el minuto 0 me sintiera como en casa, empezando el día con un buen desayuno rodeada de gente maravillosa con el don de cargar la pila más que el café. Así que sí, este apartado va dedicado a mis chicas del desayuno, **Laura, Vane, Roci, Irene, Sofi, MariSu, Bea P, Mari, Gema y Marta**. Gracias por hacer que las 8 sea la hora más esperada de cada mañana durante todos estos años. He disfrutado muchísimo de cada desayuno y cada encuentro dentro y fuera del CNIC.

Y hablando del CNIC... es un centro muy grande, pero sin duda, la mejor zona de todas es la **3N**. Los compañeros que hay aquí no se encuentran en otros lados y aunque la ciencia es muy competitiva, siempre hemos estado ahí los unos con los otros para ayudarnos en cualquier momento. Para empezar, quiero dar las gracias al club de las 7, los más madrugadores, **Javi, Luci y Marcos**, gracias por hacer que estar a las 7 en el CNIC mereciera la pena. En especial, **Javi**, siempre al otro lado de mi pantalla de ordenador con tus camisas Hawaianas, gracias por nuestras conversaciones y nuestras batallas de música Disney vs Eurobeat. Continuando con la 3N, **Sofi**, no te voy a decir nada que no sepas ya, nuestra relación se fue forjando poco a poco, no fue un proceso rápido, pero has llegado a convertirte sin duda, en uno de mis pilares más importantes ahí dentro. Gracias por escucharme en todo momento, por tu ayuda en el labo y por contar conmigo cuando lo has necesitado, eres una gran amiga, ahora y siempre. También quiero dar las gracias al grupo MT, que aunque ahora estáis en la 3S, siempre seréis norteños, por toda vuestra ayuda y hacer que las Puig nos sintiéramos parte de un grupo muy grande. En especial, quiero agradecer a **Vane y Roci** toda vuestra paciencia, cuidados y enseñanzas. Gracias a las Pomperas, **Rebe, Tamara y Brenda**, por nuestras charlas en las lupas. No conozco a personas más dulces que vosotras. Y gracias a **María Galardi**, sin ti el laboratorio sería una pocilga, porque reconocamos que al final, recogemos por no llegar al sitio y ver un mail tuyo sacándonos las vergüenzas. Así que gracias por mantener el orden de la 3N, todos tus consejos y ayuda.

Con el tiempo, el grupo de las SMPs se fue haciendo más grande y también, más patoso y divertido. La primera en agrandar el grupo fue **Susana**, mi patito y pollito por excelencia. Me has hecho pasar tantos grandes momentos que no sabría elegir con cuál quedarme. Espero haber sido un buen referente, he intentado enseñarte todo lo que sé y ha sido un placer ser tu guía en el labo, gracias por ayudarme tanto con mis ratoncillos siempre que lo he necesitado.

Después de una temporada en la que estuvimos las 3 solas, el grupo de las SMPs creció en muy poco tiempo. **Cova**, mi otro patito. Llegaste al labo y pusiste todo patas arriba, qué maneras más distintas de trabajar tenemos y que bien cuadramos. Hacíamos y hacemos muy buen equipo. Estoy segura de que aún nos quedan muchas cosas por vivir juntas. **Sonia**, el huracán del labo. No he visto a nadie hacer tantas cosas a la vez como a ti. Siempre dispuesta a ayudar. Gracias por traer siempre esa sonrisa y tener la frase perfecta en el momento oportuno para levantar el ánimo de cualquiera. **Rosana**, contigo he pasado poco tiempo pero aun así, me has ayudado muchísimo en mi última etapa donde ya me faltaban las fuerzas, muchísimas gracias. Y, por último, gracias a **Diana**, porque, aunque tuviéramos un día malo, llegaba ella al labo y lo iluminaba todo con su sonrisa y su inocencia. Juntas, todas, hemos conseguido hacer grandes cosas.

Claro está que no puedo cerrar el apartado del CNIC sin dar las gracias a las unidades que han hecho posible el desarrollo de mi trabajo. De la unidad de animalario, quiero agradecer en especial a **Merche, Raquel A, Vir y Eva** por mantener mis colonias y facilitarme tanto la vida con las peticiones. De la unidad de microscopía, a todas las chicas que habéis estado siempre pendientes de que las imágenes salieran y en especial a **Vero**, que me facilitó una macro con la que pude ahorrarme tantas horas de cuantificaciones a mano. De la unidad de histología, **Antonio**, gracias por tu gran disposición siempre dentro y fuera del CNIC, y **Claudio**, gracias por amenizar las horas de criostato y microtomo con nuestras conversaciones sobre Marvel, por sacar las inmunos adelante por muy difíciles que fueran y estar tan pendiente de las peticiones. De la unidad de Citometría, quiero agradecer en especial a **Elena**, por involucrarte tanto aunque no nos conociéramos de nada. Desde ese día más allá de las 21 de la noche intentando poner a punto mi muestra, hasta todos los experimentos y dudas que surgieron después. Gracias por preocuparte por mi proyecto como si fuera tuyo y por amenizar las largas horas de sorter. Claro está que toda esta locura de experimentos en el citómetro y el Sorter no habrían sido posibles sin la ayuda, los consejos y las enseñanzas de **Ángel** (del grupo de AH). Gracias por todas las horas que has dedicado a enseñarme, a analizar los datos y corregir los resultados. La frase "Pon un Ángel en tu vida" resuena en nuestro grupo como un mantra. Elena, Ángel, gracias por toda vuestra amabilidad y estar siempre disponibles, sin vosotros esos resultados no habrían sido posibles. Como no, gracias a **Ángel y Jesús**, nuestros chicos de almacén, por facilitarnos tanto la vida con el reparto de pedidos. Y por último, aunque no hemos trabajado mano a mano, quiero agradecer a **Juande, Chemi e Iria** por sacarme una sonrisa cada vez que nos cruzamos por los pasillos, por los desayunos y las conversaciones tan agradables que hemos compartido.

Mi investigación acabó en el IIBM, donde pude compartir un montón de momentos, comidas y cafés junto con **Benilde, Bárbara y Ana**. Muchas gracias por toda vuestra ayuda y compañía, la mudanza no habría sido lo mismo sin vosotras. Y gracias a **Mónica** por la confianza y la alta disponibilidad del equipo de microscopía siempre que ha sido necesario.

Por supuesto, aunque me llevo muchos amigos de esta etapa, sin mis apoyos fuera del ámbito de la investigación no habría podido hacerlo. Gracias a mis **Agapitas**, las mejores amigas que una podría imaginar. Han celebrado mis victorias como si fueran suyas, me han escuchado dando las charlas comentando en paralelo por el grupo de WhatsApp a ver si entre todas conseguían entender algo de lo que contaba y por supuesto, han estado en los malos momentos, dándome su mano en los tropiezos para devolverme al camino. Que suerte la mía teneros. Y gracias a **Ana**, mi super vecina, por todo tu apoyo sobretodo este último año, por nuestros magníficos desayunos y por celebrar cada pasito.

Gracias a mis chicas del gym, **Adela, Emilia, Moni y Jenny** por ayudarme a despejar la cabeza con vuestra gran compañía mientras hacemos tremendos entrenamientos con unos monitores que no solo nos han puesto fuertes, sino que han estado pendientes de todos mis avances, **Mimi y Javi**. Gracias a todos por seguir mis pasos y hacer que las tardes de ejercicio sean tan esperadas. Equipo **SURVIVOR!**

Jorge, mi compañero de viaje, de vida. Desde que recibí aquel correo diciendo que era la elegida para hacer esta tesis, hasta el día de hoy, siempre has estado a mi lado. Darte las gracias se queda corto. Me has visto subir a lo más alto y me has ayudado a salir de lo más profundo. Has creído en mí y siempre has estado convencido de que lo lograría. Gracias por allanarme el camino cuando sólo veía rocas. Sé que esta última etapa ha sido especialmente complicada, pero has estado al pie del cañón en todo momento. Además, nuestra pequeña familia se ha hecho un poquito más grande con la llegada de **Luna y Cleo**, nuestras pequeñas michis que tanta alegría y amor han traído a casa.

Cuando llegaste a mi vida, no viniste solo, agrandaste mi familia con **Loli, Fernando, Miriam y Juako**, que me acogieron en su vida como una hija o hermana más. Además, también agrandaste mi círculo de amistades con **Lore, Quique y Andrés** (mejor no pongo nuestro nombre de grupo) y mis chicas y chicos del grupo de **Pitofloro**. Gracias a todos por estar tan pendiente de mis progresos en esta aventura y escucharme de la mejor manera posible, con un vino en la mano, una buena comida y sobre todo días llenos de risas.

Pero sin duda, todo esto no habría sido posible sin mis personas seguras. **Mamá, papá, tata**, vosotros me animasteis a empezar esta locura y confiasteis en mi cuando ni yo misma lo hacía. Teníais claro que vuestra hija y hermana sería doctora, y aquí estamos. Me habéis apoyado de

manera incondicional, habéis escuchado sin rechistar todas mis aventuras diarias en el labo, mis experimentos, mis avances y tropiezos fuera el día o la hora que fuera. Esta tesis es tanto mía como vuestra. Mis más fieles seguidores, me habéis escuchado tantas veces dar las charlas que estoy segura de que podríais defender esta tesis vosotros mismos. No habría podido hacerlo sin vosotros.

Gracias a mi cuñado **Lalo**, por estar siempre pendiente y tenderme la mano sin preguntar el motivo. Y como no, gracias a mi tía **Amalia** y mis abuelos **Jose, Teresa y Ángel**, por intentar cada día entender en qué trabajaba vuestra nieta y preocuparos por cada pasito que daba. Pero sobre todo, gracias a ti, abuela **Carmen**, por todos tus rezos para que las cosas salieran bien, por nuestras conversaciones en la habitación y las pipas en el salón. Creo que estarías muy orgullosa al verme defender el trabajo con el que he ocupado tantas horas de nuestras conversaciones.

Os quiero muchísimo a todos, no podría tener mejores compañeros de vida.

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the title text.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	7
Índice	15
Resumen	21
Summary	25
Abreviaturas.....	29
Introducción	33
1. Respuesta celular y sistémica a hipoxia	35
1.1 RESPUESTA CELULAR A HIPOXIA	35
1.2 EL CUERPO CAROTÍDEO Y SU IMPLICACIÓN EN LA RESPUESTA SISTÉMICA A HIPOXIA.....	37
1.3 REGULACIÓN DE ERITROCITOS TRAS LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA	39
2. Hipoxia en el sistema cardiovascular	40
2.1 HIPOXIA Y DESARROLLO CARDIACO.....	40
2.2 HIPOXIA Y PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES.....	41
2.2.1. HIPERTENSIÓN PULMONAR E HIPOXIA.....	42
3. Papel de Wt1 en el desarrollo embrionario.....	46
Hipótesis	49
Objetivos	53
1. Analizar el papel de la señalización por HIF2 en el linaje Wt1 pulmonar durante hipoxia crónica.	55
1.1 Caracterizar las poblaciones pulmonares contribuidas por Wt1.....	55
1.2 Valorar las anomalías funcionales en pulmones deficientes en HIF2 en el linaje Wt1 en respuesta hipoxia.....	55
1.3 Determinar las alteraciones estructurales asociadas a la pérdida de HIF2 en el linaje Wt1 de pulmón tras hipoxia crónica.	55
2. Caracterizar la importancia de HIF2 en poblaciones vasculares cardiacas durante la adaptación a bajas tensiones de oxígeno.....	55
2.1 Determinar las poblaciones cardiacas a las que contribuye el linaje Wt1.....	55
2.2 Analizar parámetros funcionales cardiacos en ausencia de HIF2 tras hipoxia crónica.	55
2.3 Definir los cambios estructurales en el corazón de mutantes de HIF2 en el linaje Wt1 en respuesta a hipoxia.	55
3. Investigar el efecto de la eliminación de HIF2 en el cuerpo carotídeo	55
3.1 Caracterizar la contribución de Wt1 al cuerpo carotídeo.	55
3.2 Evaluar las consecuencias de la eliminación de HIF2 en células del cuerpo carotideo contribuidas por Wt1 en respuesta a hipoxia crónica.....	55
4. Explorar la importancia de la señalización por HIF2 en el bazo en respuesta a hipoxia... ..	55
4.1 Analizar la contribución de Wt1 al bazo.	55

4.2	Describir las alteraciones estructurales en bazo deficientes en HIF2 en respuesta a hipoxia crónica.....	55
4.3	Investigar el impacto de la eliminación de HIF2 sobre la población Wt1 ⁺ del bazo en respuesta a bajas tensiones de oxígeno.....	55
	Materiales y Métodos.....	57
1.	Modelos animales.....	59
1.1.	MODELOS ANIMALES Y CONDICIONES DE ESTABILACIÓN	59
1.2.	GENOTIPADO.....	60
1.2.1.	OBTENCIÓN DEL MATERIAL	60
1.2.2.	MARCAJE DE OREJAS PARA RECONOCIMIENTO DE ANIMALES EXPERIMENTALES Y RECOGIDA DE MATERIAL	60
1.2.3.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	60
1.2.4.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	61
1.3.	EXPOSICIÓN A HIPOXIA Y REOXIGENACIÓN.....	61
1.3.1.	PROTOCOLO DE EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA	62
1.3.2.	PROTOCOLO DE REOXIGENACIÓN.....	62
2.	Estudios funcionales	62
2.1.	ECOGRAFÍA CARDIOPULMONAR	62
2.2.	MEDICIÓN DE LAS PRESIONES SISTÓLICAS DEL VENTRÍCULO DERECHO (PSDV)	63
3.	Extracción y procesado de órganos y tejidos	63
3.1.	EXTRACCIÓN DE CARÓTIDAS.....	64
3.2.	EXTRACCIÓN DE CORAZÓN Y PULMONES	64
3.3.	EXTRACCIÓN DE BAZO	65
3.4.	EXTRACCIÓN DE EMBRIONES	65
4.	Técnicas histológicas	66
4.1.	TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA, TRICRÓMICO DE MASSON, PERLS Y α SMA.....	66
4.2.	INMUNOFUORESCENCIA	66
4.2.1.	DESPARAFINACIÓN E HIDRATACIÓN DE CORTES DE PARAFINA	66
4.2.2.	HIDRATACIÓN DE CORTES DE OCT	67
4.2.3.	MARCAJE CON IF Y ADQUISICIÓN DE IMÁGENES	67
5.	Análisis por Citometría de Flujo/FACS	68
5.1.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	68
5.1.1.	CORAZÓN	68
5.1.2.	PULMONES.....	68
5.1.3.	DIGESTIÓN Y MARCAJE DE CORAZÓN Y PULMONES	69
5.1.4.	BAZO.....	69
5.2.	MARCAJE DE POBLACIONES CARDIACAS Y PULMONARES Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	69

5.2.1. PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE CÉLULAS CARDIACAS Y PULMONARES CON BOLAS DE CONTAJE	69
5.2.2. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS CARDIACAS Y PULMONARES Y SORTER	70
5.3 CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS CARDIACAS Y PULMONARES.....	71
5.3.1. OBTENCIÓN DEL PORCENTAJE DE LAS POBLACIONES NO MIOCÍTICAS	71
5.3.2. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS POR GRAMO DE TEJIDO	71
5.4 ANÁLISIS Y REPRESENTACIÓN DE RESULTADOS	71
6. Análisis de imagen	72
6.1 CUANTIFICACIÓN DE ÁREAS	72
6.2 CUANTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS Y/O CÉLULAS ESPECÍFICAS	73
6.3 MONTAJE Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES	73
7. Análisis estadístico y representación gráfica.....	73
Resultados.....	75
1. Papel de Hif2 en el linaje pulmonar Wt1 en homeostasis y tras exposición a hipoxia crónica	77
1.1 ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE WT1 A POBLACIONES PULMONARES.....	77
1.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA PULMONAR DE LOS MUTANTES <i>HIF2/Wt1</i> CKO EN NORMOXIA....	82
1.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA PULMONAR DE LOS MUTANTES <i>HIF2/Wt1</i> CKO EN HIPOXIA	83
1.3.1 LA ELIMINACIÓN DE HIF2 PREVIENE DEL REMODELADO ARTERIAL Y LA ELEVACIÓN DE LA PSVD TRAS LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA.....	84
1.3.2 HIF2 ES NECESARIO PARA EL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DEL PULMÓN DURANTE HIPOXIA	87
1.3.3 LA ESTABILIDAD DEL PARÉNQUIMA Y LA VASCULATURA ALVEOLAR EN RESPUESTA A HIPOXIA DEPENDEN DE LA SEÑALIZACIÓN DE HIF2	90
2. Papel de Hif2 en el linaje cardíaco Wt1 basalmente y en respuesta a hipoxia crónica ...	100
2.1 ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE WT1 A POBLACIONES CARDIACAS.....	100
2.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA CARDIACA DE LOS MUTANTES <i>HIF2/Wt1</i> CKO EN NORMOXIA....	104
2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA CARDIACA DE LOS MUTANTES <i>HIF2/Wt1</i> CKO EN HIPOXIA	105
2.3.1 LA ELIMINACIÓN DE HIF2 PROVOCA DISFUNCIÓN CARDIACA TRAS 2 Y 3 SEMANAS DE HIPOXIA	106
2.3.2 HIF2 PREVIENE EL DESARROLLO DE UNA CARDIOMEGALIA EXCESIVA COMO RESPUESTA ADAPTATIVA DURANTE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA.....	107
2.3.3 LA AUSENCIA DE HIF2 EN EL LINAJE WT1 PRODUCE INESTABILIDAD Y REMODELADO MICROVASCULAR TRAS LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA	110
3. Rescate de alteraciones cardíacas y pulmonares mediante el tratamiento con 1 semana de reoxigenación tras la exposición a hipoxia crónica	119
4. Papel de Hif2 en el linaje Wt1 del cuerpo carotídeo.....	124
4.1 ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE WT1 A POBLACIONES CAROTÍDEAS.....	124
4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL CC EN LOS MUTANTES <i>HIF2/Wt1</i> CKO EN NORMOXIA	127
4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL CC EN MUTANTES <i>HIF2/Wt1</i> CKO EN HIPOXIA.....	128

5. Papel de Hif2 en el linaje de Wt1 del bazo	130
5.1 ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE WT1 A POBLACIONES ESPLÉNICAS	131
5.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL BAZO EN MUTANTES <i>HIF2/WT1</i> CKO EN NORMOXIA	132
5.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL BAZO EN MUTANTES <i>HIF2/WT1</i> CKO EN RESPUESTA A HIPOXIA 134	
Discusión	143
1. Importancia de Hif2 en la progresión de HP más allá de su papel en endotelio.....	145
2. HIF2 es esencial para desencadenar la respuesta celular y sistémica a hipoxia.....	150
3. Relevancia de la señalización de HIF2 para una correcta función de los macrófagos de la pulpa roja tras la exposición a hipoxia	152
4. Implicaciones de la inhibición de HIF2 sistémico.....	154
Conclusiones	155
Referencias	159
Anexos	167

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

RESUMEN

La hipoxia (Hx) está asociada a la aparición de enfermedades cardiovasculares (ECV) como la hipertrofia cardíaca y la hipertensión pulmonar (HP). El cuerpo carotídeo es el órgano encargado de detectar las fluctuaciones en la presión arterial de oxígeno (PO_2) en sangre y desencadenar las respuestas fisiológicas por parte del sistema nervioso simpático para que pueda llevarse a cabo la adaptación a un menor aporte de O_2 . Dentro de las primeras respuestas a Hx se produce la elevación de los niveles de eritropoyetina (EPO) y del factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF), favoreciéndose un aumento en la cantidad de glóbulos rojos en circulación y un mayor número de vasos para incrementar el flujo de O_2 a los tejidos. Además, el bazo, que es un reservorio de sangre, ante una situación de estrés por Hx se contrae, liberando al torrente sanguíneo el 40% del volumen total de eritrocitos. Tanto el aumento de EPO como VEGF están inducidos por HIF2 α . La señalización endotelial de HIF2 interviene en el remodelado de arterias pulmonares y el consiguiente aumento de la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) durante la progresión de HP en respuesta a Hx crónica, lo que ha planteado explorar nuevas oportunidades terapéuticas para esta patología basadas en inhibidores específicos de HIF2. Sin embargo, la relevancia de este factor de transcripción en el desarrollo y progresión de HP más allá de su papel en el endotelio pulmonar, así como su importancia en la adaptación cardíaca a Hx no se han explorado en profundidad.

Las células de linaje Wilms Tumor 1 (Wt1) contribuyen a los compartimentos vasculares del corazón y el pulmón, además de a las células glómicas del cuerpo carotídeo y los fibroblastos que forman el nicho sobre el que se sustentan los macrófagos de la pulpa roja del bazo. En este trabajo, describimos nuevas funciones de HIF2 en respuesta a Hx crónica caracterizando un nuevo modelo de ratón en el que eliminamos HIF2 en el linaje Wt1 (*Hif2/Wt1* cKO). Los ratones *Hif2/Wt1* cKO están protegidos contra el remodelado pulmonar y la elevación de la PSVD inducidos por Hx, pero presentan congestión alveolar, inflamación y hemorragias asociadas con inestabilidad microvascular. Además, la falta de HIF2 en el linaje Wt1 provoca cardiomegalia, remodelado capilar, hipertrofia ventricular, disfunción sistólica y dilatación del ventrículo izquierdo, lo que sugiere que existen funciones cardíacas directas de HIF2, independientes del pulmón en respuesta a Hx crónica. Parte de estos defectos cardiovasculares podrían estar influidos por la disfunción del cuerpo carotídeo que presentan estos ratones en condiciones de Hx, ya que no aumenta de tamaño y presenta una reducción de células sensoras de O_2 tiroxina hidroxilasa⁺. Por último, a los defectos mencionados hay que añadir que el bazo del modelo *Hif2/Wt1* cKO sufre esplenomegalia, aumento de proliferación endotelial e incapacidad de reciclar los eritrocitos senescentes por parte de los macrófagos de la pulpa roja, proceso sumamente importante en este órgano durante la exposición a Hx. Sin embargo, estos defectos estructurales se restauran parcialmente tras un tratamiento de una semana de

reoxigenación, mientras que los parámetros de función cardiopulmonar permanecen ligeramente alterados. Nuestros resultados sugieren que la señalización mediada por HIF2 en células del linaje Wt1 previene la proliferación vascular excesiva en diversos órganos durante la exposición a Hx crónica y permiten definir nuevas funciones protectoras de HIF2 para garantizar la estabilidad de la microvasculatura y la función del corazón, el pulmón y el bazo en condiciones de bajo O₂.

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the word 'SUMMARY'. The stroke is centered and has a slightly irregular, hand-painted appearance with varying shades of red and some white highlights.

SUMMARY

Hypoxia (Hx) is associated with the development of cardiovascular diseases (CVDs) such as cardiac hypertrophy and pulmonary hypertension (PH). The carotid body is the organ responsible for detecting fluctuations in arterial blood O₂ pressure (PO₂) and triggering physiological responses by the sympathetic nervous system in order to adapt to a lower O₂ supply. Among the first responses to Hx is the elevation of erythropoietin (EPO) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, favoring an increase in the number of red blood cells in circulation and a higher number of vessels to increase O₂ flow to the tissues. In addition, the spleen, which is a blood reservoir, contracts under Hx stress, releasing 40% of the total volume of erythrocytes into the bloodstream. Both, the increase in EPO and VEGF are induced by HIF2 α . Endothelial HIF2 signaling is involved in pulmonary artery remodeling and the subsequent increase in the right ventricular systolic pressure (RVSP) during PH progression in response to chronic Hx, which has led to the possibility of exploring new therapeutic opportunities for this pathology based on HIF2 specific inhibitors. However, the relevance of this transcription factor in the development and progression of PH beyond its role in the pulmonary endothelium, as well as its importance in cardiac adaptation to Hx have not been explored in deep.

Wilms Tumor 1 (*Wt1*) lineage contribute to the vascular compartments of the heart and lung and, in addition, to glomus cells of the carotid body and fibroblasts that form the niche that supports macrophages of the red pulp of the spleen. In this work, we describe novel functions of HIF2 in response to chronic Hx by characterizing a new mouse model in which we deleted HIF2 in the *Wt1* lineage (*Hif2/Wt1* cKO). *Hif2/Wt1* cKO mice are protected against Hx-induced lung remodeling and RVSP elevation, but exhibit alveolar congestion, inflammation, and hemorrhages associated with microvascular instability. Furthermore, lack of HIF2 in the *Wt1* lineage causes cardiomegaly, capillary remodeling, ventricular hypertrophy, systolic dysfunction, and left ventricular dilatation, suggesting direct HIF2, lung-independent cardiac functions in response to chronic Hx. Part of these cardiovascular defects could be influenced by the dysfunction of the carotid body displayed by these mice under Hx conditions, as it does not increase in size and shows a reduction of O₂-sensing thyroxine hydroxylase⁺ cells. Finally, in addition to the above-mentioned defects, the spleen of the *Hif2/Wt1* cKO model suffers splenomegaly, increased endothelial proliferation and inability to recycle senescent erythrocytes by red pulp macrophages, an extremely important process in this organ during Hx exposure. However, these structural defects are partially restored after a one-week reoxygenation treatment, while cardiopulmonary function parameters remain altered. Our results suggest that HIF2-mediated signaling in cells of the *Wt1* lineage prevents excessive vascular proliferation in various organs during chronic Hx exposure and allow defining new protective functions of HIF2

to ensure the stability of the microvasculature and the function of the heart, lung and spleen under low O₂ conditions.

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

ABREVIATURAS

CC: cuerpo carotídeo	PDPN: podoplanin
CEs: células endoteliales	PEO: órgano proepicárdico
CM: cardiomiocitos	PHD: prolil hidroxilasa
CMLs: células de la musculatura lisa	PR: pulpa roja
CSPG: proteoglicano condroitín sulfato 4	PSVD: presión sistólica del ventrículo derecho
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol	Rai3: proteína 3 inducible por ácido retinoico
ECV: enfermedades cardiovasculares	RVH: respuesta ventilatoria hipóxica
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica	SIV: septo interventricular
ERG: gen relacionado con ETS	SMA: actina del músculo liso
FACS: separador celular activado por fluorescencia	SPC: proteína surfactante C
FBs: fibroblastos	TM: tricómico de Masson
HP: hipertensión pulmonar	VD: ventrículo derecho
HCT: hematocrito	VHL: proteína Von Hippel-Lindau
HE: hematoxilina-eosina	VI: ventrículo izquierdo
HGB: hemoglobina	WGA: aglutinina de germen de trigo
HIF: factores inducidos por hipoxia	WT: wild type
HRE: elementos de respuesta a hipoxia	Wt1: Wilms Tumor 1
Hx: hipoxia	
IB4: isolectina B4	
IF: inmunofluorescencia	
KO: knockout	
MFA: macrófagos alveolares	
MFs: macrófagos	
MPR: macrófagos de la pulpa roja	
NG2: proteoglicano NG2	
NT: neumocitos	
Nx: normoxia	
O₂: oxígeno	
PB: pulpa blanca	
PCs: pericitos	

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the title text. The stroke is centered and has a slightly irregular, hand-painted appearance with varying shades of red and pink.

INTRODUCCIÓN

1. RESPUESTA CELULAR Y SISTÉMICA A HIPOXIA

Durante el desarrollo, el embrión se forma en un ambiente con bajas tensiones de oxígeno (O_2), o hipóxico. Estas condiciones de hipoxia (Hx) resultan cruciales para la correcta organogénesis del embrión en formación (1), siendo esencial la acción de los factores de transcripción inducidos por hipoxia o HIFs (*Hypoxia Inducible Factors*), ya que animales deficientes tanto en HIF1 (2, 3) como HIF2 (4-6) presentan fenotipos severos de letalidad incompatibles con el desarrollo y homeostasis tisular (7). Los HIFs, son heterodímeros formados por una subunidad α , regulada por O_2 , y una subunidad β , independiente de los niveles de O_2 y que se expresa constitutivamente en las células. A esta subunidad β también se la conoce como ARNT, del inglés, *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (8).

1.1 RESPUESTA CELULAR A HIPOXIA

Si bien los factores HIF son los principales mediadores de la respuesta transcripcional a Hx, existe toda una vía de respuesta coordinada que se inicia con la detección de los niveles celulares de O_2 por parte de los sensores prolin-4-hidroxilasas (PHDs). En condiciones de normoxia (tensiones normales de O_2 , Nx), las PHDs, que son altamente sensibles a la concentración de O_2 , actúan como sensores y reconocen el O_2 del ambiente. En estas condiciones de disponibilidad de O_2 , las PHDs hidroxilan (añaden grupos $-OH$) residuos específicos de prolina de las subunidades HIF α . Estas prolinas hidroxiladas permiten a continuación la unión de la proteína Von Hippel Lindau (VHL), que actúa como componente de reconocimiento de sustrato de un complejo E3 ubiquitina ligasa que va a favorecer la adición de colas de ubiquitina a las subunidades HIF α hidroxiladas y su degradación subsiguiente por el proteasoma. Por este motivo, en condiciones de Nx los HIFs no son activos, ya que las subunidades HIF α se expresan y degradan de manera constitutiva. Sin embargo, en condiciones de Hx, la reducción en la disponibilidad de O_2 limita la actividad de las PHDs, por lo que no se hidroxilan las subunidades HIF α , que escapan al reconocimiento por VHL y posterior degradación por el proteasoma. Así, en Hx las subunidades HIF α se translocan al núcleo, donde heterodimerizan con las subunidades HIF β . Los heterodímeros HIF α /HIF β , se unen a los elementos de respuesta a Hx (HRE, del inglés, *Hypoxia Response Elements*) de sus genes diana, desencadenando una respuesta transcripcional adaptativa a bajos niveles de O_2 (9-13) (**Figura 1**).

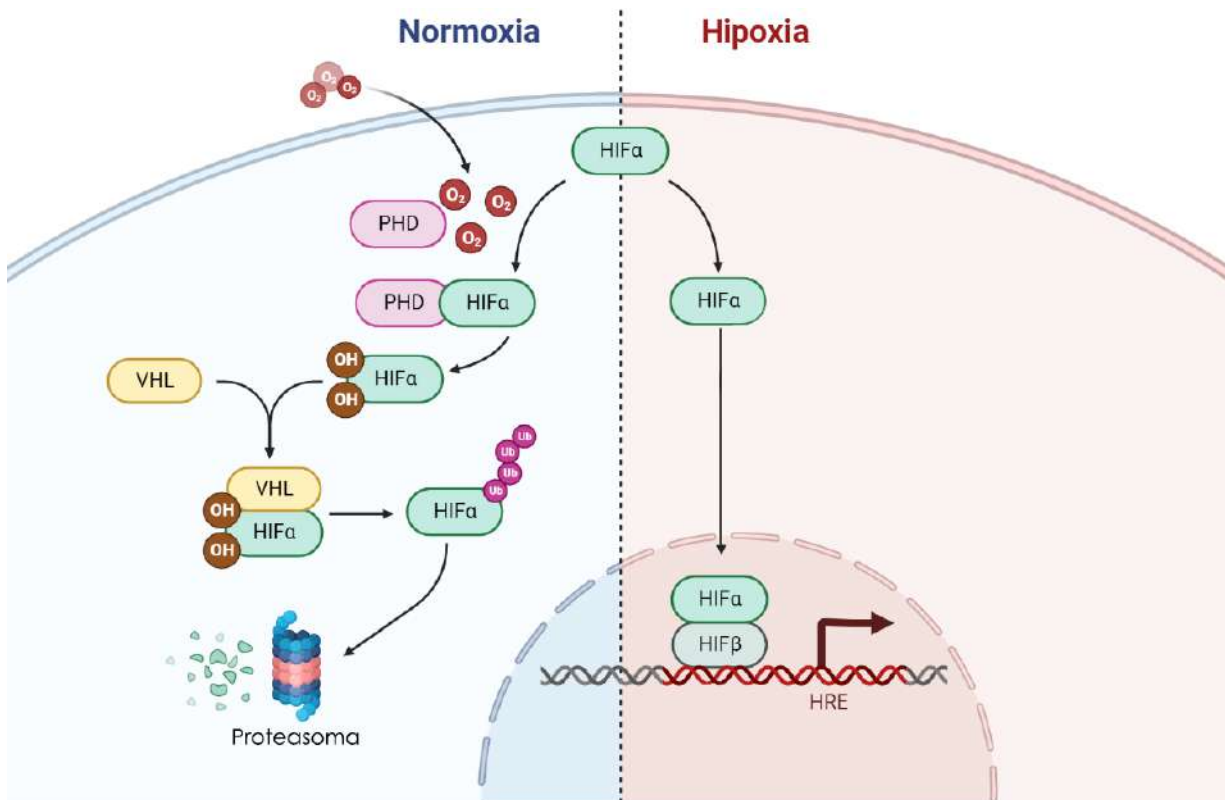


Figura 1. Degradación y activación de HIF. Representación esquemática de la degradación en condiciones de Nx (parte izquierda) de las isoformas HIF α frente a su estabilización y activación de heterodímeros funcionales en condiciones de Hx (parte derecha). En Nx, las subunidades HIF α se hidroxilan por acción de las PHDs en presencia de O₂. Las subunidades HIF α hidroxiladas son reconocidas por la proteína VHL, que favorece la adición de ubiquitinas, lo que conduce a la degradación de subunidades HIF α en el proteasoma. En Hx, las subunidades HIF α escapan de su degradación, heterodimerizan en el núcleo con la subunidad HIF β , reconociendo elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en los promotores de sus genes diana, activando así la respuesta transcripcional a Hx.

Hasta el momento se han descrito 3 subunidades α : HIF1 α , HIF2 α y HIF3 α , aunque las más estudiadas son HIF1 α y HIF2 α (14, 15). Si bien, tanto HIF1 α como HIF2 α se unen a un motivo de unión central idéntico dentro del HRE: 5'-RCGTG-3', tienen genes diana únicos no siempre compensados por la isoforma complementaria. HIF1 α contribuye más a las respuestas transcripcionales inducidas por la Hx aguda, como la glucólisis celular o la liberación de adenosina tras una lesión, mientras que HIF2 α se ha relacionado principalmente con la adaptación a Hx crónica (16) y se ha demostrado que está implicado en la progresión de diferentes tipos de tumores como el carcinoma renal de célula clara (17, 18). En todo caso, ambas isoformas de HIF α participan en la respuesta transcripcional para mejorar el suministro de O₂ de las zonas hipóxicas, aumentando el flujo sanguíneo a la zona afectada.

Se sabe que HIF1 α participa en la activación transcripcional de genes implicados en el metabolismo glucolítico como el transportador de glucosa 1 (GLUT1), la fosfoglicerato kinasa (PGK, del inglés, *phosphoglycerate kinase*), o la lactato deshidrogenasa A (LDHA) (19), que

funcionan coordinadamente para adaptar el metabolismo celular o tisular a la privación de O_2 y la síntesis anaeróbica de ATP independientemente de la mitocondria. Por otro lado, HIF2 α induce la expresión de eritropoyetina (EPO) (20) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés, *vascular endothelial growth factor*), que contribuyen a restaurar el aporte de oxígeno a las zonas hipóxicas, estimulando la producción de eritrocitos que transportan oxígeno en la hemoglobina (por acción de la EPO), así como la formación de nuevos vasos para restablecer el flujo sanguíneo respectivamente (por acción del VEGF).

1.2 EL CUERPO CAROTÍDEO Y SU IMPLICACIÓN EN LA RESPUESTA SISTÉMICA A HIPOXIA

En los mamíferos, la bajada en los niveles de O_2 en el torrente sanguíneo se detecta por el cuerpo carotídeo (CC). El CC es un órgano par de pequeño tamaño situado en la bifurcación de las arterias carótidas (21). A nivel celular es heterogéneo y está formado por varios componentes. Por una parte, las células glómicas o tipo I, que son neuroendocrinas, de tipo nervioso (positivas para la enzima tirosina hidroxilasa, TH⁺) y están organizadas en glomérulos. Estas células son sensibles a los niveles de O_2 , por lo que están en íntimo contacto con capilares y fibras nerviosas. Por otra parte, los glomérulos del CC están rodeados por células sustentaculares, también llamadas células tipo II. Estas células emiten prolongaciones que envuelven a las células tipo I y están en íntimo contacto con ellas. Son de tipo glial, por lo que son GFAP⁺ (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) (**Figura 2**). Además de estas células tipo I y tipo II, el CC está compuesto por una compleja red vascular y nerviosa (22). Este órgano, más concretamente, las células tipo I (TH⁺), son las encargadas de detectar las fluctuaciones en la presión arterial de O_2 (PO₂) en sangre, desencadenando la respuesta ventilatoria hipóxica (RVH) (23) que se ejecuta por la acción del sistema nervioso simpático. Esta respuesta es posible gracias a que las células tipo I, que son células tipo neuronales, poseen en su interior vesículas cargadas de ATP, dopamina y otros neurotransmisores y neuropéptidos que liberan al medio cuando detectan una bajada en la PO₂, aportándole al sistema nervioso la señal para iniciar la RVH (24, 25). El CC, a pesar de ser un órgano neuronal, es muy plástico, teniendo la capacidad de aumentar y disminuir su tamaño en base a las necesidades fisiológicas del cuerpo. Las personas que viven en altitud elevada o los pacientes de hipertensión pulmonar (HP), en general presentan el CC más grande. Esto es debido a que las células tipo I y tipo II establecen entre ellas sinapsis quimioproliferativas, lo cual provoca que en condiciones de Hx crónica, tras la liberación de las vesículas por parte de las células tipo I, una subpoblación de células tipo II que estaban quiescentes, prolifere y se diferencie a células glómicas (tipo I), células endoteliales (CEs) y células de la musculatura lisa (CMLs), generando así un bucle entre ambos tipos celulares (24, 26). Esta respuesta tiene como consecuencia el aumento de tamaño del órgano.

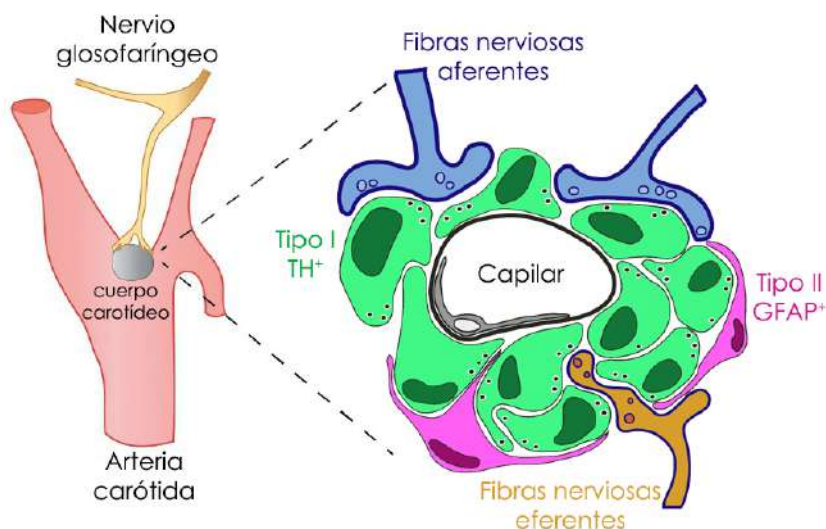


Figura 2. Anatomía esquemática del CC. El cuerpo carotídeo es un órgano pequeño localizado en la bifurcación carotídea. Está compuesto por células tipo I, TH⁺ (verdes) organizadas en glomérulos rodeadas de células tipo II, GFAP⁺ (rosas). Dada la importancia de este órgano para sentir los niveles de PO₂ en sangre, está ricamente vascularizado y en contacto con fibras nerviosas aferentes y eferentes del sistema nervioso simpático. Esquema modificado de Ortega-Saenz P et al. (24).

Entre las respuestas sistémicas a Hx, se produce un aumento de la frecuencia respiratoria y cardíaca, una vasodilatación de las arterias periféricas de las extremidades, y la vasoconstricción local de arterias pulmonares. Sin embargo, a pesar de estas respuestas adaptativas, los efectos a largo plazo de la exposición a Hx crónica son deletéreos y se asocian al desarrollo de diversas patologías como pueden ser las enfermedades cardiovasculares (ECV) que hemos mencionado anteriormente.

Precisamente por la implicación esencial de este órgano en la respuesta sistémica a Hx, se han realizado varios estudios para determinar qué papel juegan las PHDs y las isoformas de los factores HIF α en el comportamiento del CC y su plasticidad. Bishop et al. (23), utilizando modelos de delección heterocigótica para las PHDs, observaron que ratones PHD2^{+/-} tenían una mayor sensibilidad a la RVH tras la exposición a cortos periodos de Hx, aumentando tanto el tamaño del CC como el número de células TH⁺ hasta alcanzar niveles similares a los observados tras una semana de Hx crónica. Más tarde, Hodson et al. (27) observaron que la hipertrofia del CC en respuesta a Hx aguda en ratones heterocigotos PHD2^{+/-} se revertía al hacer una delección combinada de PHD2 y HIF2 α , y además, que la eliminación de HIF2 α resultaba en una disminución de la RVH de estos mutantes. Macías et al. (28), empleando modelos de delección embrionaria tanto de HIF1 α como de HIF2 α en células glómicas (TH⁺), han descrito que sólo en el modelo animal en el que se eliminaba HIF2 α los ratones tenían problemas en el desarrollo del CC, que presentaba un menor tamaño que los controles o los mutantes de delección de HIF1 α , mostrando una densidad de células tipo I muy inferior al resto de modelos. Además, el

mutante TH-HIF2 α -KO, debido al menor contenido de células tipo I, no desencadenaba una correcta RVH tras la exposición a Hx, aunque su función en Nx no se veía afectada. Aunque en este modelo TH-HIF2 α -KO el número y función de las células GFAP⁺ se conservaba intacto, al no ser funcional la población TH⁺, no se observó un aumento de las células glómicas diferenciadas a partir de la subpoblación GFAP⁺ tras la exposición a Hx. Esto se debía a que en ausencia de HIF2, el bucle entre células TH⁺ y GFAP⁺ mencionado anteriormente, en el que la respuesta de células de tipo I desencadena la proliferación y diferenciación de la subpoblación quiescente de células tipo II, no se estaba llevando a cabo. Fielding et al. (29), utilizaron un modelo de ratón con una línea TH-Cre inducible por tamoxifeno para delecionar PHD2, HIF1 α o HIF2 α . Tras 4 semanas de exposición a Hx al 10% O₂ llegaron a conclusiones similares a las mencionadas en el trabajo del grupo del Dr. López-Barneo (28), atribuyendo a HIF2 α , pero no a HIF1 α , el papel directo como principal precursor de la respuesta proliferativa y ventilatoria del CC por parte de las células glómicas tipo I.

1.3 REGULACIÓN DE ERITROCITOS TRAS LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA

Como ya se ha mencionado, una de las respuestas tras la exposición a Hx es el aumento en la producción de EPO por parte del riñón (30, 31) que tiene como consecuencia el incremento en el torrente sanguíneo del número de glóbulos rojos (aumento del hematocrito), lo que favorece la llegada de O₂ a los tejidos y células afectados por Hx. En este sentido, el bazo juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis eritropoyética gracias a su participación en la eliminación y reciclaje de eritrocitos circulantes envejecidos (32, 33), así como por ser uno de los órganos principales donde se da la hematopoyesis extramedular en caso de que la médula ósea no pueda suplir por sí misma la demanda de eritrocitos (34). El bazo está compuesto principalmente por la pulpa roja (PR) y la pulpa blanca (PB). La PR está formada por una red tridimensional de cordones esplénicos y venosos y es en esta pulpa donde se localizan los macrófagos residentes del bazo, que son los encargados del reciclaje de eritrocitos senescentes y dañados del torrente sanguíneo, así como de recuperar el hierro que portan estos eritrocitos en la hemoglobina (33). La PB está compuesta principalmente por linfocitos, tanto B como T, ya que el bazo es el mayor órgano linfoide secundario del cuerpo y el lugar en el que se inicia la respuesta inmunitaria a los antígenos transportados por la sangre (35). La PB se compone a su vez de: la vaina linfoide periarterial, los folículos (donde se localizan principalmente los linfocitos B) y la zona marginal, que es la región intermedia entre los folículos de la PB y la PR y juega un papel crucial en la presentación de antígenos (35). El bazo constituye un importante reservorio de glóbulos rojos, pudiendo albergar entre el 15 y 25% del total del volumen de eritrocitos. En respuesta a Hx aguda, durante la práctica de ejercicio físico o en condiciones de

apnea, el bazo se contrae disminuyendo su volumen y volcando al torrente sanguíneo eritrocitos, siendo el responsable del 40% del aumento de glóbulos rojos en sangre (36). Sin embargo, en respuesta a Hx crónica, el bazo sufre esplenomegalia debida a la hematopoyesis extramedular que se da en la PR para favorecer la formación de nuevos eritrocitos (36).

Los macrófagos de la pulpa roja (MPR) se generan durante la embriogénesis y se mantienen con un aporte mínimo de monocitos (37, 38). El mantenimiento y desarrollo de los MPR depende de señales como el factor estimulante de colonias 1 (del inglés, *colony stimulating factor*, CSF1) (38) producido por los fibroblastos mesenquimales que actúan como su nicho celular. Estos fibroblastos se caracterizan por la expresión diferencial del factor de transcripción Wilms Tumor 1 (Wt1) dentro de las poblaciones de la PR (38). Cuando los MPR reciclan los eritrocitos y el hierro de su interior, se generan en el bazo depósitos de hemosiderina rica en ferritina que se acumulan dentro de la PR.

2. HIPOXIA EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

2.1 HIPOXIA Y DESARROLLO CARDIACO

Durante el desarrollo embrionario el corazón es el primer órgano que se forma y es esencial para el establecimiento de una correcta vasculatura encargada de la distribución de O₂ y nutrientes al resto del organismo (39). La cardiogénesis comienza entorno a día 7,5 del desarrollo embrionario (E7,5) en ratón y es un proceso complejo en el que intervienen distintos tipos de progenitores que proliferan y se diferencian a células especializadas del tejido cardiaco (39, 40) para asegurar una correcta estructura y función del corazón. En este sentido, se ha demostrado que durante la formación del corazón, existen focos de Hx (41) en los que se ha evidenciado el papel esencial de los factores HIFs para una correcta cardiogénesis (7). La isoforma HIF1 α se expresa de manera predominante en el miocardio compacto (42-45), favoreciendo la expresión de genes glucolíticos como GLUT1, PGK o LDHA y permitiendo el establecimiento de compartimentos metabólicos en el miocardio embrionario (44, 45). Sin embargo, aunque HIF1 α juega un papel muy importante durante el desarrollo cardiaco estableciendo estas fronteras metabólicas dentro del miocardio en formación (44, 45), la ausencia de HIF1 α no compromete la correcta cardiogénesis debido a la posibilidad de la activación de programas metabólicos compensatorios basados en el catabolismo de aminoácidos y asociados a la expresión de HIF2 α (44). Sin embargo, la activación sostenida de HIF1 α más allá de E14,5 conduce a la detención del crecimiento celular, el adelgazamiento de las paredes ventriculares, el desprendimiento del epicardio, defectos del tabique interventricular y disfunción cardiaca, causando letalidad embrionaria hacia E17,5 (45, 46) en ratón. En cambio, la función de HIF2 α durante el desarrollo cardiaco sigue siendo poco conocida. La delección

global de HIF2 α afecta a la producción de catecolaminas en el órgano de Zuckerkandl, provocando una bradicardia prominente y disfunción cardíaca (4). No obstante, el fenotipo de los ratones con eliminación global de HIF2 α varía en función del fondo genético (4-6, 47).

Además de la importancia de la respuesta a Hx y los factores HIFs durante la cardiogénesis, éstos no sólo son cruciales para la formación del corazón, sino que también son fundamentales para el correcto desarrollo del pulmón. En el pulmón HIF1 α está implicado en la formación del epitelio bronquial, mientras que HIF2 α se expresa principalmente en el endotelio vascular y en las células alveolares tipo II, desempeñando un papel crucial en la morfogénesis vascular y en la producción de surfactante durante su desarrollo (48, 49).

2.2 HIPOXIA Y PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

Como ya hemos mencionado, la Hx desempeña un papel crucial para una correcta embriogénesis, pero además, es importante remarcar que existe cierto grado de Hx basal en los organismos debido a las diferencias de tensiones de O₂ entre distintos tipos celulares y tejidos. Dependiendo de las localizaciones anatómicas, no todas las células están expuestas a las mismas condiciones ambientales. Por ejemplo, las células del epitelio alveolar que entran en contacto directo con el aire que respiramos, están expuestas al 21% de O₂, mientras que las células del timo están sometidas a condiciones de bajos niveles de O₂, rozando un ambiente hipóxico cercano al 1% de O₂ (50, 51).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los factores de transcripción HIFs son los encargados de modular el metabolismo de oxidativo a glucolítico a nivel celular y tisular dependiendo de la disponibilidad del O₂ en el medio y las necesidades energéticas (19). Además, los factores HIFs participan en restaurar el aporte de O₂ y nutrientes a zonas hipóxicas promoviendo la angiogénesis y la eritropoyesis (20). Sin embargo, la activación sostenida de los factores HIFs también tiene efectos deletéreos, y está asociada a la aparición de múltiples patologías como el cáncer o distintas ECV (52). Mutaciones en HIF α , PHD2 o VHL, resultan en un aumento de HIF1 α y/o HIF2 α en todas las células del organismo, pudiendo dar lugar a episodios tromboembólicos e HP (50, 53, 54), de la cual hablaremos más adelante. Otro ejemplo de patología asociada a la sobreexpresión de HIF α por una exposición prolongada a Hx es la diabetes (síndrome metabólico) ligada a la aterosclerosis. Estas enfermedades se engloban dentro de las ECV, que a día de hoy son las causantes de la muerte de 17,9 millones de personas al año según la OMS (Organización Mundial de la Salud) (55). La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por el engrosamiento de la pared de las arterias debida a la formación de una placa de ateroma. Se ha demostrado que durante la progresión de la diabetes tiene lugar un proceso de disfunción endotelial de las arterias, primer

paso en el desarrollo de aterosclerosis posteriormente (56). El núcleo de las placas de ateroma tiene un ambiente hipóxico en el cual se produce una sobreexpresión de HIF, que a su vez favorece la angiogénesis por sobreproducción de VEGF y la activación de procesos inflamatorios, lo que conduce a la inestabilidad de la placa y aumenta el riesgo de ruptura y liberación al torrente sanguíneo, con el consiguiente peligro de tromboembolismo (56). Otro ejemplo de ECV asociada a Hx es la HP, que a menudo aparece asociada a otras patologías serias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y termina causando insuficiencia cardiaca.

2.2.1. HIPERTENSIÓN PULMONAR E HIPOXIA

La HP es una enfermedad clínica compleja que se categoriza en 5 subtipos dependiendo de la sintomatología y el origen que la causa (57). La HP vinculada a exposición prolongada a Hx o por vivir en regiones de altitud elevada, es la de Clase 3 según la OMS (48, 57). La HP se caracteriza por un aumento significativo del remodelado vascular debido a la proliferación de la capa muscular de las arterias distales del pulmón, lo cual termina obstruyendo la luz de la arteria (58) y produciendo resistencia en el flujo sanguíneo. Esta resistencia vascular provoca la elevación de la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD), que se sobrecarga al recibir sangre del pulmón y puede evolucionar en la aparición de fallo cardiaco derecho y eventualmente causar la muerte (48, 58-61) (**Figura 3**).

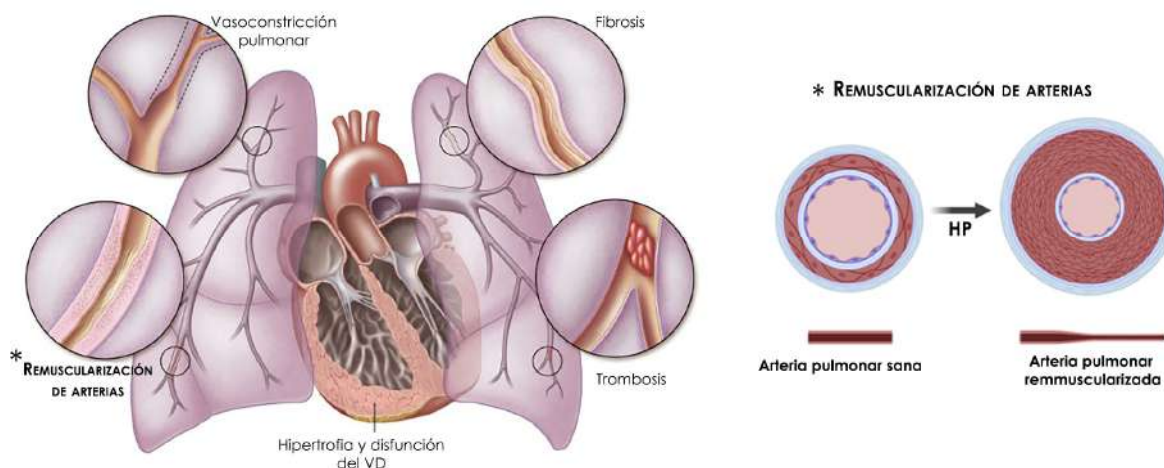


Figura 3. Representación gráfica de la sintomatología de la HP. Dibujo esquemático modificado del *European Respiratory Journal* 2018 (62) sobre la sintomatología asociada a la HP (panel izquierdo). La vasoconstricción pulmonar se debe al remodelado de la capa muscular de las arterias distales del pulmón, reduciendo la luz de la arteria y aumentando la resistencia sobre el ventrículo derecho (VD), lo que causa hipertrofia y disfunción ventricular derecha. En algunos casos más severos, también se dan fibrosis perivascular y trombosis.

Estudios previos han demostrado que esta patología no afecta por igual a los hombres que a las mujeres, siendo más prevalente en mujeres con un ratio de 4,3:1 aproximadamente sobre todas las formas de HP (63). Sin embargo, los hombres con HP suelen tener un peor pronóstico, lo que podría deberse a una posible protección cardiovascular asociada a estrógenos o una

mejor respuesta de las mujeres a los tratamientos actuales (revisado en (64)). Además, numerosos estudios realizados en ratas, ya sea con monocrotalina (alcaloide de pirrolizidina que se activa metabólicamente en el hígado y se utiliza en investigación para inducir HP y síndrome de dificultad respiratoria con fenotipos semejantes a la patología humana) (65) o con Hx crónica, también han descrito algunos efectos del sexo en la aparición y progresión de la HP (66). Sin embargo, nuestro conocimiento sobre el impacto del sexo en el establecimiento de modelos de ratón de HP es limitado. Por un lado, varias investigaciones en ratones sugieren que los estrógenos podrían potenciar el remodelado vascular al influir en la capacidad proliferativa de las CML arteriales pulmonares (67). Sin embargo, los estrógenos parecen desempeñar un papel cardioprotector, ya que la terapia estrogénica puede revertir defectos avanzados de la HP como la hipertrofia desadaptativa y la disfunción del ventrículo derecho (VD) (68, 69).

Se ha demostrado que HIF2 α es la principal isoforma implicada en la aparición y progresión de HP. En concreto, numerosos estudios con modelos animales de ratón donde la eliminación de HIF2 α se hace de manera específica en células endoteliales (CEs) han permitido concluir que la señalización de HIF2 α en el endotelio es la que promueve la progresión de la HP. En 2016 se publicaron 3 artículos de gran impacto en el campo a favor de esta idea. Kapitsinou PP et al. (60), analizaron el papel de la sobreexpresión tanto de HIF1 α como de HIF2 α en CEs utilizando dos aproximaciones experimentales. Por una parte, mediante la generación de diferentes modelos de delección utilizando el sistema Cre-loxP, emplearon la línea *VE-cadherina-Cre (Cdh5-Cre)* para eliminar PHD2 solo, o PHD2 simultáneamente con HIF1 α o HIF2 α . Analizando estos 3 modelos observaron que sólo en los ratones en los que había sobreexpresión de HIF2 α se inducía un fenotipo de HP con remodelado vascular de las arteriolas pulmonares y elevación de la PSVD. Por otro lado, estos autores generaron un cuarto modelo animal en el que sólo eliminaron HIF2 α con la línea *VE-cadherina-Cre (Cdh5-Cre)* para analizar el papel de HIF2 α sin un fondo genético en el que no hubiera delección de PHD2. Estos ratones deficientes en HIF2 α en CEs y sus hermanos de camada sin Cre (controles) se expusieron a 4 semanas de Hx crónica al 10% de O₂. Estos experimentos evidenciaron que sólo en los controles con HIF2 intacto se producía un remodelado vascular de las arterias pulmonares que resultaba en un incremento del número de arteriolas remuscularizadas, dando lugar a un aumento de la PSVD, mientras que los ratones deficientes en HIF2 α en endotelio no mostraron ningún signo de HP tras la exposición a Hx. Al mismo tiempo, Dai Z et al. (61), partiendo de la misma premisa sobre el papel de la PHD2 y las isoformas HIF1 α y HIF2 α en el desarrollo de la HP, generaron 3 nuevos modelos animales utilizando otra línea Cre de endotelio, *Tie2-Cre*: un Knock Out (KO) simple

de *Egln1* (gen que codifica PHD2) y dos KOs dobles combinando *Egln1* con HIF1 α o HIF2 α . La caracterización de estos modelos reveló que la eliminación simple de *Egln1* en CEs era suficiente para desencadenar las alteraciones compatibles con el desarrollo de HP que incluían el remodelado de las arterias pulmonares, hipertrofia del VD y aumento de la PSVD, vinculando directamente la sobreexpresión de HIF α con los cambios observados. Para discernir si el fenotipo patológico era consecuencia de la activación de ambas isoformas de HIF α o sólo de una en particular, utilizaron los modelos dobles. Con los dobles KOs, concluyeron que la isoforma HIF2 α era la única responsable del fenotipo de HP originado por la delección de PHD2, ya que sólo con el doble mutante *Egln1/HIF2 α /Tie2Cre* no se desarrolló la patología. Por último, Cowburn AS et al. (59), en base a los estudios previos que demostraban que la Hx inducía HP (70, 71) y que los modelos hemicingotos tanto para HIF1 α como para HIF2 α atenuaban los defectos producidos por la HP (72, 73), quisieron explorar el papel de ambas isoformas específicamente en el endotelio pulmonar tras la exposición a Hx crónica. Para ello, utilizaron una línea Cre específica de endotelio pulmonar Alk1-Cre (L1-Cre), generando dos modelos KOs, uno con cada isoforma de HIF α . La exposición a Hx crónica al 10% O₂ durante 3 semanas de estos modelos reveló que sólo el mutante *HIF2 α /L1Cre* KO no desarrollaba HP, teniendo valores similares de PSVD que animales control en condiciones de Nx, mientras que los controles en Hx y el modelo *HIF1 α /L1Cre* KO desarrollaban el remodelado vascular por muscularización de arterias en el pulmón, así como fibrosis y aumento de la PSVD típicos de HP (59). En conjunto, estos trabajos demostraron que la eliminación de HIF2 α en endotelio protege de la aparición de alteraciones vasculares asociadas al remodelado vascular y elevación de presión en el lado derecho del corazón, lo cual ha promovido el estudio de nuevas terapias alternativas basadas en el uso de inhibidores selectivos de HIF2 como el belzutifan (PT2977) para el tratamiento de la HP (74, 75).

Trabajos más recientes describen la relevancia que tiene la señalización de HIF en células murales durante la remuscularización de las arterias distales del pulmón. En este caso, se ha observado que la eliminación de HIF1 α en las CMLs utilizando la línea Cre inducible Myh11-CreERT2, atenúa la remuscularización de las arteriolas durante la progresión de HP (76). El proceso de remuscularización como consecuencia de la exposición a Hx comienza con la sobreexpresión de PDGF β (factor de crecimiento derivado de plaquetas β , del inglés, *Platelet Derived Growth Factor β*) en el pulmón. Esto produce la migración de células progenitoras que expresan el factor de pluripotencia KLF4 (del inglés, *Kruppel-like factor 4*) a la zona distal de las arteriolas, donde proliferan y se diferencian dando lugar a CMLs patológicas (58, 77). Sin embargo, la eliminación de HIF1 α en células PDGFR- β ⁺ (células que expresan el receptor de PDGF β) con una Cre inducible, previene en cierta manera la expansión de CMLs sobre las

arteriolas del pulmón (58), atenuando la progresión de HP y la subida de la PSVD. Por otro lado, en un estudio posterior llevado a cabo por Tang H et al. (78), se describió que la eliminación de HIF2 α en las CMLs no prevenía el desarrollo de HP, al contrario de lo que ocurre cuando la eliminación de esta isoforma se hace en el endotelio como se ha mencionado anteriormente en esta sección. Por último, recientemente se ha publicado un nuevo trabajo llevado a cabo por Kim et al. (79), en el que eliminan HIF2 α en pericitos (PCs), células íntimamente unidas a las CEs y que son esenciales para su correcta función, homeostasis e integridad (79, 80), regulando la contractibilidad de los capilares y por tanto, el flujo sanguíneo (80, 81). Además de su importancia sobre el endotelio, los PCs son células que tienen la capacidad de diferenciarse a CMLs en caso de daño o estrés (como la exposición a Hx) (79). Para la eliminación específica de HIF2 α en estas células en este trabajo utilizaron una línea Cre inducible con expresión en PCs: NG2-Cre-ER. Al contrario de los resultados descritos en los estudios previos en los que HIF2 se deletaba en el endotelio (59-61), lo que observaron Kim et al. (79) fue que los ratones deficientes en HIF2 α en PCs seguían presentando una elevación en la PSVD y remuscularización de las arteriolas distales similar a la de los ratones control tras 3 semanas de exposición a Hx crónica al 10% de O₂. Estos resultados sugieren que, en contraste con su papel fundamental en el endotelio, la señalización mediada por HIF2 α en PCs no desempeña una función crítica en la progresión de HP, aunque hasta el momento, es el único trabajo que explora la importancia de HIF2 en este tipo celular.

Además, en el trabajo del grupo del Dr. López Barneo sobre el papel de HIF2 en el CC detallado en el apartado anterior (28), se describe que en el modelo de delección condicional de HIF2 α en las células TH⁺ los ratones KO desarrollaban HP con remuscularización de las arterias y elevación de la PSVD tras ser sometidos a 3 semanas de Hx crónica. Estos resultados respaldan la idea de que la progresión del fenotipo de HP en respuesta a largos tiempos de Hx depende de la señalización de HIF2 α en el endotelio y no en otros tipos celulares, a pesar del papel fundamental de HIF2 en células glómicas del CC para una correcta adaptación a la Hx (28).

Sin embargo, hasta la fecha no se han desarrollado modelos animales en los que se realice una delección de HIF2 α en varios tipos celulares dentro del entorno vascular, lo que ofrecería una visión más sistémica en cuanto a la aparición y progresión de HP en pacientes con EPOC o que vivan en lugares de altitud elevada, y facilitaría su manejo clínico y posible tratamiento.

Precisamente por la participación de HIF2 α en la progresión de HP, se han desarrollado numerosos estudios sobre poblaciones que viven a gran altitud, como los tibetanos, que están expuestos a un ambiente hipóxico durante toda su vida. Sin embargo, muchos de ellos no llegan a desarrollar nunca ninguna patología asociada a la Hx, como policitemia por aumento de la

viscosidad de la sangre debida a la mayor producción de glóbulos rojos tras un incremento en la expresión de EPO, o HP y fallo cardiaco por el remodelado vascular de arterias distales y aumento de la PSVD (53). Esto es debido a que estas poblaciones, que generación tras generación conviven con la Hx de manera directa y que suelen ser muy endogámicas, han desarrollado mutaciones específicas en el gen que codifica para la isoforma HIF2 α de modo que no sea tan activa, protegiéndoles de los efectos negativos que pudiese generarles la exposición a Hx crónica en la que viven (53).

3. PAPEL DE Wt1 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Como se ha mencionado anteriormente, durante la cardiogénesis intervienen distintos progenitores cardiovasculares que proliferan y se diferencian en células especializadas del corazón. Se han identificado tres tipos de progenitores cardiacos con distinta localización espacial y contribución temporal a la formación de este órgano. Estos tres tipos de progenitores son: los progenitores mesodérmicos, los progenitores epicárdicos y los progenitores cardiacos de la cresta neural (40).

Los progenitores mesodérmicos cardiacos contribuyen a la mayor parte de las células que componen el corazón, dando lugar a las aurículas, al miocardio de los ventrículos y el tracto de salida. Además, también se diferencian a las células que conforman el endocardio (capa de células que recubre la luz de los ventrículos), el sistema de conducción y los cojines aórtico y pulmonar (39). Los progenitores epicárdicos tienen también origen mesodérmico y se originan a partir del órgano proepicárdico (PEO, del inglés, *proepicardial organ*), dando lugar al epicardio (capa celular más externa que recubre el corazón), fibroblastos intersticiales del miocardio y a las capas de CMLs y CEs de las arterias coronarias (39, 82, 83). Por último, los progenitores de la cresta neural contribuyen a las CMLs de la región distal del tracto de salida que permiten separar la aorta del tronco pulmonar, así como al sistema nervioso autónomo del corazón (39, 84).

Aunque el corazón empieza a formarse a día E7,5 en ratón, las células progenitoras del epicardio no empiezan a migrar desde el PEO para recubrir el miocardio y comenzar su diferenciación hasta día E9,5. Aunque se ha descrito una heterogeneidad dentro de los progenitores del epicardio en función de los marcadores que expresan y los tipos celulares a los que contribuyen, uno de los progenitores epicárdicos más estudiados se caracteriza por la expresión de Wt1 (39). Wt1, es un factor de transcripción importante en la cardiogénesis y los ratones deficientes para Wt1 presentan defectos cardiacos (85) y pulmonares (86) severos, haciendo que los embriones homocigotos con la delección de Wt1 mueran en estadio E12-E14 de gestación (85). Estos ratones con delección de Wt1, presentan adelgazamiento del miocardio ventricular, edema y

hemorragia pericárdica, dando lugar a problemas de insuficiencia cardíaca (85). Además, los pulmones muestran una disposición y forma de los lóbulos pulmonares anómala, con morfología redondeada y fusión entre ellos. Estos defectos se suman a una cavidad pleural reducida, así como a la comunicación con la cavidad peritoneal debido a defectos en el diafragma (86).

Wt1 juega un papel fundamental en la transición epitelio-mesénquima de las células que lo expresan y que, en el caso de progenitores Wt1, dan lugar a las células del epicardio, fibroblastos intersticiales y la vasculatura (82, 87, 88), así como a una pequeña porción de cardiomiocitos (89, 90) (**Figura 4**).

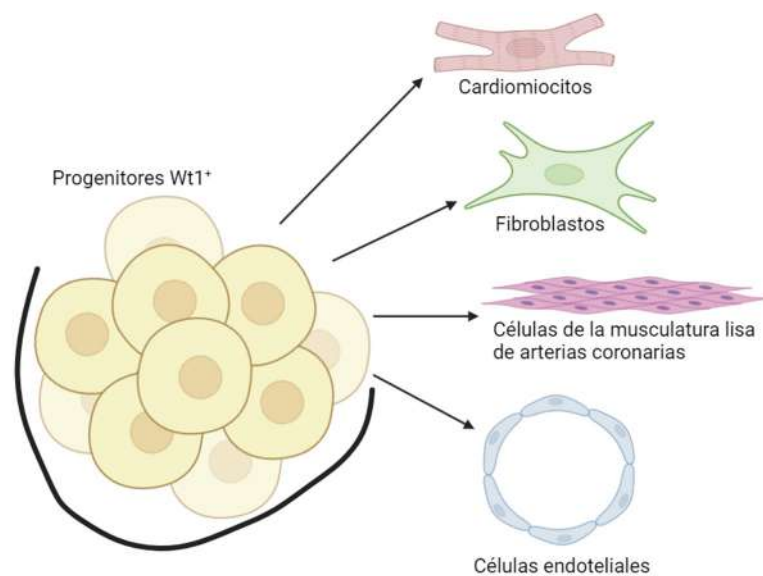


Figura 4. Potencialidad de progenitores epicárdicos Wt1⁺. Esquema representativo de las células a las que se diferencian los progenitores Wt1⁺ durante la cardiogénesis.

Además de su papel fundamental en el corazón por su acción en progenitores epicárdicos, Wt1 se expresa en otros tipos celulares derivados del mesoderma. En el pulmón, Wt1 contribuye al mesénquima pulmonar que forma las CMLs de los vasos y los bronquios, el cartílago de la tráquea y parte del endotelio de las arterias, así como a los fibroblastos (FBs) del parénquima alveolar (86). Además, se ha descrito que Wt1 no sólo es importante para la correcta formación del corazón y los pulmones, sino que también contribuye a todas las membranas que recubren la cavidad celómica, incluyendo el bazo, el hígado, el estómago y el intestino, siendo también esencial para el correcto desarrollo y homeostasis de los riñones y el sistema urogenital (91). Sin embargo, no es solo un factor de transcripción exclusivo de la etapa embrionaria, Wt1 es esencial en la edad adulta para mantener una correcta homeostasis y se expresa en CEs no coronarias de la microvasculatura (capilares) (92). Asimismo, tal y como se ha descrito en el

apartado 1.2, Wt1 es esencial para un correcto funcionamiento de los fibroblastos secretores de CSF1 en el bazo que proporcionan el nicho celular sobre el que se sustentan los MPR (38).

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

HIPÓTESIS

HIF2 participa de manera fundamental en la adaptación sistémica a hipoxia crónica. Por una parte, se sabe que HIF2 en el pulmón juega un papel esencial en el remodelado de arterias pulmonares por su señalización a nivel de endotelio arterial, interviniendo en el desarrollo y progresión de la HP, si bien en este remodelado intervienen además CLMs, PCs e incluso, FBs intersticiales. En virtud de la implicación de HIF2 en el remodelado arterial se ha propuesto el uso de nuevos inhibidores específicos como terapia alternativa de la HP en base a su efectividad demostrada para tratamiento del carcinoma renal de células claras. Por otro lado, a nivel de cuerpo carotídeo, órgano encargado de sensar el oxígeno en sangre, HIF2 es necesario para el correcto funcionamiento de las células tipo I, encargadas de activar la respuesta ventilatoria a hipoxia. Además, HIF2 regula la expresión de EPO incrementando sus niveles en hipoxia crónica, lo que resulta en un aumento del hematocrito, que contribuye a la esplenomegalia del bazo por activación de hematopoyesis extramedular. Sin embargo, el papel de HIF2 en el corazón tras periodos prolongados de hipoxia no se ha estudiado en profundidad.

Wt1 se expresa en progenitores mesodérmicos que contribuyen a diferentes estructuras y poblaciones vasculares, siendo fundamental para el correcto desarrollo del corazón y los pulmones. Además, contribuye a recubrir la cavidad celómica de diferentes órganos como el bazo, el hígado, el estómago, el intestino, los riñones y el sistema urogenital. Sin embargo, la contribución específica en órganos como el pulmón, el corazón o el cuerpo carotídeo en etapas adultas no se conoce en detalle. Por el contrario, en el bazo se ha descrito que Wt1 se expresa en fibroblastos que actúan como nicho y aseguran el mantenimiento de los macrófagos de la pulpa roja, aunque no se conoce el papel de HIF2 en esta población durante hipoxia crónica.

Partiendo de estas evidencias, proponemos las siguientes hipótesis:

- 1.** HIF2 podría desempeñar funciones importantes durante la adaptación a hipoxia crónica en otros tipos celulares más allá del endotelio pulmonar, así como jugar un papel esencial en la vasculatura cardiaca en condiciones de bajo oxígeno. Asimismo, la caracterización de un modelo de delección genética de HIF2 simultáneo en varias poblaciones dentro del compartimento vascular podría contribuir a describir su importancia en la adaptación del sistema cardiopulmonar a hipoxia y anticipar posibles efectos adversos tras la administración de inhibidores sistémicos de HIF2.
- 2.** Dada la contribución de Wt1 a varios linajes celulares en diversos órganos implicados en la respuesta a hipoxia, y el papel fundamental de HIF2 en condiciones de bajo oxígeno, el estudio de un nuevo modelo de delección de HIF2 en este linaje nos permitirá investigar nuevas funciones de HIF2 en la adaptación a hipoxia crónica de algunos de estos órganos como el cuerpo carotideo o el bazo.

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

OBJETIVOS

El objetivo general de nuestra investigación es evaluar la importancia de la señalización de HIF2 durante el desarrollo de la vasculatura coronaria derivada de progenitores epicárdicos Wt1, así como determinar el papel de HIF2 más allá del endotelio pulmonar durante la adaptación sistémica a bajas tensiones de oxígeno. Los objetivos específicos son:

1. ANALIZAR EL PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN POR HIF2 EN EL LINAJE Wt1 PULMONAR DURANTE HIPOXIA CRÓNICA

- 1.1 Caracterizar las poblaciones pulmonares contribuidas por Wt1.
- 1.2 Valorar las anomalías funcionales en pulmones deficientes en HIF2 en el linaje Wt1 en respuesta hipoxia.
- 1.3 Determinar las alteraciones estructurales asociadas a la pérdida de HIF2 en el linaje Wt1 de pulmón tras hipoxia crónica.

2. CARACTERIZAR LA IMPORTANCIA DE HIF2 EN POBLACIONES VASCULARES CARDIACAS DURANTE LA ADAPTACIÓN A BAJAS TENSIONES DE OXÍGENO

- 2.1 Determinar las poblaciones cardiacas a las que contribuye el linaje Wt1.
- 2.2 Analizar parámetros funcionales cardiacos en ausencia de HIF2 tras hipoxia crónica.
- 2.3 Definir los cambios estructurales en el corazón de mutantes de HIF2 en el linaje Wt1 en respuesta a hipoxia.

3. INVESTIGAR EL EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE HIF2 EN EL CUERPO CAROTÍDEO

- 3.1 Caracterizar la contribución de Wt1 al cuerpo carotídeo.
- 3.2 Evaluar las consecuencias de la eliminación de HIF2 en células del cuerpo carotideo contribuidas por Wt1 en respuesta a hipoxia crónica.

4. EXPLORAR LA IMPORTANCIA DE LA SEÑALIZACIÓN POR HIF2 EN EL BAZO EN RESPUESTA A HIPOXIA

- 4.1 Analizar la contribución de Wt1 al bazo.
- 4.2 Describir las alteraciones estructurales en bazos deficientes en HIF2 en respuesta a hipoxia crónica.
- 4.3 Investigar el impacto de la eliminación de HIF2 sobre la población Wt1⁺ del bazo en respuesta a bajas tensiones de oxígeno.

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELOS ANIMALES

1.1. MODELOS ANIMALES Y CONDICIONES DE ESTABILIZACIÓN

En este trabajo de tesis se han utilizado diferentes líneas de ratones modificados genéticamente previamente descritas y de nueva creación. Los animales *HIF2^{flox/flox}* (Epas1^{tm1Mcs}/J, stock #008407), con el exón 2 del gen que codifica para *Hif2 α* flanqueado con sitios LoxP (93) y Rosa-tdTomato, en este estudio denominado *Tomato^{flox/flox}*, (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}/J, stock #007914) fueron obtenidos en laboratorios Jackson y mantenidos en fondo genético C57BL/6 y en homocigosis durante todo el estudio. Estos ratones en homocigosis fueron cruzados con ratones portadores de la Cre recombinasa bajo el control de *Wt1* en heterocigosis cedidos por el Dr. Jose Luis De La Pompa (83) para generar nuestras nuevas líneas de ratones modificados: 1) controles (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*), 2) mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*HIF2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*), 3) reporteros control (*Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}* [Rosa26-tdTomato/*Wt1-Cre*]) y 4) reporteros mutantes (*HIF2^{flox/flox}-Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}* [HIF2^{flox}-Rosa26-tdTomato/*Wt1Cre*]). Al estar la línea Cre en heterocigosis y los alelos de estudio en homocigosis, los ratones resultantes de los cruces entre homocigotos para HIF2 o Tomato sin Cre, con ratones homocigotos para HIF2 o Tomato con *Wt1-Cre* en heterocigosis, el % esperado de animales con y sin Cre es del 50%, pudiendo utilizar ratones mutantes y controles hermanos de camada para los análisis de esta tesis. Como no se observaron diferencias en las manifestaciones fenotípicas entre machos y hembras *Hif2/Wt1* cKO, utilizamos ambos sexos para todos los experimentos y estrategias de cruce.

Los ratones Ng2-DsRed (Tg(Cspg4-DsRed.T1)1Akik/J, stock #008241), utilizados únicamente en un experimento de este trabajo, fueron cedidos por la Dra. Henar Cuervo, que los adquirió de Laboratorios Jackson (94).

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (del inglés, SPF, *Specific pathogen free*) en el animalario del CNIC. El bienestar de los animales utilizados para experimentación de este trabajo y otros fines científicos se ajustó a la Directiva 2010/63UE de la UE y a la Recomendación 2007/526/CE, aplicadas en la legislación española en virtud del Real Decreto 53/2013. Los experimentos con ratones fueron autorizados por la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid y por el Comité Ético de Experimentación Animal del CNIC con número de referencia: PROEX 267/19.

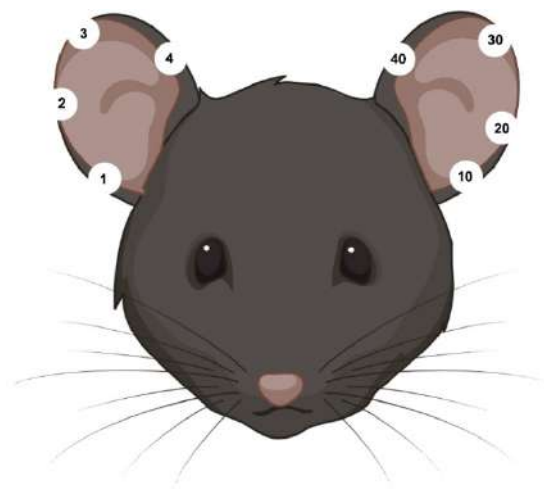
1.2 GENOTIPADO

1.2.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL

Para el genotipado de los ratones adultos y neonatos se utilizó el extremo final de la cola, cortado con cauterizador hemostático, al destete (3 semanas de edad). En el caso de los adultos, también se emplearon los fragmentos de oreja obtenidos con una troqueladora tras el marcaje numérico para su posterior reconocimiento y seguimiento. En el caso de los embriones, se utilizó la colita entera.

1.2.2 MARCAJE DE OREJAS PARA RECONOCIMIENTO DE ANIMALES EXPERIMENTALES Y RECOGIDA DE MATERIAL

Para poder hacer el seguimiento experimental a los ratones, dado que en cada cubeta, por su tamaño y disposición, se pueden alojar hasta 5 animales, todos los ratones tienen que estar bien identificados. Para ello, en el animalario del CNIC, lugar de estabulación de los animales de esta tesis, se utiliza el método numérico, troquelando en las orejas derechas las unidades y en las izquierdas las decenas (tal y como se muestra en el esquema) sirviendo este sistema como método de identificación de animales y recogida de biopsias para su genotipaje. Con este sistema de perforaciones se pueden marcar del 0 al 99, siendo 0 la ausencia total de agujeros y del 5 al 9 una combinación de ellos: $5 = 4 + 1$; $6 = 4 + 2$; $7 = 4 + 3$; $8 = 4 + 3 + 1$ y $9 = 4 + 3 + 2$. Esto mismo se aplica a las decenas.



Esquema sobre el marcaje de animales. Representación gráfica explicativa del marcaje de orejas en ratones adultos.

1.2.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Para las biopsias de ratones adultos, ya fuesen colitas o fragmentos de orejas, los tejidos se incubaron en tubos eppendorf de 1,5mL en agitación (Digital shaking Drybath, 88880028, Thermo Scientific) entre 3h y toda la noche (ON, del inglés, *over night*) a 55°C en un volumen de 600µL de buffer de lisis (100mM Tris-HCl pH=8.5, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl) con 4µL de proteinasa K (3115879001, Sigma-Aldrich) a 20µg/µL. Una vez disuelto el tejido, se añadieron otros 600µL de isopropanol frío, previamente guardado a -20°C (67-63-0, Fisher Scientific), se agitaron los tubos para que la mezcla resultante se homogeneizase y se centrifugaron a máxima potencia, a 4°C durante 20 minutos. Una vez centrifugado, se descartó el sobrenadante de los tubos y se dejó secar el *pellet* resultante para conseguir la mayor

evaporación de isopropanol posible. Por último, se añadieron 100µL de agua destilada a cada tubo para Resuspender el ADN.

1.2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción PCR para conocer el genotipo de los ratones se hizo en un volumen final de 20µL. De manera general, para cada muestra se necesitaban 10µL de la mezcla comercial de la polimerasa para PCR (K1082, Thermo Scientific), 1µL de oligo *Forward* (a una concentración de 10µM), 1µL de oligo *Reverse* (a una concentración de 10µM) (Sigma-Aldrich; IDT, Integrated DNA Technologies), 1µL del ADN extraído y agua destilada hasta completar los 20µL del volumen final. Sin embargo, los alelos tanto de HIF2 como de Tomato tienen alguna peculiaridad: 1) A la mezcla para genotipar *Hif2* hay que añadirle, aparte de lo demás, 1µL de DMSO (D8418-50mL, Sigma Aldrich). 2) La mezcla de Tomato lleva 4 oligos distintos en vez de 2.

Una vez obtenidas las mezclas, las PCR se llevaron a cabo en termocicladores (SimpliAmp™ Thermal Cycler, applied biosystems). El resultado de las reacciones se analizó mediante el sistema de electroforesis sobre geles de agarosa. Los detalles de las secuencias de los oligos en dirección 5' → 3', las condiciones de los programas de los termocicladores para cada alelo y las concentraciones de agarosa para la electroforesis se detallan a continuación en la **tabla 1**.

	Wt1	Hif2	Tomato
Oligo (Fw)	TGACGGTGGGAGAATGTTA AT	GAGAGCAGCTTCTCCTGG AA	WT: AAGGGAGCTGCAGT GGAGTA Mut: AAGGGAGCTGCAGT GGAGTA
Oligo (Rv)	GCCGTAAATCAATCGATGA GT	TGTAGGCAAGGAAACCAA GG	WT: CCGAAAATCTGTGG GAAGTC Mut: CTGTTCTGTACGGC ATGG
Programa	1x 94° 3', 30x (94° 30", 56° 30", 72° 1'), 1x 72° 5', mantener a 4°	1x 95° 5', 35x (95° 30", 57° 1', 72° 1'), 1x 72° 7', mantener a 4°	1x 94° 5', 35x (94° 30", 61° 30", 72° 30"), 1x 72° 5', mantener a 12°
% gel agarosa	1,50%	3%	3%
Productos	Peso banda Cre: 286pb	Peso banda Floxed: 220pb Peso banda WT: 180pb	Peso banda Floxed: 196pb Peso banda WT: 297pb

Tabla 1. Genotipado. Descripción detallada de la secuencia de oligonucleótidos, programas, concentración de agarosa y productos obtenidos para cada alelo y PCR.

1.3 EXPOSICIÓN A HIPOXIA Y REOXIGENACIÓN

Para los dos protocolos de Hx que se llevan a cabo en esta tesis, se utilizó una cámara de Coylab (*O2 Control InVivo Glove Box*) con guantes para una persona que permiten el manejo

de los ratones sin necesidad de reoxigenación y con una potencia de 220v. Además, esta cámara estaba equipada con un sistema de control de oxígeno (O₂) programado al 10%, un regulador de gas nitrógeno y un sistema de filtración animal.

1.3.1 PROTOCOLO DE EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA

Los ratones adultos con 12 semanas de edad (no más de 20 ratones en el mismo estudio: 5 por cubeta y un máximo de 4 cubetas simultáneamente) se introdujeron en la cámara al 10% de O₂ para permanecer en ella de manera ininterrumpida durante 2 o 3 semanas dependiendo del grupo experimental al que perteneciesen. Transcurridas las semanas de exposición a Hx, los animales eran o bien analizados por ecografía y después eutanasiados o directamente eutanasiados siguiendo los protocolos establecidos y se procedió a la extracción y análisis de los órganos de interés para este trabajo de tesis.

1.3.2 PROTOCOLO DE REOXIGENACIÓN

Para este segundo protocolo, los ratones con 12 semanas de edad se introducían en la cámara de Hx al 10% durante 2 o 3 semanas igual que se detalla en el apartado anterior. Una vez finalizado el tiempo de exposición a Hx crónica, los ratones eran reubicados de nuevo en condiciones normales de O₂, al 21%, durante 1 semana. Tras esa semana de reoxigenación, los animales eran sometidos a los estudios por ecografía o eutanasiados para la recolección y análisis de los órganos de estudio.

2. ESTUDIOS FUNCIONALES

2.1 ECOGRAFÍA CARDIOPULMONAR

La ecocardiografía transtorácica se realizó a ciegas por la Dra. María Villalba-Orero (colaboradora para las técnicas de imagen de esta tesis) con una sonda de 30 MHz (Vevo 2100; VisualSonics; Canadá). Los ratones se anestesiaron ligeramente con 1-2% de isoflurano en 100% de O₂, ajustado para mantener el reflejo podal (400-500 lpm, aproximadamente). Para evaluar el ventrículo derecho (VD), se midieron la excursión sistólica del plano anular tricuspídeo (TAPSE), la relación entre el tiempo de aceleración y el tiempo de eyección del flujo pulmonar (AT/ET) y el grosor de la pared del VD (RVWT). Se seleccionó una vista apical de cuatro cámaras para obtener el TAPSE, por modo M. El flujo pulmonar se obtuvo a partir de una vista de eje corto paraesternal (SAX) a nivel de los grandes vasos, mediante Doppler de onda de pulso. Se obtuvo un ángulo SAX para optimizar la visualización de la pared del VD, con el fin de medir el grosor de la pared mediante modo M. Además, se registraron el SAX estándar y la vista de eje largo (LAX) paraesternal en modo B y M y se analizaron las dimensiones y la función del ventrículo izquierdo (VI). Se trazaron las áreas telediastólica y telesistólica del VI (DE y ES, respectivamente) para el cálculo automático de los volúmenes del VDVI y del VTSVI (VDVI y

VTSVI, respectivamente), así como de la fracción de eyección del VI (FEVI). Además, se escanearon longitudinalmente ambos lados de los pulmones. Con estas vistas laterales analizamos el patrón pleural, el perfil de líneas y el color predominante indicativo de edema para calcular la puntuación MoLUS (Mouse Lung UltraSound). Para evaluar la puntuación MoLUS, asignamos un valor a cada tipo de parámetro (deslizamiento pulmonar [movimiento horizontal de la pleura], perfil de líneas [A, B], perfil de color [negro o/y blanco], líneas Z y grosor pleural, defectos y derrame), según su gravedad como se ha descrito previamente (95). La puntuación final es la suma de todos los valores de un individuo.

2.2 MEDICIÓN DE LAS PRESIONES SISTÓLICAS DEL VENTRÍCULO DERECHO (PSVD)

Gracias a la colaboración con el Dr. Edurado Oliver, se procedió a la medición de las PSVD. Los ratones se anestesiaron con medetomidina (1 mg/kg) y ketamina (75 mg/kg). Debido a los cambios fenotípicos que presentaban algunos ratones tras la exposición a Hx crónica, y para unificar el protocolo y evitar dispersión en la metodología, los ratones fueron abiertos bajo la línea del diafragma y se introdujo a través de él, un catéter Venofix A (27G), acoplado a un transductor de presión (Transpac IV), directamente en el ventrículo derecho para medir las PSVD. Los datos hemodinámicos se registraron utilizando un sistema Biopac MP36R y el software Acknowledge 4.1.0 de Biopac. Para cada ratón, se seleccionaron al menos 30 segundos de ciclos de latidos cardíacos continuos y estables sin ruido para obtener la media de la PSVD.

3. EXTRACCIÓN Y PROCESADO DE ÓRGANOS Y TEJIDOS

Los ratones adultos fueron sacrificados en una cámara de CO₂ por inhalación de acuerdo a los protocolos de eutanasia establecidos. Antes de proceder a la disección de órganos y tejidos, se comprobó que los ratones no presentaban reflejos, confirmando su fallecimiento. En primer lugar, los ratones fueron pesados en una báscula y se registró su peso corporal, ya que posteriormente lo utilizamos para obtener diferentes coeficientes de gran interés en este estudio. Una vez pesados, se les realizó una punción cardiaca a ciegas, sin abrir al animal, para obtener aproximadamente 1mL de sangre de cada ratón. Esa sangre se dividió en dos tubos: uno fue destinado a los estudios por hematología y el otro, se centrifugó a máxima potencia durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés, *room temperatura*) y así obtener el plasma, que se almacenó a -80°C para posibles experimentos futuros. Una vez sangrados los ratones procedimos a su disección.

Si los órganos se iban a destinar a estudios histológicos en parafina, tras su fijación en PFA al 4%, se introducían de manera individual en casetes y se enviaban al servicio de histología del CNIC en etanol 70° para su procesado e inclusión. Los bloques se guardaban a 4°C hasta el

momento de cortarlos en el microtomo (RM2155, Leica) a 4 μ m de grosor. Si por el contrario, los órganos iban a utilizarse para inmunofluorescencia en OCT, tras su fijación en PFA al 4%, se pasaban a una solución de sacarosa al 30% (16104, Sigma Aldrich) a 4°C y se incluían una vez que decantaban al fondo del tubo de sacarosa. Una vez fijados y embebidos, se enviaban en sacarosa al servicio de histología del CNIC para su inclusión en OCT. Los bloques se guardaban a -80°C hasta el momento de cortarlos en el criostato (CM1950, Leica) a 8 μ m de grosor.

3.1 EXTRACCIÓN DE CARÓTIDAS

Para los estudios del cuerpo carotídeo se extrajeron las arterias carótidas, en cuya bifurcación, se sitúa este diminuto órgano. Para diseccionar las carótidas lo primero que tuvimos que hacer fue exponer el cuello, colocando la cabeza del ratón hacia detrás todo lo que la piel nos permitió. Una vez colocado el ratón, se practicó un corte en "V" que iba desde la hendidura del manubrio del esternón hasta la parte baja de las orejas para retirar la piel, de modo que quedaban expuestos los maseteros y las glándulas salivares del ratón, que fueron retirados a continuación. Una vez extraídos los maseteros y las glándulas salivares, lo siguiente que hicimos fue retirar los músculos que recubrían la tráquea y sus laterales, exponiendo así las arterias carótidas. Una vez localizadas, con ayuda de una lupa, unas pinzas finas y unas tijeras pequeñas, se procedió a su extirpación, dando el primer corte en la zona más alejada de la bifurcación posible en dirección a la cabeza y el segundo corte, en la rama principal, dejando un margen prudencial para su manejo en el posterior procesado. Tras su obtención, las arterias carótida se fijaron con PFA (RT15710, Electron Microscopy Sciences) al 4% durante 1h y media a 4°C.

3.2 EXTRACCIÓN DE CORAZÓN Y PULMONES

Para la extracción del corazón y los pulmones, se practicó una incisión en la parte abdominal para poder acceder al interior del ratón. Una vez abiertas la capa de piel y músculo, se cortó el diafragma, dejando visible tanto el corazón como los pulmones en su parte más basal. A continuación, se abrió el tórax cortando ambos lados de las costillas en dirección a la cabeza, para así levantar la caja torácica y con un último corte, eliminarla si fuera necesario. Con esta apertura se consiguió tener una buena visibilidad del estado del corazón y los pulmones. Se perfundió el corazón inyectando KCl (0,3 M) por el ventrículo izquierdo para detener su latido y que todas las muestras estuvieran con el corazón en diástole. Tras el tratamiento con KCl, se perfundieron ambos ventrículos con PFA al 4%. Una vez perfundido el corazón, se diseccionaron en bloque el corazón y los pulmones. Una vez fuera del animal, se separaron ambos órganos y se pesaron.

- El corazón, se volvía a perfundir con PFA al 4% para limpiar los restos de sangre que pudieran quedar en su interior y dependiendo del tipo de técnica para la que se fuera a utilizar:
 - Se introducía en un tubo Falcon de 50mL con PFA al 4% donde se fijaría durante al menos 24-48h para estudios de histología como tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) o Tricrómico de Masson [™] o inmunofluorescencias con marcajes para proliferación con PH3, contornos celulares con WGA (*Wheat Germ Agglutinin*, todas las células) o contornos de CEs con IB4 (Isolectina B4).
 - Se hacía un corte con ayuda de un bisturí que fuese de ventrículo a ventrículo (sin llegar a las aurículas) y se introducía en un tubo Falcon de 50mL con PFA al 4% de manera que se permitiese al PFA entrar más rápido en el interior de los ventrículos. Con este procedimiento, los corazones se fijaban un máximo de 1h y media y se destinaban a inmunofluorescencias más sensibles con marcajes nucleares, como el marcador de proliferación Ki67 o el de núcleos de CEs (ERG), o bien para identificar los contornos de los pericitos con NG2.
- Los pulmones se perfundieron inyectando cada uno de los lóbulos con una aguja fina dejando pasar el PFA al 4% observando cómo se hinchaban cada uno de ellos. Una vez perfundidos todos los lóbulos, se introducía en el tubo Falcon de 50mL con PFA al 4% junto con el corazón.

3.3 EXTRACCIÓN DE BAZO

El bazo siempre era el último órgano en extraerse. Utilizando la apertura inicial del abdomen para acceder de manera más sencilla a la caja torácica, se abría esa incisión inicial con cortes hacia ambos lados del abdomen. Una vez expuesto el interior del abdomen, retirábamos hacia el lado derecho del ratón (izquierdo de la disección) para dejar visible el bazo bajo el estómago. Una vez extraído, el bazo se pesó y se introdujo en el tubo Falcon de 50mL junto con el corazón y los pulmones con PFA al 4%. A la hora de enviar a procesar e incluir este órgano, era importante tener en cuenta que necesitábamos secciones transversales para que en los cortes posteriores se pudieran valorar todas las estructuras y la distribución de pulpas simultáneamente.

3.4 EXTRACCIÓN DE EMBRIONES

Aunque este trabajo está principalmente centrado en el estudio del corazón, pulmón, cuerpo carotídeo y bazo de ratones adultos, también se han precisado algunos estudios en embriones.

Para la obtención de embriones, se hizo un seguimiento de la hembra gestante contando los días de gestación desde el día que dio tapón positivo (cuando el macho monta a la hembra, se

genera un tapón mucoso en la vagina que impide la fecundación por otro macho). Cuando la hembra estaba gestante de los días a los que requeríamos el estudio histológico, se sacrificaba en la cámara de CO₂ y se procedía a extraer el útero con los embriones. Posteriormente con ayuda de una lupa, se diseccionó el útero y se extrajeron los embriones de sus deciduas. Para estudios de corazón se procedió a cortar la zona del tronco por debajo de la cabeza y por encima del hígado embrionario, de modo que corazón y pulmón quedaban intactos dentro de la caja torácica. Para estudios de cuerpo carotídeo, se utilizó la cabeza con el tronco hasta las patas delanteras. Estos tejidos se fijaron con PFA al 4% ON a 4° para estudios histológicos posteriores y tras la fijación, se introdujeron en casetes en alcohol 70° y se enviaron al servicio de histología del CNIC para su procesamiento e inclusión en parafina y posterior corte al microtomo.

4. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

4.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA, TRICRÓMICO DE MASSON, PERLS Y α SMA

Todas estas tinciones se llevaron a cabo en el servicio de histología del CNIC bajo sus protocolos estandarizados.

- Para la tinción con Hematoxilina-Eosina (HE), utilizaron la máquina ST5020 de Leica.
- Tanto para la tinción de Tricrómico de Masson (TM) como la de Perls, siguieron los protocolos descritos en IHCWORLD ([Special Stain Protocols Archives - IHC WORLD](#))(96).
- Para la inmunohistoquímica (IHQ) de α SMA, primero hicieron el desenmascaramiento antigénico en la máquina PTLINK de Dako y después realizaron la IHQ en la máquina Autostainer Plus, de Dako.

Por último, todos los portaobjetos fueron montados en la máquina CV5030 de Leica.

4.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Dependiendo de si los cortes estaban hechos en parafina o en OCT, la primera parte del protocolo de inmunofluorescencia (IF) era diferente hasta la hidratación del tejido.

4.2.1. DESPARAFINACIÓN E HIDRATACIÓN DE CORTES DE PARAFINA

Los portaobjetos con cortes de 4 μ m de grosor del tejido embebido en parafina se introdujeron en un cestillo dentro de una estufa a 65°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se realizaron dos pases sucesivos cada 5 minutos para desparafinar el tejido introduciendo el cestillo en cubetas con xileno (106-42-3, Sigma Aldrich). Después de la desparafinación, se procedió a la rehidratación del tejido mediante lavados sucesivos de 5' cada uno haciendo pasar el cestillo por cubetas de etanol en concentración decreciente (2x 100%, 2x 90%, 1x 70%, 1x 50% y 1x 30%) para finalmente ser introducido en agua destilada. A continuación, los antígenos

se desenmascararon por incubación en buffer citrato a pH 6 (10mM citrato sódico, 0,05% Tween20 [P1379-500mL, Sigma Aldrich] en agua destilada). Para ello, se introdujo el cestillo con los portaobjetos en un vaso de precipitado con la solución citrato y se llevó a ebullición en un microondas durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se dejaron atemperar en el mismo buffer durante 30 minutos. A partir de este momento, el protocolo se unifica con el de OCT.

4.2.2. HIDRATACIÓN DE CORTES DE OCT

Los portaobjetos con cortes de 8µm de grosor del tejido embebido en OCT, que almacenamos a -20°C, se atemperaron a RT durante al menos 1h. Tras ser atemperados, los portaobjetos se introdujeron en una cubeta con agua destilada para su hidratación durante otra hora. Una vez hidratado el tejido, se unifica el protocolo con el de parafina.

4.2.3. MARCAJE CON IF Y ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

Una vez hidratados los tejidos, tanto procedentes de cortes de parafina como de OCT, se procedió a su permeabilización durante 15 minutos en agitación por inmersión en solución PBST 0,5% (PBS 1X + 0.5% Triton TX100 [9036-19-5, Sigma Aldrich]). A continuación, las secciones de tejido se bloquearon utilizando solución de bloqueo (suero de cabra [16210072, Life Technologies] al 10% en PBST 0,1%) durante 1h a RT en una cámara húmeda en oscuridad. Una vez bloqueados los tejidos, se incubaron con los anticuerpos primarios disueltos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda en oscuridad. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados en PBS 1X y se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios correspondientes según la naturaleza de las especies utilizadas en los anticuerpos primarios, disueltos en PBS 1X junto con Dapi (4',6-diamino-2-fenilindol, Millipore) para teñir los núcleos durante 1h a RT en cámara húmeda en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se montaron las muestras con medio de montaje específico para la conservación de los fluoróforos (S3023, Dako o 15257659, Fisher Scientific). Una vez hechas las IF, las muestras se conservaron en oscuridad a 4°C hasta su análisis por microscopía.

Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio de tesis fueron: SMA (C6198 y A2547, Sigma Aldrich; ab150301, Abcam); ERG (ab110639, Abcam); NG2 (ZRB5320, Sigma Aldrich); pH3 (06-570, Sigma-Aldrich); Ki67 (50-5698-82, Invitrogen-ThermoFisher Scientific); Podoplanin (8. 1.1, Hybridoma bank); SPC (ab211326, Abcam), Rai3 (sc-390263, Santa Cruz), F480 biotinilado (13-4801-85, Invitrogen) y B220 (14-0452-82, Invitrogen). Para marcar los capilares se utilizó Isolectina GS-IB4 biotinilada (I21414, Invitrogen; Fisher Scientific) y para el contorno celular para la identificación de cardiomiocitos se utilizó WGA (W32466, Invitrogen-ThermoFisher Scientific). Los anticuerpos secundarios utilizados en este estudio fueron: Anti-

conejo de cabra AF488 (A11008, Life technologies); Anti-conejo de cabra AF594 (A11012, Invitrogen); Anti-conejo de cabra Cy3 (APC132C, EMD Millipore); Anti-ratón de cabra AF488 (A11001, Invitrogen) y Estreptavidina AF594 (S11227, ThermoFisher).

Las imágenes fueron adquiridas con 3 microscopios confocales diferentes: Leica SP8 Navigator (CNIC), Leica gated STED-3X- WLL SP8 (CNIC) o Stellaris (IIBM).

5. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO/FACS

5.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La combinación de enzimas para la digerir los distintos órganos estudiados no coincide, por lo que la primera parte del protocolo, se diferencia ligeramente. El protocolo para corazón y pulmones se unifica tras añadir el cóctel de enzimas de digestión.

5.1.1. CORAZÓN

Se practicó la eutanasia a los ratones de cada genotipo tras el tratamiento correspondiente (Nx, Hx) y posteriormente se perfundió el corazón con HBSS^{+/+} (11550456, Gibco-Fisher Scientific) para limpiar la sangre del interior. A continuación, se extirparon con tijeras quirúrgicas las aurículas, las válvulas y los grandes vasos, quedando sólo los ventrículos para su posterior análisis. Una vez obtenido el tejido ventricular que se iba a analizar, se secó todo lo posible y se pesó en una balanza de precisión (Pioneer PX623, OHAUS). Los ventrículos del corazón se trocearon mecánicamente con ayuda de unas tijeras quirúrgicas y una vez que los fragmentos obtenidos eran de un tamaño no superior a 1mm, se añadió a cada muestra un total de 2,5mL del cóctel de encimas: colagenasa A (2,5 mg/ml, 10103586001, Sigma-Aldrich), liberasa (0,25 mg/ml, 5401119001, Roche-Merck) y DNasa I (125 u/ml, 04716728001, Roche-Merck) disueltas en HBSS^{+/+}.

5.1.2. PULMONES

Se practicó la eutanasia a los ratones de cada genotipo tras el tratamiento correspondiente (Nx, Hx) y posteriormente se perfundió cada lóbulo por separado con HBSS^{+/+} (11550456, Gibco-Fisher Scientific) para limpiar la sangre del interior. A continuación, se extirpó con tijeras quirúrgicas todo el tejido que no fuera lóbulo (tráquea y bronquios principales). Una vez obtenido el tejido que se iba a analizar, se secó todo lo posible y se pesó en una balanza de precisión. Los lóbulos se trocearon mecánicamente con ayuda de unas tijeras quirúrgicas y una vez que los fragmentos obtenidos eran de un tamaño no superior a 1mm, se añadió a cada muestra un total de 2mL de cóctel de encimas: liberasa (0,20 mg/ml, 5401119001, Roche-Merck) y DNasa I (100 u/ml, 04716728001, Roche-Merck) disueltas en HBSS^{+/+}.

5.1.3. DIGESTIÓN Y MARCAJE DE CORAZÓN Y PULMONES

Una vez añadidas a cada muestra el cóctel de enzimas correspondiente, se incubaron durante 30 min en un baño de agua a 37°C con agitación cada 5 minutos. A continuación, la reacción de digestión se detuvo añadiendo HBSS^{+/+} y las suspensiones celulares se centrifugaron a 450g durante 5' a 4°C. El pellet obtenido se picó en hielo y se procedió al lisado de eritrocitos con un buffer de lisis (Stock buffer lisis RBC 10X: 82,9 gr/L cloruro amónico NH₄Cl, 10gr/L bicarbonato potásico KHCO₃, 2mL/L EDTA 0,5M y agua destilada hasta 1L. pH entre 7,2 y 7,4. Su uso es a 1X, en frío) durante 5' en el caso de los corazones y durante 2 minutos en el caso de los pulmones. Se paró la reacción añadiendo 4mL de FACS Buffer (2,5% suero fetal bovino inactivo [FBS, del inglés, *fetal bovine serum*], EDTA 2,5mM y PBS 1X) y se volvieron a centrifugar las muestras a 450g durante 5' a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron otro 4mL de FACS Buffer. A continuación, se filtraron las suspensiones por pases sucesivos de filtros de mayor a menor medida de poro (70µm, 40µm, 30µm). Tras el último pase, se volvieron a centrifugar las muestras a 450g durante 5' a 4°C, se retiró el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 1mL de FACS buffer.

5.1.4. BAZO

Una vez extraídos los bazo, se perfundieron con HBSS^{+/+} y se digirieron en un volumen total de 400µL de cóctel de enzimas con liberasa (0,20 mg/ml, 5401119001, Roche-Merck) y DNasa I (100 u/ml, 04716728001, Roche-Merck) disueltas en HBSS^{+/+} durante 20 min a 37°C. Tras la digestión, se pasaron por filtros de 70µm y se procedió a la lisis de eritrocitos durante 4 minutos. Tras la lisis se lavaron las muestras añadiendo 4mL de FACS buffer y se centrifugaron a 450g durante 5' a 4°C. Finalmente, se utilizó el 5% de la muestra total para el marcaje y su análisis en el citómetro. Los anticuerpos utilizados para los experimentos de bazo fueron: CD45.2 (109852, BioLegend); CD3 (152318, BioLegend); B220 (563894, BD); CD11b (17-0112-83, Invitrogen); F4/80 (565411, BD); CD209b (53-2093-82, ThermoFisher) y LIVE/DEAD™ Fixable Aqua (L34957, ThermoFisher) como marcador de viabilidad.

5.2 MARCAJE DE POBLACIONES CARDIACAS Y PULMONARES Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenidas las muestras en una suspensión unicelular, se dividió en dos para los distintos experimentos.

5.2.1. PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE CÉLULAS CARDIACAS Y PULMONARES CON BOLAS DE CONTAJE

Para este protocolo se utilizó el 10% de la muestra obtenida anteriormente como resultado de la digestión de los tejidos. Como habíamos resuspendido el pellet final en un volumen de 1mL,

se cogieron 100µL de la muestra. Una vez separados los 100µL, se centrifugaron a 450g durante 5' a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100µL de la solución de anticuerpos sin el marcador de viabilidad. La muestra con los anticuerpos se incubó entre 30 y 45 minutos en una noria a 4°C en oscuridad. Una vez marcada la muestra, se lavó añadiendo 200µL de FACS buffer y repitiendo el ciclo de centrifugación. Para poder obtener los números absolutos de células por gramo de tejido era necesario utilizar unas bolas (*beads*) de conteo (Truecount beads [663028, BD-Biosciences]). Se prepararon 10000 bolas/mL en FACS buffer junto con el marcador de viabilidad y se añadieron 500µL de la mezcla a cada muestra. Una vez añadido, la muestra estaba lista para pasar por el citómetro LSRFortessa (BD FORTESSA SORP).

5.2.2. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS CARDIACAS Y PULMONARES Y SORTER

El 90% de la muestra restante se centrifugó a 450g durante 5' a 4°C y el pellet resultante se resuspendió en 1mL de FBS con un 10% de DMSO para su preservación en criotubos (Nunc-Cryotube, 368632, thermoscientific) a -80°C.

Estas muestras se conservaron para experimentos de sorter (datos preliminares no reportados en esta tesis). Para la descongelación de las células, los tubos recién sacados de -80°C se introdujeron en un baño a 37°C. Tras aparecer la primera fase acuosa por la descongelación, se añadió 1mL de FBS y se traspasó a un nuevo tubo hasta un volumen final de 5mL (contando con el mL que ya tenía el criotubo). Con estos lavados de FBS conseguimos diluir el DMSO utilizado para la conservación de las muestras. Inmediatamente después de la descongelación, las muestras se centrifugaron a 450g durante 5' a 4°C y con el pellet resultante se procedió al marcaje de células con los anticuerpos pertinentes como se ha detallado anteriormente. Una vez completado el tiempo de marcaje y el lavado de las muestras, se añadió el marcador de viabilidad y se resuspendió la muestra en un volumen final de 350µL para ser analizados en el sorter FACSAria Fusion (BD FACSAria™ Fusion CellSorter (BSL-2)) en la unidad de citometría de flujo del CNIC.

Los anticuerpos utilizados para estos análisis fueron: CD45 (clon 30-F11; 103115, BioLegend); CD90.2 (clon 53-2.1; 140319, BioLegend); CD31 (clon 390; 102427, BioLegend); Podoplanin-Gp38 (clon 8.1.1; 127423, BioLegend) y CD39 (clon Duha59; 143805, BioLegend) para definir las poblaciones no miocíticas en el corazón y los pulmones como ya se ha descrito en publicaciones previas de otros investigadores (97-100). Como marcador de viabilidad utilizamos el Sytox Green (425303, BioLegend).

5.3 CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS CARDIACAS Y PULMONARES

5.3.1. OBTENCIÓN DEL PORCENTAJE DE LAS POBLACIONES NO MIOCÍTICAS

Para calcular el porcentaje de células no miocíticas (distintas a los cardiomiocitos) en el corazón y el pulmón dentro del linaje Wt1, utilizamos los modelos reporteros control y mutantes descritos en el apartado 1 de estos métodos: Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre y HIF2 flox-Rosa-tdTomato/Wt1Cre respectivamente. Para determinar la contribución de Wt1 a cada linaje cardiaco y pulmonar, calculamos el número de cada población celular dentro del total de células CD45⁻/Tomato⁺ aplicando la fórmula:

$$\frac{n \text{ cél. de cada población dentro de las Tomato} +}{total \text{ de células Tomato} +} \times 100$$

5.3.2. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS POR GRAMO DE TEJIDO

Para determinar el número absoluto células de cada linaje celular contribuido por Wt1 en los diferentes ratones reporteros, utilizamos las bolas de contaje para normalizar el valor por gramo de tejido y aplicamos la siguiente fórmula en base a los pesos y volúmenes conocidos descritos en los apartados anteriores:

$$\frac{\text{cél.}}{\text{bolas}} \times \frac{\text{bolas totales}}{\text{ml buffer de bolas prep.}} \times \frac{\text{ml buffer de bolas util.}}{\text{fracción de suspensión celular util.}} \times \frac{n \text{ muestras}}{\text{peso tejido (mg)}} = \frac{\text{cél.}}{\text{mg}}$$

En esta ecuación, células/bolas es el número exacto de células/bolas después del análisis con FlowJo. El total de bolas/mL de buffer de bolas son 10000 bolas/1mL. Se utilizaron 0,5mL del buffer de bolas por cada 0,1mL de suspensión unicelular de tejido y por tubo analizado, sólo hay 1 muestra.

5.4 ANÁLISIS Y REPRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los separadores de células de citometría y sorter estaban equipados con el software DIVA, mientras que los archivos recogidos de cada muestra se analizaron posteriormente con FlowJo. Las poblaciones celulares obtenidas a partir de los distintos órganos de estudio se analizaron de la siguiente manera (eje Y/eje X): 1) se seleccionó aquella nube de puntos que por tamaño/complejidad podrían ser células con SSC-A /FSC-A, eliminando los restos celulares que pudiesen quedar del proceso de disgregación del tejido. 2) se seleccionó la nube compatible con células simples, quitando los dobletes y agregados con los ejes FSC-H/FSC-W. 3) A continuación, por selección negativa del marcador de viabilidad, se seleccionó aquella nube de puntos que correspondiesen a las células vivas con los ejes Sytox Green o Aqua/SCC-A. 4) Una vez seleccionadas las células vivas, se empezó el estudio propiamente dicho combinando los distintos marcajes utilizados en el coctel de anticuerpos para obtener finalmente los datos de cada población de interés. Análisis de imagen

6. ANÁLISIS DE IMAGEN

6.1 CUANTIFICACIÓN DE ÁREAS

Para la cuantificación de las áreas tanto de cardiomiocitos como de capilares, se utilizó el programa Fiji/ImageJ. En ambos casos, se hicieron fotos de toda la sección del corazón con los microscopios de fluorescencia confocales y se analizaron 12 campos aleatorios repartidos entre los ventrículos derecho, izquierdo y septo interventricular. Para medir el área de los cardiomiocitos, se utilizó la tinción con WGA, mientras que para la medición del área de los capilares se utilizó la tinción con IB4. En ambos casos, los campos seleccionados tenían todos, las fibras en posición transversal y se utilizó la herramienta de "selección libre" para la cuantificación manual de cada célula o capilar. En ocasiones, cuando la inmunofluorescencia era muy clara, se podía hacer una máscara siguiendo los pasos que se indican:

- Pasar la imagen a 8bits → ajustar el brillo y contraste hasta saturar ligeramente la imagen → Ajustar el *Threshold* → Analizar partículas entre 0 y 50 (si queremos analizar capilares) o entre 50 y 200 (si queremos analizar cardiomiocitos), aproximadamente. Igualmente, se tuvieron que cambiar los rangos de tamaño dependiendo de la imagen y ajustar las áreas que nos devolvía el programa, ya que, aún seleccionando los tamaños, algunos capilares o cardiomiocitos no los reconocía o los seleccionaba mal, por lo que, en última instancia, tuvimos que contornear las células o los capilares manualmente.

Para medir el área del espacio alveolar, se generó una máscara en Fiji/ImageJ en la que se delimitaba y rellenaba el tejido de color negro y el espacio alveolar de color blanco. De esta manera éramos capaces de medir el área de la zona blanca, correspondiente al espacio alveolar. Se hizo de la siguiente manera:

- Partíamos de una imagen teñida con hematoxilina eosina → pasar la imagen a 8bits → ajustar brillo y contraste → Ajustar *Threshold* → crear máscara → analizar partículas → quitar espacios no deseados → Cerrar tabla de resultados y tras ajustar los espacios, sobre la ROI generada, darle a medir.

Para los estudios de áreas sobre tinciones histológicas como la hematoxilina eosina, las muestras teñidas fueron escaneadas por el dispositivo Hamamatsu NanoZoomer 2.0RS y las imágenes se analizaron utilizando el software NDP View.

6.2 CUANTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS Y/O CÉLULAS ESPECÍFICAS

Para la cuantificación del número de células se empleó el *plugin* de Fiji/ImageJ CellCounter y se procedió a la cuantificación manual de cada una de las células de interés en base a los marcajes utilizados en la inmunofluorescencia.

6.3 MONTAJE Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes adquiridas en los microscopios se exportaron en formato “.lif”. Para extraer las imágenes y guardarlas en formato TIFF o JPEG, se abrían en Fiji/ImageJ, se separaban los canales de las imágenes y se guardaba cada canal por separado con el formato deseado. Para poner las barras de escala en las imágenes, seguíamos el siguiente proceso:

- Sobre la imagen en la cual queríamos colocar la barra → Seleccionamos la pestaña “Analyze” → Tools → “Scale bar” → se nos abre una pestaña en la que deberemos elegir el tamaño en micras de la barra y la localización en la imagen y una vez colocada la barra → “Image” → “Overlay” → “Flatten” para fijar la barra en la imagen. Una vez fijada, ya se puede guardar en el formato deseado.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA

Tanto para el análisis estadístico, como para la representación gráfica de cada uno de los análisis llevados a cabo en este trabajo de tesis, se utilizó el programa GraphPad.

Para cada uno de los estudios, se agruparon los valores obtenidos de las mediciones de cada individuo con el mismo genotipo de camadas y experimentos independientes. Al tener que comparar los resultados obtenidos de cada grupo no sólo entre los individuos con distinto genotipo sino también con las distintas condiciones a las que se les hizo el estudio (normoxia, o los tratamientos de Hx y reoxigenación), el principal test utilizado en a lo largo de este trabajo de tesis es el test estadístico ANOVA, dando la posibilidad de comparar cada columna de datos (correspondiente a una condición de genotipo y tratamiento de O₂) con todas las demás columnas y así poder obtener las diferencias entre genotipos en las mismas condiciones de tensiones de O₂ y cómo varían si cambian esas condiciones del ambiente.

Los datos además fueron tratados con un test de normalidad, pudiendo asumir normalidad en todos los grupos y experimentos analizados.

En el caso de los análisis de supervivencia de los ratones, se realizó un seguimiento desde el destete (semana 3 de vida) hasta la edad adulta (analizado hasta las 15 semanas de edad), a cada individuo hasta un total de 244 ratones de 35 camadas independientes. Se asignó en cada punto de estudio el valor de 0 (si el ratón en el momento del análisis estaba vivo) o 1 (si el

ratón en el momento del análisis estaba muerto), obteniendo así la curva de supervivencia de los ratones (**Figura 9**).

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

RESULTADOS

Este trabajo se centra en caracterizar los cambios fenotípicos tanto estructurales como funcionales tras exposición a hipoxia (Hx) crónica de un nuevo modelo de delección de *Hif2* en el linaje *Wt1*. Principalmente se ha realizado un análisis de los trastornos cardiovasculares de este modelo en respuesta a Hx analizando detalladamente el corazón y el pulmón. Pero, además, se aportan resultados preliminares sobre cambios importantes observados en otros dos órganos sensibles a los niveles de O_2 : el cuerpo carotideo y el bazo.

1. PAPEL DE HIF2 EN EL LINAJE PULMONAR *Wt1* EN HOMEOSTASIS Y TRAS EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA

Aunque el papel de HIF2 en pulmón está bien caracterizado en el contexto de la patología de HP, la mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha se han centrado sobre todo en estudiar la importancia de la señalización mediada por HIF2 en endotelio (59-61), y sólo un par de estudios recientes lo hacen sobre el papel de HIF2 en otros tipos celulares como los PCs (79) o las CMLs (78). Por lo tanto, aunque existen numerosos estudios previos, la información disponible es aún muy limitada y se desconoce el papel que puede tener HIF2 a nivel global dentro de las poblaciones vasculares y no sólo de en el endotelio. Por este motivo, la utilización del modelo *Wt1-Cre* podría ayudarnos a comprender mejor el papel de HIF2 en la vasculatura pulmonar, ya que como se ha descrito anteriormente, *Wt1* está muy involucrado en el correcto desarrollo del pulmón.

1.1 ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE *Wt1* A POBLACIONES PULMONARES

Wt1 es un factor de transcripción que se expresa en progenitores mesodérmicos y que contribuye a distintos tipos celulares en varios órganos. En el pulmón en concreto, tiene un papel muy importante para el correcto desarrollo de las células vasculares, los alveolos y las células de la musculatura lisa de las arterias y bronquios (86). Sin embargo, su distribución en pulmones adultos no ha sido estudiada.

Para analizar el patrón de expresión y contribución de *Wt1* en adulto, generamos un modelo de ratón constitutivo utilizando un reportero para las poblaciones *Wt1*⁺ o derivadas de *Wt1*, *Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (*Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*). Con este nuevo modelo todas las células que en el ratón adulto expresan *Wt1* o que derivan de algún progenitor que expresó *Wt1* en etapas previas (linaje), tendrán una señal fluorescente endógena de color rojo (Cy3).

Por un lado, este modelo nos permitió analizar de manera cualitativa mediante inmunofluorescencia (IF) del gen reportero (Tomato) combinada con marcadores de diversos linajes celulares, qué poblaciones eran derivadas de *Wt1* ó *Wt1*⁺ en base a las colocalizaciones de la señal *Tomato*⁺ (linaje *Wt1*) junto con el resto de marcadores específicos. Tal y como está

descrito en la literatura embrionaria por Cano, E et al. en 2013 (86), confirmamos la contribución del linaje Wt1 en pulmón adulto tanto en CEs (ERG⁺, del inglés, *ETS related gene*) de la microvasculatura de los alveolos, como en las CEs de las arteriolas pulmonares y las CMLs (α SMA⁺, del inglés, *Smooth Muscle Actin α*), tanto de las arteriolas pulmonares, como de la submucosa bronquial (**Figura 5**).

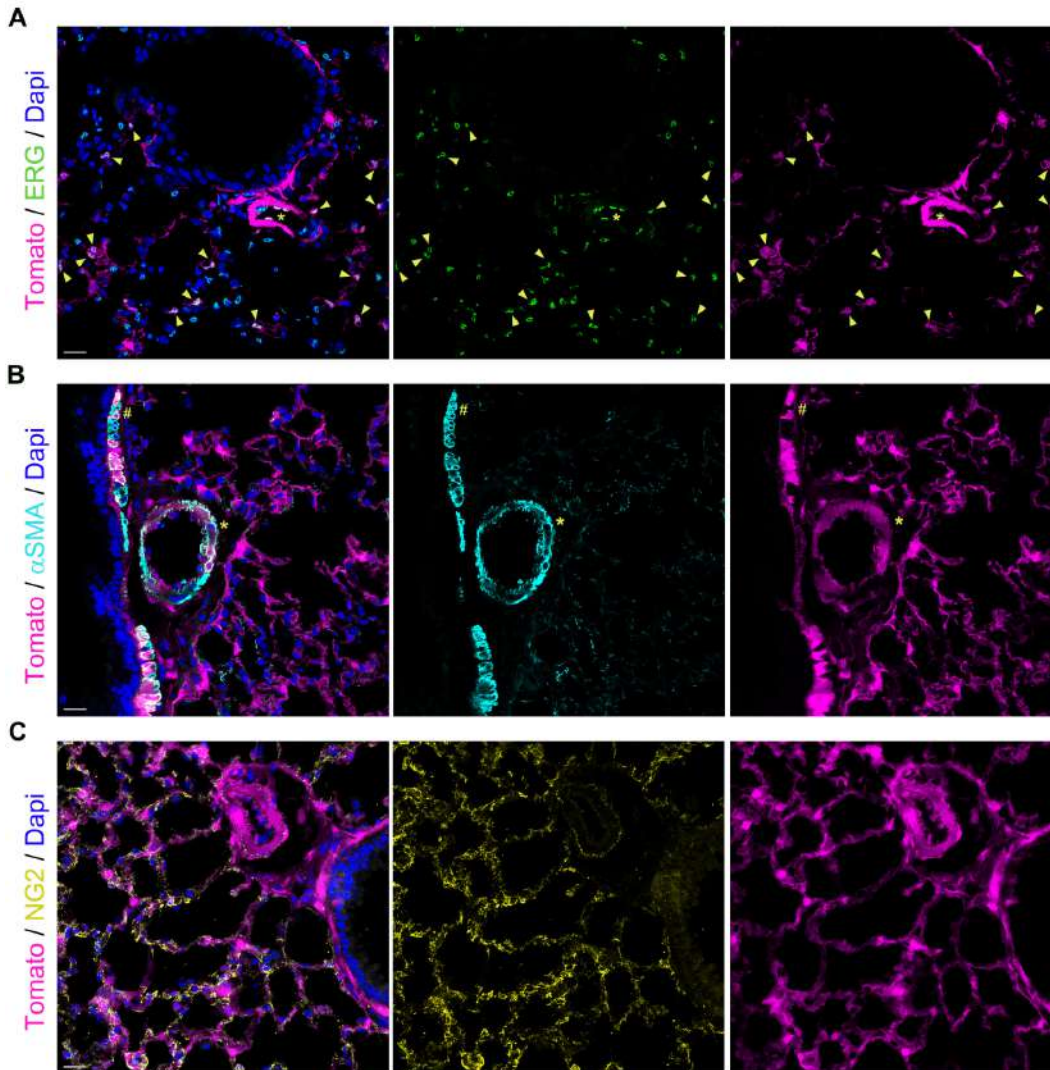


Figura 5. Contribución de Wt1 a las poblaciones de CEs y CMLs pulmonares.

Immunofluorescencia representativa sobre cortes en OCT de pulmón de ratones reporteros para Wt1 contra ERG (núcleos de CEs, verde), α -SMA (CML, cyan), NG2 (PCs, amarillo), Tomato (células de linaje Wt1, magenta) y Dapi para coteñir los núcleos. **A**) Las flechas amarillas muestran la colocalización entre la señal de ERG y la señal de Tomato (ERG⁺/Tomato⁺). **B**) Imagen que muestra el solapamiento de la señal de α -SMA tanto de la submucosa bronquial (#) como de las arterias pulmonares (*) con la señal de Tomato (SMA⁺/Tomato⁺). **C**) Parénquima alveolar con solapamiento de la señal de NG2 con el Tomato (NG2⁺/Tomato⁺). Barras de escala 20 μ m.

Además, también identificamos la contribución a PCs (CSPG, del inglés, *Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4* o NG2⁺) y descartamos la contribución a macrófagos alveolares (MFAs) (IB4⁺, Isolectina B4) (101) y a neumocitos tipo I (Rai3⁺, del inglés, *Retinoic Acid Inducible protein 3*

(Rai3) o también conocido como GPRC5A, del inglés, *G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member A*) (102) y tipo II (SPC⁺, del inglés, *Surfactant Protein-C*) (97, 103) (**Figura 6**).

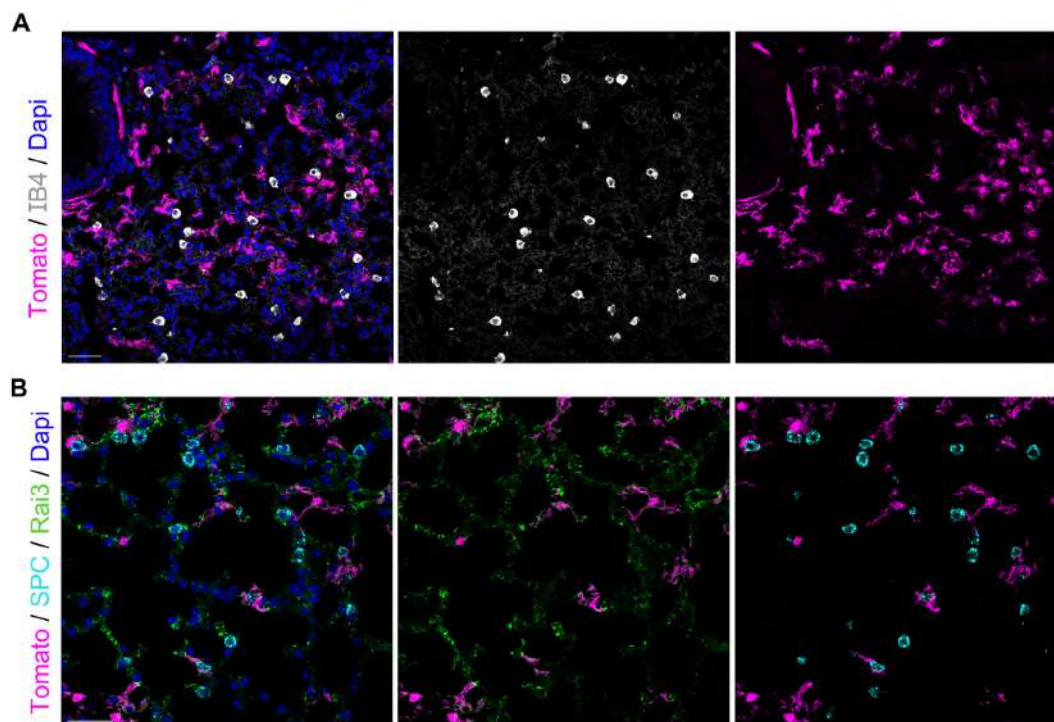


Figura 6. Contribución de Wt1 a PCs pero no a MAs ni neumocitos tipo I y II. Inmunofluorescencia representativa sobre cortes de OCT de pulmón de ratones reporteros para Wt1 contra IB4 (MFAs, blanco), Rai3 (neumocitos tipo I, verde), SPC (neumocitos tipo II, cyan), Tomato (células de linaje Wt1, magenta) y Dapi para coteñar los núcleos. **A)** Ausencia de solapamiento de la señal de Tomato con los MFAs (IB4⁺/Tomato⁻). Barras de escala de 20µm. **B)** Ausencia de colocalización de la señal de Tomato del ratón reportero con marcadores para neumocitos tanto tipo I (Rai3, verde, Rai3⁺/Tomato⁻) como tipo II (SPC, cyan, SPC⁺/Tomato⁻). Barras de escala 40µm.

Por otro lado, mediante análisis por FACS pudimos evaluar y confirmar de manera cuantitativa las observaciones previas obtenidas por IF. Diseñamos una estrategia de selección y clasificación basada en los distintos marcadores de superficie de linaje de manera que, tras varias selecciones positivas y negativas de las nubes de células y uso de bolas magnéticas, obtuvimos los valores reales de células por gramo de tejido de la muestra, así como sus porcentajes en relación al total de células de un determinado linaje o dentro de la población Tomato⁺ contribuida por Wt1. Estos estudios revelaron que la contribución basal del linaje Tomato⁺ en el pulmón estaba en torno al 18,3% del total de células CD45⁻ que se analizaron (**Figura 7A**). Dentro del total de células Tomato⁺, el 37,3% eran CEs CD31⁺/CD39⁺, el 20,6% CMLs CD31⁻/CD39⁺ (**Figura 7B**) y del resto, el 22.8% eran PCs CD90⁻/GP38⁻ (**Figura 7C**) y el 1,7% fibroblastos (FBs) CD90⁺ (**Figura 7D**).

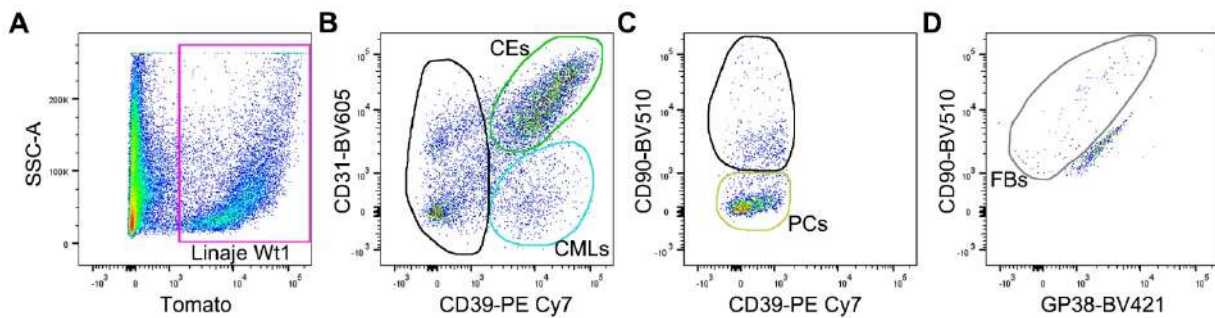


Figura 7. Estrategia de análisis por citometría de flujo/FACS de las poblaciones Wt1⁺ en pulmón. Gráficos representativos de la estrategia de selección y clasificación para caracterizar las células de linaje Wt1 en el pulmón sobre un total de 24000 células CD45⁻. **A)** Cuadrante en rosa mostrando el total de células CD45⁻/Tomato⁺. **B)** Dentro de las células CD45⁻/Tomato⁺, la nube de puntos delimitada por la línea verde corresponde al endotelio (ECs: CD31⁺/CD39⁺) y la delimitada en azul a las CMLs (SMCs: CD39⁺/CD31⁻). El resto de células no caracterizadas en este plot se rodean con una línea negra. **C)** Sobre el conjunto de células no caracterizadas en B, se identifican los PCs por un círculo amarillo (CD39⁻/CD90⁻) y el resto de células como posibles fibroblastos. **D)** Población real de fibroblastos (CD90⁺/GP38⁻) tras eliminar la autofluorescencia detectada por las células y anticuerpos utilizados.

Se resumen los resultados relativos a la contribución del linaje Wt1 en pulmón en la **Tabla 2**.

Tabla 2

Tipo celular	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Media	SD
CEs	54,93	35,41	26,83	31,48	37,70	37,27	10,70
PCS	16,08	25,86	27,90	21,05	23,07	22,79	4,57
FBs	1,23	1,23	1,49	1,18	1,68	1,36	0,22
CMLs	6,50	19,05	26,13	33,40	17,72	20,56	10,05

Tabla 2. Porcentaje de cada población dentro del linaje pulmonar Wt1⁺. Tabla con los valores individuales, la media y la desviación estándar (SD) expresados en porcentaje de 5 experimentos independientes. Los datos muestran la contribución de cada tipo celular (CEs, PCs, FBs y CMLs) dentro del total de células Wt1⁺.

La validez del diseño de la región definida (*gate*) para identificar PCs con esta estrategia de marcaje fue confirmada mediante el uso de un ratón reportero específico para NG2, que presenta todos los PCs marcados de color rojo, lo que facilita su reconocimiento con distintas técnicas basadas en fluorescencia (**Figura 8**).

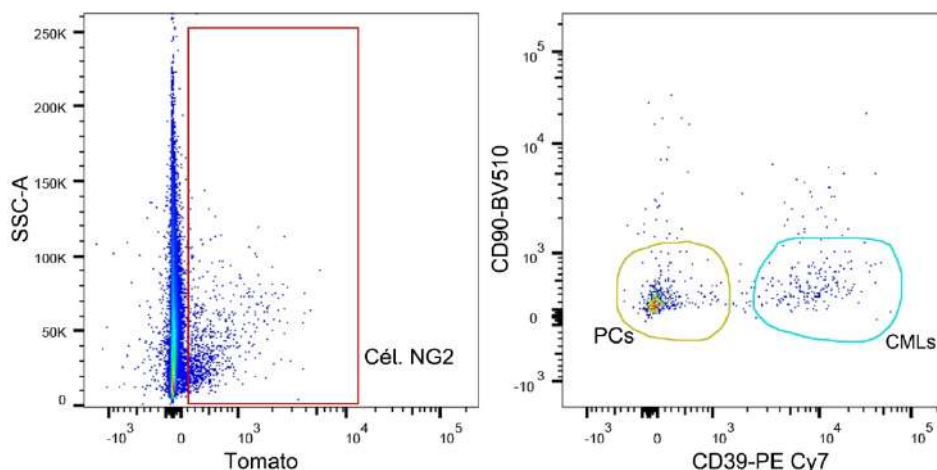


Figura 8. Validación de la estrategia de marcaje de PCs por citometría de flujo/FACS. Análisis de FACS sobre ratones reporteros para PCs (NG2-DsRed) utilizando la misma estrategia de marcaje y clasificación que para los ratones reporteros de Wt1 (Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre). El panel de la izquierda muestra la población pulmonar CD45-/Tomato⁺ del ratón NG2-DsRed. El gráfico de la derecha muestra que la mayoría de las células Tomato⁺, caen dentro de la región definida por nuestra estrategia de marcaje para identificar PCs, confirmando la naturaleza de las células.

Por otro lado, estos análisis de citometría de flujo/FACS nos permitieron conocer el porcentaje relativo de cada población que estaba contribuido por Wt1 (**Tabla 3**).

Tabla 3

Tipo celular	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Media	SD
CEs	22,67	14,03	13,33	36,22	16,98	20,65	9,45
PCS	14,69	9,62	10,25	22,00	11,54	13,62	5,08
FBs	5,15	2,32	1,90	4,78	5,11	3,85	1,60
CMLs	18,61	16,02	18,81	36,70	12,61	20,55	9,37

Tabla 3. Porcentaje de contribución del linaje pulmonar Wt1 dentro de cada población celular. Tabla con los valores individuales, la media y la desviación estándar (SD) expresados en porcentaje de 5 experimentos independientes. Los datos muestran la contribución de Wt1 dentro de cada población celular.

En conjunto, estos análisis nos permiten definir la amplia representación del linaje Wt1 en pulmón, y confirmar que contribuye tanto a endotelio arterial, como a CEs de los capilares alveolares, así como a la capa de músculo liso de la submucosa bronquial y arterias pulmonares y a un gran número de PCs del parénquima alveolar, si bien esta contribución no es del 100% para ninguna de las poblaciones mencionadas, reflejando la heterogeneidad de los linajes pulmonares.

1.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA PULMONAR DE LOS MUTANTES *HIF2/Wt1* cKO EN NORMOXIA

Una vez definida la contribución de *Wt1* al tejido pulmonar adulto, generamos un nuevo modelo condicional de delección de HIF2 cruzando la línea establecida HIF2-flox (93) con el ratón *Wt1*-Cre (83) que nos permitiera analizar la importancia de la señalización por HIF2 más allá del endotelio pulmonar. De ahora en adelante nos referiremos a esta línea como *Hif2/Wt1* cKO.

Como el modelo de estudio es constitutivo, en primer lugar nos planteamos si la delección de HIF2 en el linaje *Wt1* desde la etapa embrionaria hasta la edad adulta causaba algún defecto en el desarrollo, ya que *Wt1* empieza a expresarse en desarrollo entorno a día E9,5. Tal y como se muestra en la **Tabla 4**, la eliminación constitutiva de HIF2 en el linaje *Wt1* no causa letalidad embrionaria y además, la ausencia de HIF2 no compromete la supervivencia, homeostasis ni la fertilidad de los ratones adultos (**Figura 9**).

Tabla 4

Estadio	<i>Hif2^{f/f} / Wt1^{+/-}</i>	Crías totales	Camadas	% Real ± SEM	% Esperado	P Value
Destete	116	244	35	49,856 ± 3,135	50	0,8954

Tabla 4. Análisis de recuperación de mutantes *Hif2^{f/f}/Wt1^{+/-}* al destete. La tabla muestra el número de crías *Hif2/Wt1* cKO recuperadas al destete (momento en el que se genotipan los ratones) con respecto al total de crías analizadas en 35 camadas.

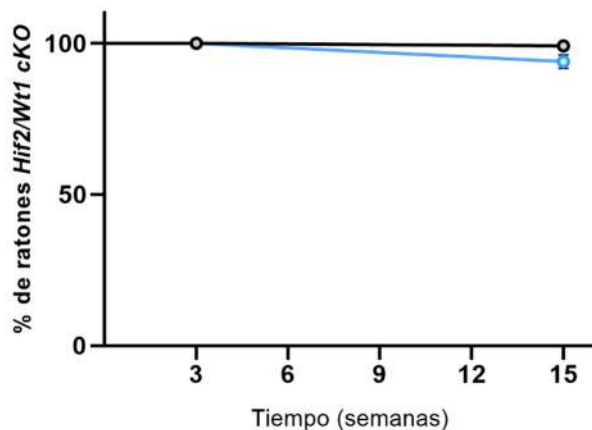


Figura 9. Análisis de la supervivencia de los ratones *Hif2/Wt1* cKO. Curva de supervivencia que muestra el porcentaje de recuperación de ratones control (línea negra) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (línea azul) desde el destete (3 semanas de edad) hasta la edad adulta a las 15 semanas de edad.

El siguiente paso fue analizar la integridad tisular de los pulmones. Para ello, se realizaron tinciones con Hematoxilina y Eosina (HE) sobre cortes de parafina tanto de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*), como de los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*), con el objetivo de determinar si los pulmones de los ratones deficientes en HIF2 presentaban alguna alteración basal en comparación con los controles. Las imágenes con HE no mostraron diferencias en el parénquima alveolar ni en las estructuras vasculares entre ratones control y los *Hif2/Wt1* cKO, como puede apreciarse en la **Figura 10**.

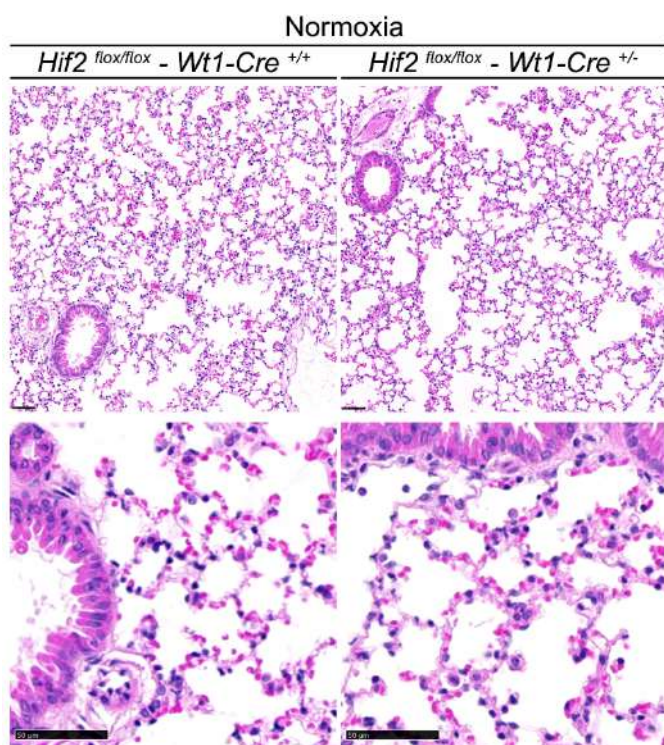


Figura 10. Análisis histológico de los pulmones en normoxia. Imágenes representativas de la tinción con HE sobre cortes en parafina de ratones control (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles izquierdos) y *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles derechos) a diferentes aumentos. Barras de escala de 50µm en todas las imágenes.

Estos datos sugieren que la señalización mediada por HIF2 en el linaje *Wt1* desde estadios tempranos hasta la edad adulta no es necesaria para el correcto desarrollo embrionario y tisular, ni para la homeostasis y supervivencia de los ratones en normoxia (Nx).

1.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA PULMONAR DE LOS MUTANTES *HIF2/WT1* CKO EN HIPOXIA

Tras la caracterización detallada de los ratones *Hif2/Wt1* cKO en Nx, donde la ausencia de HIF2 no causaba ninguna alteración estructural, decidimos evaluar si eliminar HIF2 en el linaje *Wt1* pulmonar tenía algún impacto en la adaptación de estos ratones a bajos niveles de O₂ en base a las evidencias previas de remodelado pulmonar durante Hx crónica (59-61). Tal y como se describe en la introducción, el papel de HIF2 ha sido estudiado fundamentalmente en CEs, aunque recientemente se han publicado algunos estudios en PCs (79) y CMLs (78) y su papel en el desarrollo y progresión de HP ha sido bien establecido. Por este motivo, y a la vista de la amplia contribución de *Wt1* a poblaciones vasculares pulmonares (**Figura 5** y **Figura 7**), nos planteamos la utilización de nuestro modelo *Hif2/Wt1* cKO como una estrategia novedosa para ampliar el conocimiento de la importancia de HIF2 en otros tipos celulares distintos al endotelio, aportando una visión más global y sistémica de su función.

Para ello, diseñamos un protocolo experimental en el que se definieron tres grupos según el tratamiento al que se sometieron los ratones control y *Hif2/Wt1* cKO: el primer grupo estaba formado por ratones en Nx (gris), el segundo, consistió en ratones control y *Hif2/Wt1* cKO

sometidos a 2 semanas de Hx al 10% de O₂ (Hx2, rosa) y el tercer grupo experimental, correspondía a ratones expuestos a 3 semanas de Hx crónica (Hx3, azul) (**Figura 11**).

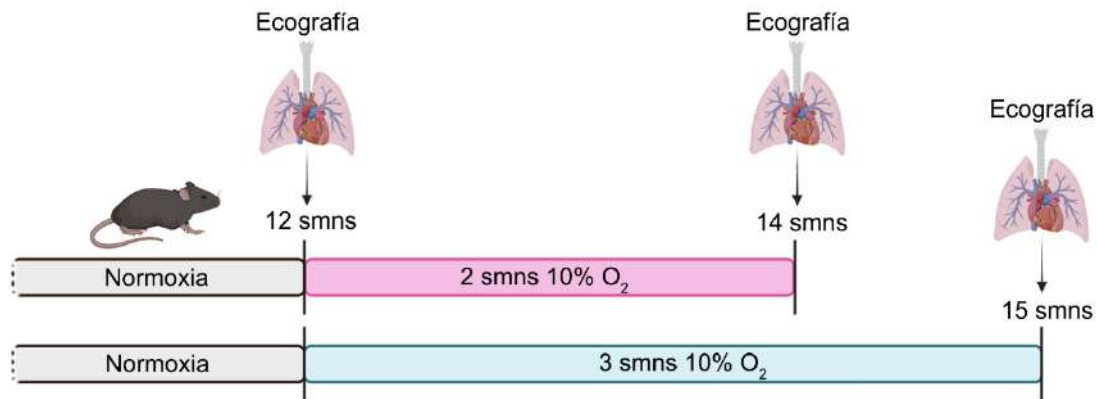


Figura 11. Esquema del plan experimental y los grupos de animales de análisis. Esquema representativo del diseño experimental de esta tesis. Por un lado, los ratones se analizaron en normoxia a 12 semanas de edad. Para los protocolos de hipoxia, los ratones adultos con 12 semanas se introdujeron en la cámara de hipoxia al 10% de O₂ durante 2 (rectángulo rosa) o 3 (rectángulo azul) semanas. Tras el tratamiento ininterrumpido de hipoxia, los animales se analizaron por ecografía cardíaca y pulmonar y después, se sacrificaron siguiendo los protocolos de eutanasia establecidos para el no sufrimiento y se procedió a la extracción de los tejidos para su análisis.

1. 3. 1 LA ELIMINACIÓN DE HIF2 PREVIENE DEL REMODELADO ARTERIAL Y LA ELEVACIÓN DE LA PSVD TRAS LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA

Una característica principal del desarrollo de HP es el remodelado de las arteriolas distales del pulmón. Por este motivo, lo primero que quisimos explorar fue precisamente si había diferencias en el diámetro de las arteriolas pulmonares entre los controles y los ratones *Hif2/Wt1* cKO en las distintas condiciones experimentales: Nx, 2 semanas de Hx (Hx2) y 3 semanas de Hx (Hx3). Para ello, se realizó un ensayo de inmunohistoquímica contra α -SMA sobre cortes en parafina para teñir la capa muscular de las arteriolas (**Figura 12**).

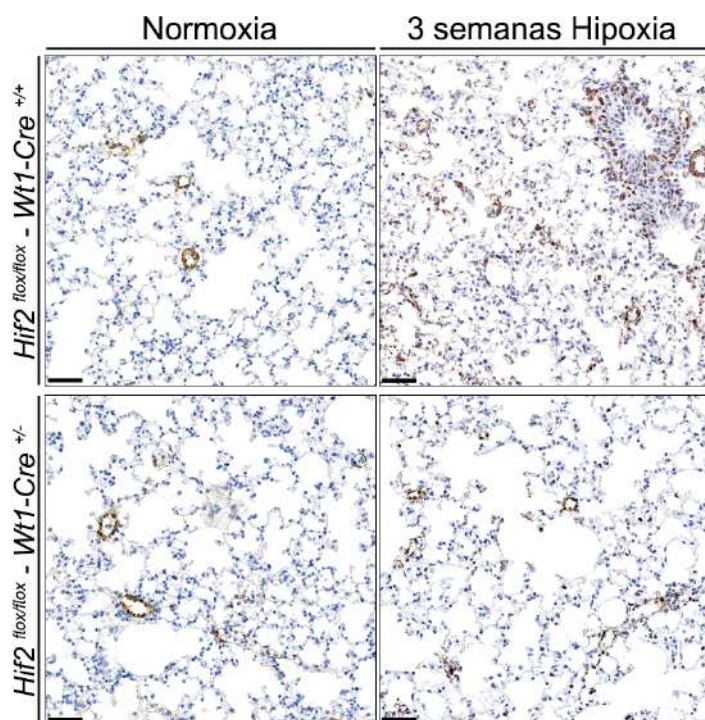


Figura 12. Muscularización de las arterias pulmonares tras la exposición a hipoxia crónica. Imágenes representativas de cortes en parafina de pulmones de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) teñidos con α -SMA para detectar la capa muscular de las arterias. Los paneles izquierdos corresponden a pulmones en normoxia, mientras que las imágenes de la derecha corresponden a pulmones de ratones sometidos a 3 semanas de hipoxia. Barras de escala de 50 μ m.

Para analizar el grado de remuscularización, dividimos las arteriolas identificadas por tinción positiva para α -SMA en 3 grupos dependiendo de su diámetro: grandes, con diámetro de 30 a 20 μ m (**Figura 13A**), medianas, entre 19 y 10 μ m (**Figura 13B**) y pequeñas, entre 9 y 1 μ m (**Figura 13C**). De acuerdo a esta clasificación, observamos que no había diferencias significativas entre los ratones control (WT) y los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en ninguna de las condiciones de Nx o Hx en relación a las arteriolas grandes. Sin embargo, para las de mediano calibre, observamos una tendencia de los ratones control (WT) tras 2 y 3 semanas de Hx (Hx2 e Hx3 respectivamente) a tener más arteriolas remodeladas que los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) (**Figura 13B**), aunque las diferencias sólo se apreciaban de manera significativa en el grupo de arteriolas más pequeñas, para las que se observaba claramente que los ratones control (WT) tras 2 y 3 semanas de Hx presentaban un mayor número de arteriolas remodeladas en comparación a los valores de Nx (**Figura 13C**). Sin embargo, los ratones mutantes para HIF2 aún tras 2 y 3 semanas de Hx, mantienen los valores de la Nx (**Figura 13B, C**), lo que indica que la eliminación de HIF2 en el linaje *Wt1* también previene el remodelado vascular en respuesta a Hx crónica, como describen los estudios previos sobre HP mediante la eliminación de HIF2 sólo en el compartimento endotelial (59-61).

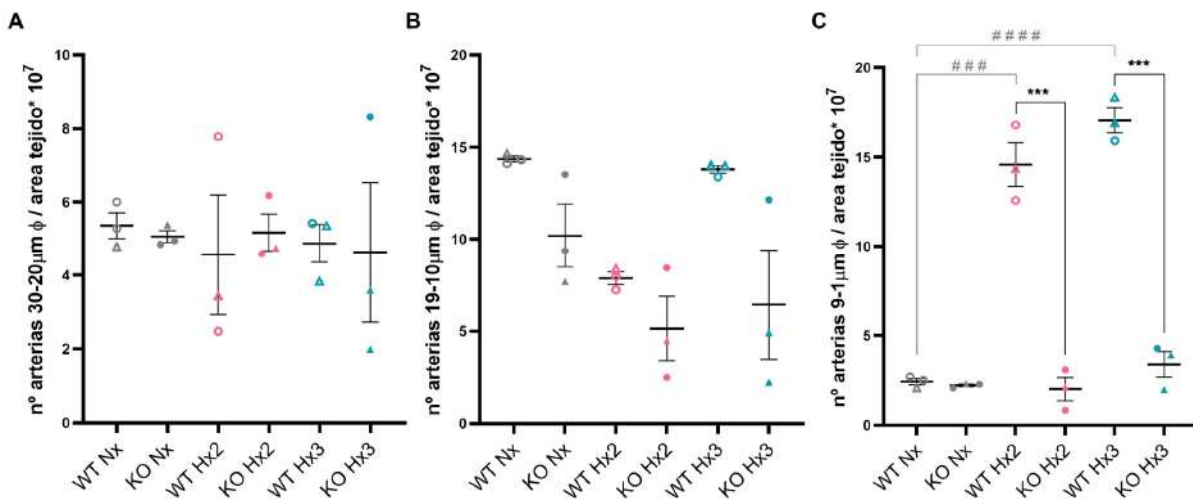


Figura 13. Cuantificación de la muscularización de las arterias pulmonares tras exposición a hipoxia crónica. Cuantificación del número de arteriolas según su diámetro: grandes, de 30 a 20 μm (A), medianas, de 19 a 10 μm (B) y pequeñas, de 9 a 1 μm (C) en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en normoxia (Nx, puntos grises), tras 2 semanas de hipoxia (Hx2, puntos rosas) y tras 3 semanas de hipoxia (Hx3, puntos azules). Cada gráfico está representado por un conjunto de puntos en el que cada uno es un individuo, mostrando a las hembras con triángulos (n=8) y a los machos con círculos (n=9). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de una misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican las diferencias existentes entre ratones con el mismo genotipo, pero distinta condición (Nx vs Hx). Cada valor se representa como la media (línea negra) y las barras de error (error estándar de la media: SEM). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

A continuación, quisimos evaluar el impacto de estos cambios en remuscularización sobre la sobrecarga del ventrículo derecho, que aumenta durante la progresión de HP. Para ello, realizamos medidas de la presión sistólica del ventrículo derecho (PSVD) en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO en las distintas condiciones experimentales. Tal y como cabría esperar según el análisis de las arteriolas, los ratones control (WT) presentaron mayores presiones en el ventrículo derecho tras 2 y 3 semanas de Hx en comparación con los valores en Nx. Por el contrario, los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) presentaron valores similares a los de Nx tras 2 y 3 semanas de Hx (Figura 14).

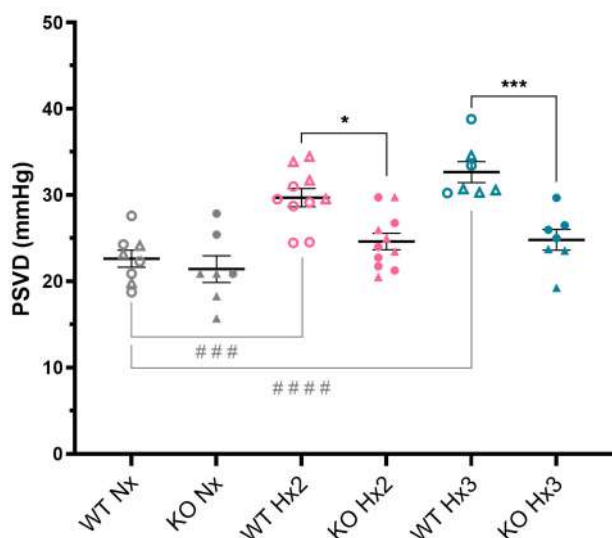


Figura 14. Análisis de la PSVD a distintas tensiones de oxígeno. Representación gráfica de los valores de las Presiones Sistólicas del Ventriculo Derecho (PSVD) medidas en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en condiciones de normoxia (Nx, puntos grises) y tras 2 (Hx2, puntos rosas) o 3 (Hx3, puntos azules) semanas de hipoxia. Gráfico de puntos en el que cada uno representa un individuo, mostrando a las hembras con triángulos (n=23) y a los machos con círculos (n=27). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican las diferencias existentes entre ratones con el mismo genotipo, pero distinta condición (Ns vx Hx). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

Estos resultados coinciden con trabajos previos que demuestran la implicación de la señalización por HIF2 en el endotelio como la responsable del remodelado arterial y la elevación de la presión sistólica del ventrículo derecho, pero añaden el valor de haber realizado una eliminación de HIF2 en distintas poblaciones simultáneamente, dando la ventaja de conocer su papel en la adaptación a Hx crónica de una manera más amplia.

1. 3. 2 HIF2 ES NECESARIO PARA EL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DEL PULMÓN DURANTE HIPOXIA

Tras observar la protección frente al remodelado arterial que presentaban los mutantes *Hif2/Wt1* cKO después de la exposición a Hx crónica, y para estudiar la importancia de la señalización de HIF2 en el linaje *Wt1*, a continuación, decidimos llevar a cabo estudios funcionales mediante ecografía bilateral pulmonar y cardiaca derecha en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en condiciones de Nx y tras 2 y 3 semanas de Hx (Hx2 e Hx3, respectivamente). Con los análisis de ecografía cardiaca derecha obtuvimos el parámetro AT/ET [tiempo de aceleración (AT) *versus* tiempo de eyección (ET)], que refleja de manera indirecta fallo pulmonar y/o cardiaco debido a la resistencia ofrecida por la arteria pulmonar sobre el VD. Como se aprecia en la **Figura 15**, aunque los cambios no fueron significativos, observamos una tendencia de empeoramiento tanto en los ratones control (WT) como en los mutantes (KO) tras 3 semanas de Hx (menor valor de AT/ET).

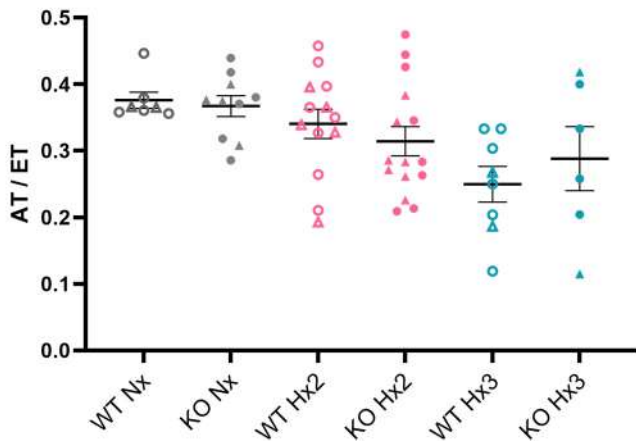


Figura 15. Evaluación indirecta de fallo cardiopulmonar por ecocardiografía.

Representación gráfica de los valores medidos por ecografía del parámetro AT/ET en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en condiciones de normoxia (Nx, puntos grises) y tras 2 (Hx2, puntos rosas) o 3 (Hx3, puntos azules) semanas de hipoxia. Gráfico de puntos en el que cada uno representa un individuo, mostrando a las hembras con triángulos (n=20) y a los machos con círculos (n=37). No se aprecian diferencias significativas. Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey.

Para confirmar esta tendencia, se completó el estudio ecográfico con un plano longitudinal bilateral de pulmón para obtener el denominado "MoLUS score" (del inglés, *Mouse Lung Ultrasound Score*). El índice MoLUS fue descrito por la Dra. María Villalba et al. en 2017 (95) y surgió por la necesidad de los investigadores de estudiar la progresión de la insuficiencia cardiaca en sus modelos murinos de una manera no invasiva. Con este plano longitudinal del pulmón es posible valorar el estado de la membrana y espacio pleural y los lóbulos pulmonares. El índice MoLUS se obtiene integrando el valor que se asigna a distintas medidas ecográficas pulmonares dependiendo de la severidad. En concreto, se catalogan distintos parámetros a los que se les da un valor entre 0 y 4, siendo 0 la ausencia total de alteraciones pulmonares y 4 el máximo nivel, según la tabla descrita en M Villalba et al., (95). Así, el índice MoLUS es el resultado de la suma de los valores numéricos que se le da al estado de la pleura teniendo en cuenta: el deslizamiento pleural, que hace referencia a cuánto se desplaza la pleura sobre el pulmón en cada respiración; el grosor de la pleura, que es un indicativo de presión en el espacio pleural; si hay o no defectos en su morfología y si hay o no derrame pleural, que suele localizarse entre el espacio intercostal y la pleura y cuya mera presencia es un signo de severidad. Además, también se suman los parámetros que hacen referencia a la integridad del pulmón como: el patrón de las líneas pulmonares, en el que se valora el perfil de *líneas A* (líneas horizontales que indican la presencia de aire en el pulmón) y *líneas B* (líneas verticales largas y bien definidas con forma de cometa que indican artefactos o líquido en el pulmón); el perfil de color, que es un parámetro que va en consonancia con el anterior y hace referencia al color predominante en la ecografía y si hay o no líneas Z, que son líneas verticales cortas bajo la pleura que no llegan al borde del pulmón.

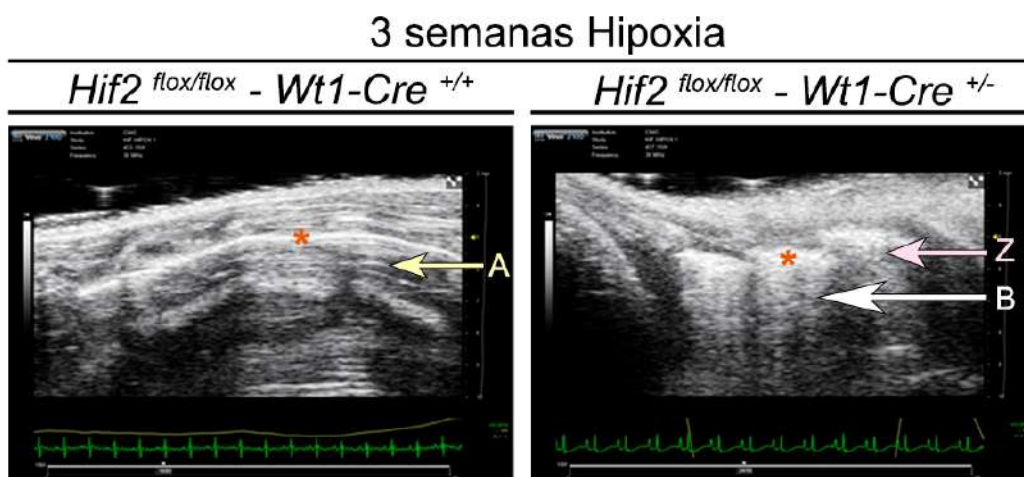


Figura 16. Caracterización funcional del pulmón por ecografía. Imágenes representativas del plano longitudinal de un pulmón de ratón control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) y un ratón mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho) tras 3 semanas de exposición a hipoxia. Los asteriscos naranjas indican en ambas imágenes la localización de la pleura. Las flechas indican los tipos de líneas que pueden apreciarse en cada imagen. En la imagen de la izquierda las únicas bandas que se ven son horizontales, correspondientes a bandas A, propias de un pulmón con aire. En la imagen de la derecha se pierden las bandas A y aparecen tanto bandas B (largas y verticales) como bandas Z (pequeñas, pegadas a la pleura), ambas perpendiculares a la pleura e indicativas de líquido libre en el pulmón.

Como puede apreciarse en la **Figura 16**, donde se muestran dos imágenes representativas de un plano longitudinal de pulmón de un ratón control (izquierda, *Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*) y un mutante *Hif2/Wt1* cKO (derecha, *Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) tras 3 semanas de Hx, los ratones control no presentan signos de severidad, observándose la pleura (asterisco naranja) como una línea clara continua blanca sin defectos morfológicos, engrosamientos o problemas en el deslizamiento sobre el pulmón. Además, el color predominante en la imagen es el negro, habiendo sólo *líneas A* (horizontales) blancas a lo largo de todo el tejido pulmonar, indicativo de la presencia de aire en el pulmón. Sin embargo, la pleura del ratón mutante (asterisco naranja) se aprecia claramente engrosada, no deslizándose adecuadamente sobre el pulmón. El color predominante en este caso es el blanco, con total ausencia de *líneas A* (horizontales) y una clara presencia de *líneas B* (verticales desde la pleura hasta el final del tejido pulmonar) y algunas *líneas Z* (horizontales pequeñas bajo la pleura que no alcanzan el tejido pulmonar), indicando la presencia de líquido libre en el pulmón. En base a las imágenes ecográficas, asignamos valores a cada parámetro ajustándonos a la tabla de valores del índice MoLUS descrito por la Dra. María Villalba et al., (95) (**Figura 17**), que reflejaba un claro empeoramiento de la capacidad funcional de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) tras 3 semanas de Hx (Hx3) frente al ligero empeoramiento de los controles (WT) tras el mismo periodo de Hx o en relación a los valores de los ratones en Nx (KO Nx).

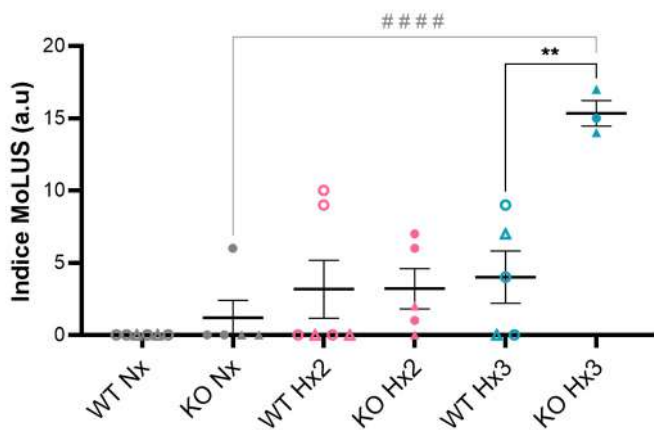


Figura 17. Índice MoLUS. Representación gráfica de los valores obtenidos tras la suma de cada una de las variables para obtener el índice MoLUS en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en condiciones de normoxia (NX, puntos grises) y tras 2 (Hx2, puntos rosas) o 3 (Hx3, puntos azules) semanas de hipoxia. El sexo de los ratones se muestra con triángulos para las hembras (n=12) y círculos para los machos (n=18). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran diferencias estadísticas significativas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

Estos resultados indican que a pesar de la protección frente al remodelado vascular y elevación de la PSVD (**Figura 13** y **Figura 14**), los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO desarrollan una evidente disfunción pulmonar con alteraciones severas de la pleura y clara presencia de líquido libre en el pulmón (**Figura 16** y **Figura 17**).

1. 3. 3 LA ESTABILIDAD DEL PARÉNQUIMA Y LA VASCULATURA ALVEOLAR EN RESPUESTA A HIPOXIA DEPENDEN DE LA SEÑALIZACIÓN DE HIF2

A la vista de los hallazgos anteriores, a continuación, decidimos analizar en más detalle el tejido pulmonar de los ratones control y los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) al terminar un periodo de 3 semanas de exposición a Hx, cuando los estudios funcionales y el índice MoLUS presentaron cambios más significativos (**Figura 17**). En primer lugar, realizamos un análisis macroscópico de los pulmones para valorar si apreciábamos diferencias visuales entre ambos genotipos. Como puede comprobarse en las imágenes de la **Figura 18**, los pulmones del ratón control (*Hif2^{flx/flx}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) presentaban una coloración normal, entre rosada y blanquecina y estaban bien aireados (señalado por las flechas azules donde se observa que todo el tejido pulmonar presenta burbujas de aire en su interior). Sin embargo, en las imágenes representativas de los pulmones de un ratón mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flx/flx}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores), se evidenciaron claramente hemorragias internas, presentando un intenso color rojo. Además, aunque algunos lóbulos parecían estar bien aireados (flecha azul) a pesar de la hemorragia, otros aparecieron completamente colapsados (flechas blancas) sin ninguna evidencia de aireación (burbujas) y un color rojo aún más oscuro.

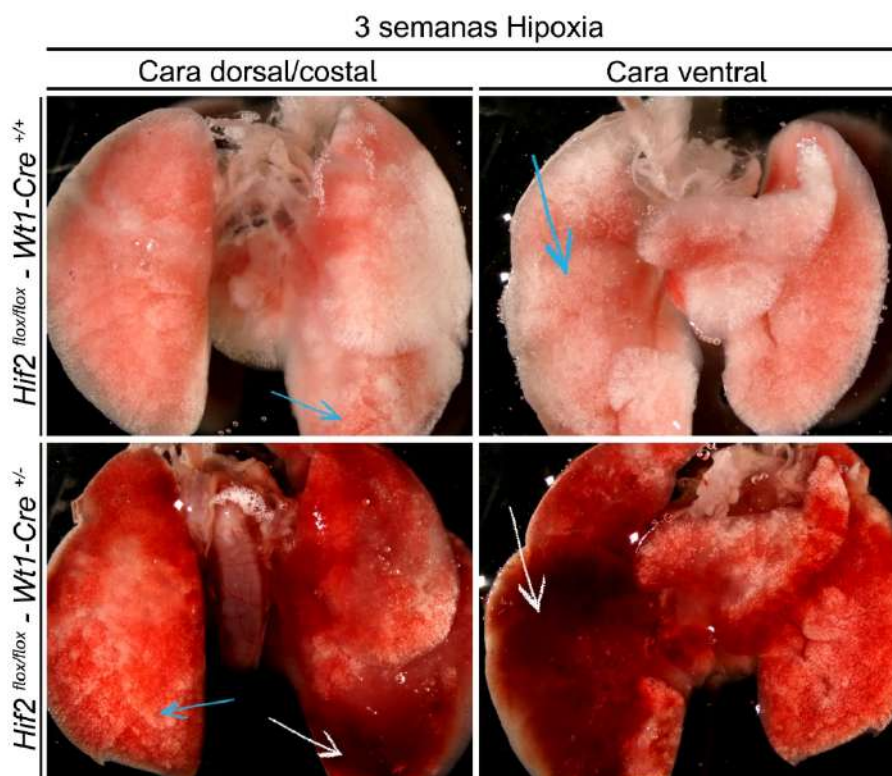


Figura 18. Análisis macroscópico de los pulmones tras la exposición a hipoxia crónica. Imágenes representativas de pulmones de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) tras 3 semanas de exposición a hipoxia crónica. Las imágenes de la izquierda se corresponden con la cara dorsal de los pulmones y las imágenes de la derecha, con la cara ventral. Las flechas azules señalan zonas bien aireadas con presencia de burbujas, mientras que las flechas blancas indican zonas colapsadas, sin aireación y con una tonalidad roja oscura, compatible con hemorragias. Fotografías a 0,8X con lupa Leica MZFLIII.

Para determinar el origen de la presencia de líquido libre en el pulmón que observábamos por ecografía y que tras la valoración macroscópica parecía tratarse de sangre, realizamos un examen más exhaustivo del tejido pulmonar en cortes de parafina teñidos con HE en ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) tras 2 y 3 semanas de Hx (**Figura 19** y **Figura 20** respectivamente).

El análisis histológico detallado del parénquima alveolar reveló que a las 2 semanas de Hx se producía un engrosamiento de la pared de los alveolos en el ratón mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) respecto al control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*) (**Figura 19**).

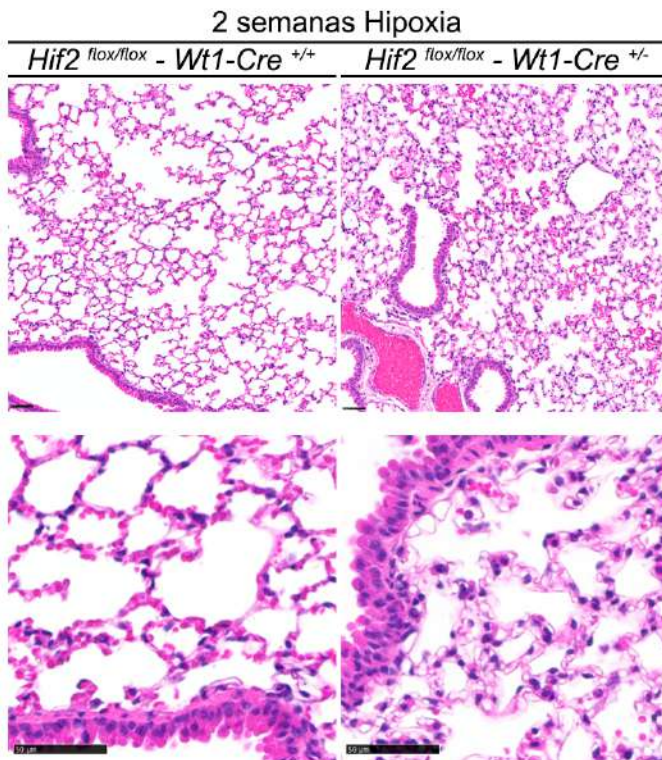


Figura 19. Caracterización histológica pulmonar tras 2 semanas de hipoxia. Imágenes mostrando secciones representativas de cortes de parafina teñidos con HE procedentes de tejidos pulmonar de ratones control (*Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/+}*, paneles izquierdos) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/-}*, paneles derechos) tras 2 semanas de exposición a hipoxia crónica. Los paneles inferiores son magnificaciones de los superiores. Barras de escala de 50µm en todas las imágenes.

Asimismo, tras 3 semanas de Hx al 10% O₂, se evidenció una fuerte congestión pulmonar en animales mutantes *Hif2/Wt1* cKO por presencia de eritrocitos, tanto en el espacio alveolar, como en arterias y arteriolas respecto a controles (**Figura 20**). Estos resultados refuerzan el valor obtenido para el MoLUS score en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO, ya que según M. Villalba et al., (95), un aumento en el MoLUS está asociado a mayor congestión pulmonar.

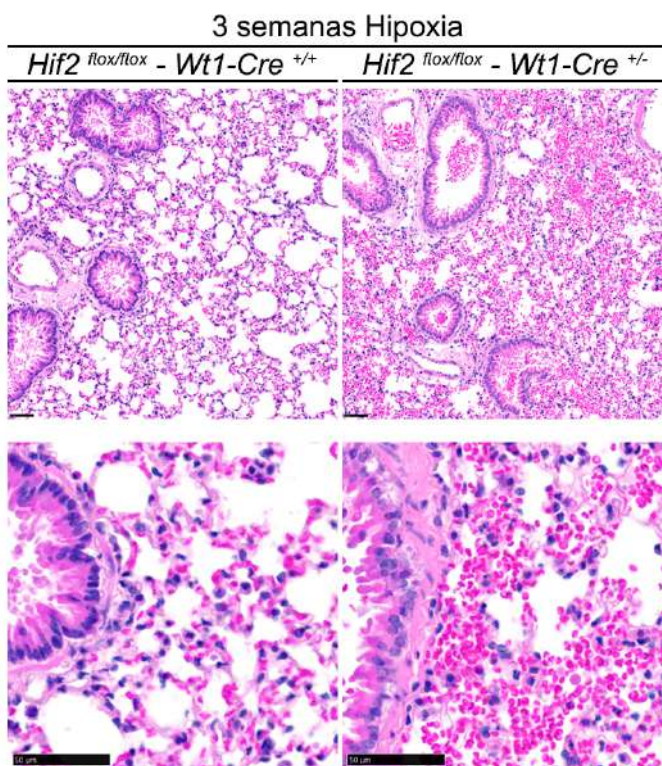


Figura 20. Caracterización histológica pulmonar tras 3 semanas de hipoxia. Imágenes mostrando secciones representativas de cortes de parafina de pulmón teñidos con HE procedentes de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles izquierdos) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles derechos) tras 3 semanas de exposición a hipoxia crónica. Los paneles inferiores son magnificaciones de los superiores. Barras de escala de 50µm en todas las imágenes.

Estas alteraciones se tradujeron en una reducción significativa del espacio alveolar, y por tanto de la superficie de intercambio gaseoso en los animales deficientes para Hif2 tanto a 2 como a 3 semanas de exposición a Hx (**Figura 21**).

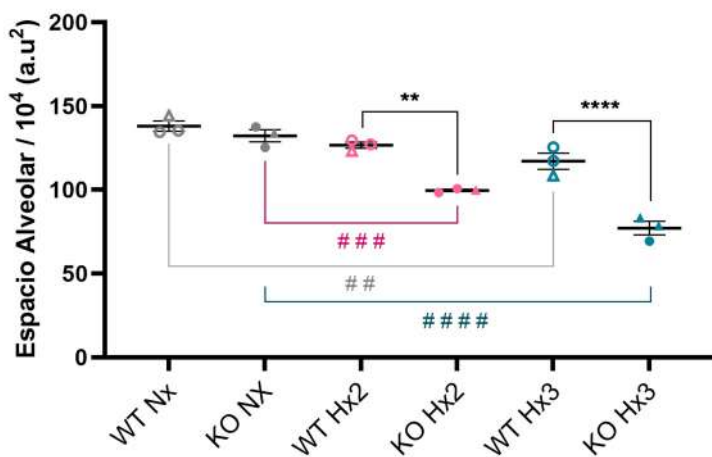


Figura 21. Representación gráfica del espacio alveolar. Cuantificación del espacio alveolar relativo disponible en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) tanto en normoxia (Nx, puntos grises) como tras 2 (Hx2, puntos rosas) o 3 (Hx3, puntos azules) semanas de exposición a hipoxia crónica. Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=7) y círculos para los machos (n=11). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican las diferencias existentes entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

En conjunto, estas observaciones explicarían la aparición de *líneas B y Z* observadas en las ecografías pulmonares (**Figura 16**) que indicaban la presencia de líquido libre y congestión pulmonar. Además, en las tinciones de HE a 3 semanas de Hx pudimos apreciar una mayor cantidad de MFAs en los ratones *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) en comparación con los controles (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*) (**Figura 22**), así como el hecho de que muchos de ellos estaban cargados con hemosiderina, indicativo de que esos macrófagos han fagocitado eritrocitos, fenómeno conocido como eritrofagocitosis.

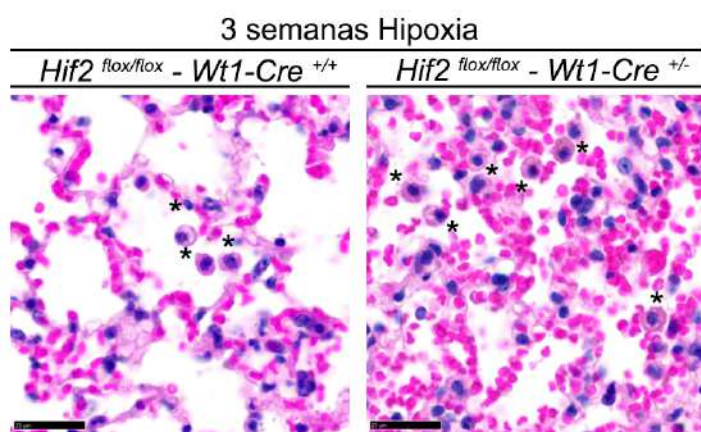


Figura 22. Identificación de macrófagos alveolares tras exposición a hipoxia. Imágenes representativas de secciones de pulmón en cortes de parafina teñidos con HE procedentes de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho) tras la exposición a 3 semanas de hipoxia. Los MFAs se indican en ambas imágenes con (*). Barras de escala en ambas imágenes de 25 μ m.

Para confirmar esta expansión de la población de MFAs en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO, se realizó una IF combinando marcadores para MFAs (IB4, rojo) y proliferación celular (Ki67, blanco). Los núcleos se cotiñeron con Dapi (azul). Como puede observarse en el canal magenta de la **Figura 23A** y su respectiva cuantificación en la **Figura 23B**, constatamos un claro aumento de la población de MFAs en los pulmones de los ratones *Hif2/Wt1* cKO en comparación con los controles, y además, el marcador de proliferación Ki67 nos permitió comprobar que los MFAs no sólo eran más abundantes en el tejido del ratón mutante, sino que además, muchos de ellos estaban proliferando (flechas amarillas sobre **Figura 23C**).

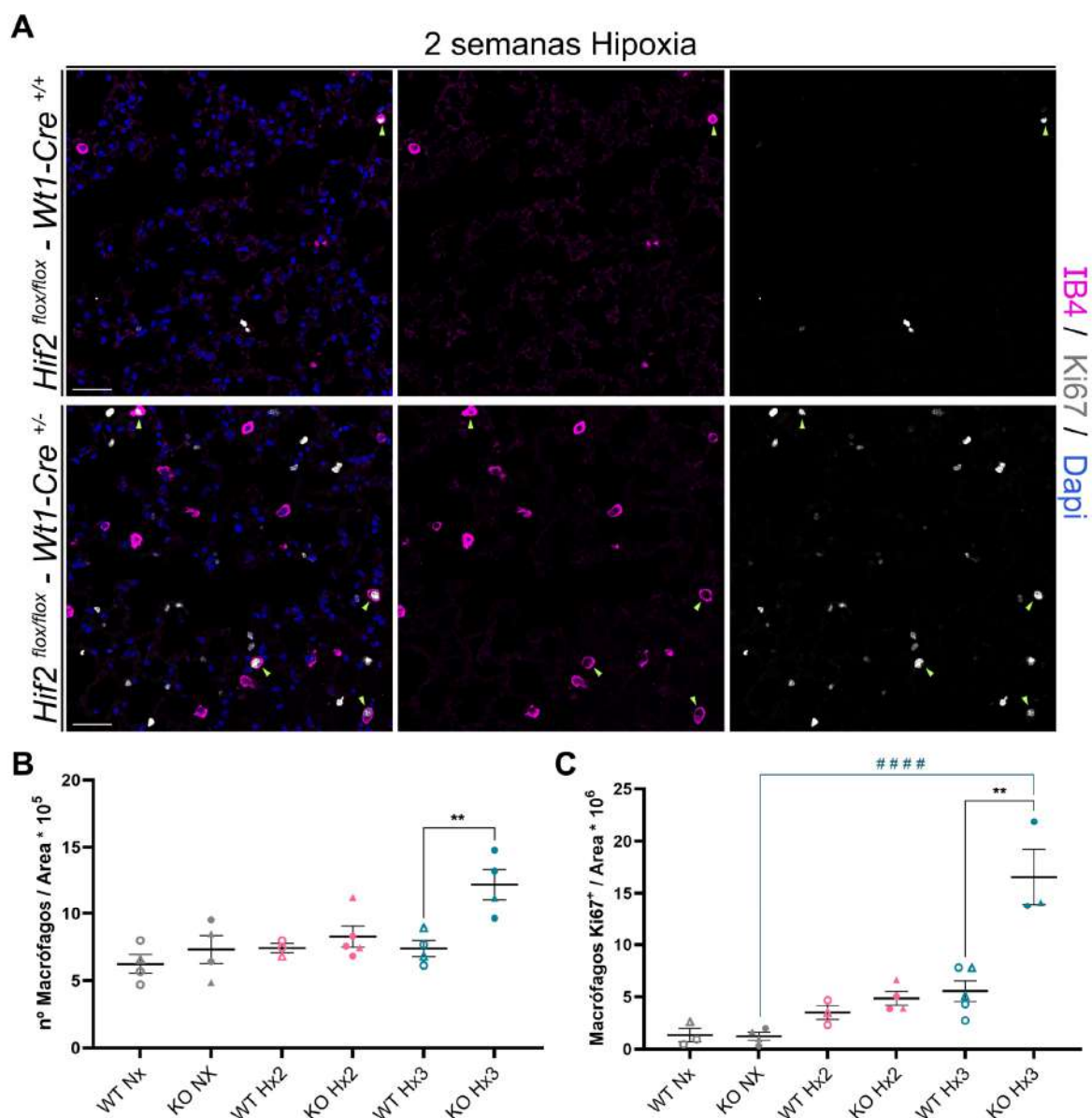


Figura 23. Inflamación en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras exposición a hipoxia crónica.

A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de ratones control (*Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) tras exposición a 2 semanas de hipoxia. MFAs marcados con IB4 (magenta), mitosis con Ki67 (blanco) y núcleos coteñidos con Dapi (azul). Los MFAs proliferantes se indican en ambas imágenes con flechas amarillas. Barras de escala 40µm. **B)** Representación gráfica de la cuantificación del número de MFAs por área

en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) tanto en normoxia (NX, puntos grises) como tras 2 o 3 semanas de exposición a hipoxia crónica (Hx2, puntos rosas o Hx3, puntos azules, respectivamente). **C)** Cuantificación del número de MFAs proliferantes por área de tejido en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) tanto en normoxia (NX, puntos grises) como tras 2 (Hx2, puntos rosas) o 3 semanas de exposición de hipoxia crónica (Hx3, puntos azules). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=9) y círculos para los machos (n=15). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran diferencias estadísticas significativas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$

Dado que ya habíamos confirmado que *Wt1* no contribuye a los MFAs (**Figura 6**), estos resultados sugieren que los cambios en esta población son indirectos y secundarios a las alteraciones vasculares que presentan los pulmones de los ratones deficientes en HIF2 en el linaje *Wt1* tras la exposición a Hx crónica.

Para validar esta hipótesis sobre los defectos en los vasos como posible origen del aumento de MFAs, nos planteamos que podría haber alteraciones vasculares no sólo a nivel de las arteriolas, sino también del endotelio del parénquima alveolar. Para investigarlo, realizamos ensayos de IF combinando un marcador de linaje de CEs (ERG, cyan) junto con un marcador de proliferación (Ki67, blanco). Los núcleos se cotiñeron con Dapi (azul). Las flechas rosas sobre la **Figura 24A** señalan CEs (positivas para ERG) que además están proliferando (positivas para Ki67) tanto en ratones control (*Hif2^{fllox/fllox}/Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) como mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{fllox/fllox}/Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores). Como puede apreciarse en la imagen y además en la cuantificación de la **Figura 24B**, había un aumento sustancial de CEs que proliferan en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO en comparación con los controles.

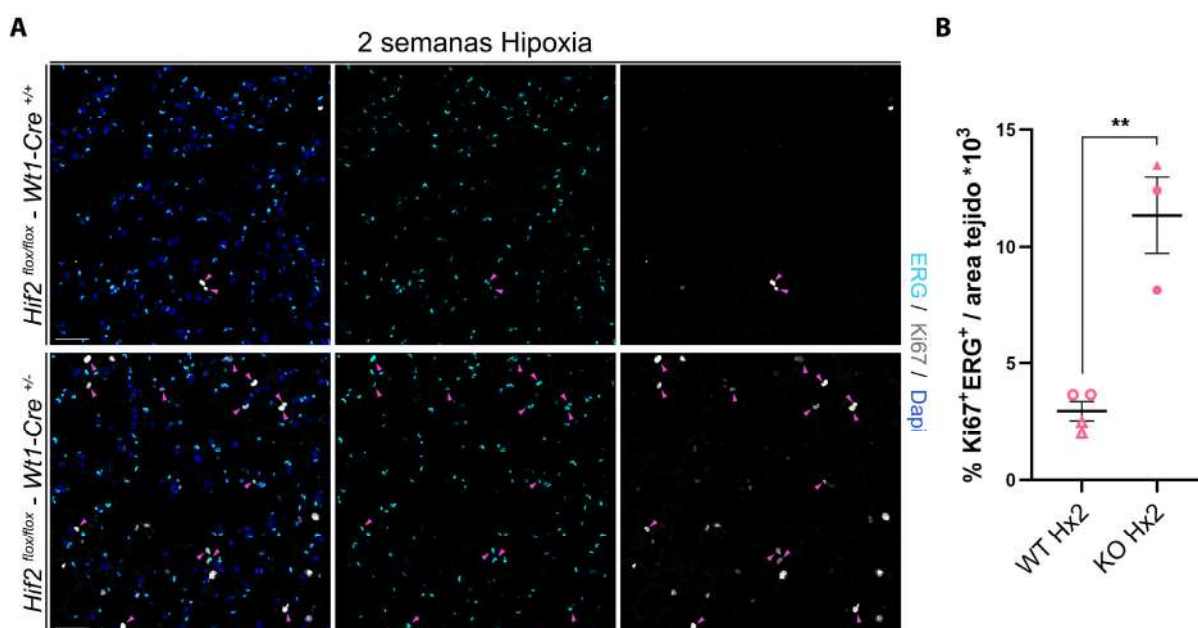


Figura 24. Inestabilidad microvascular en respuesta a hipoxia crónica. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de ratones control ($Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/+}$, paneles superiores) y mutantes $Hif2/Wt1$ cKO ($Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}$, paneles inferiores) tras la exposición a 2 semanas de hipoxia. CEs (ERG, cyan), mitosis (Ki67, blanco) y núcleos coteñidos con Dapi (azul). Las flechas magenta indican células dobles positivas $ERG^{+}/Ki67^{+}$. Barras de escala 40 μ m. **B)** Representación gráfica de la cuantificación del número de CEs proliferantes por área tras 2 semanas de exposición a hipoxia crónica (Hx2) en ratones control (WT) y mutantes $Hif2/Wt1$ cKO (KO). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=3) y círculos para los machos (n=4). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

A la vista de la expansión del endotelio del parénquima alveolar observada por IF, a continuación, quisimos averiguar si había diferencias entre las distintas poblaciones contribuidas por *Wt1* de manera cuantitativa utilizando los ratones reporteros control (*Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre*, $Tomato^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}$) y mutante para HIF2 (*Hif2lox-Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* [reportero *Hif2/Wt1* cKO], $Hif2^{lox/lox}-Tomato^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}$). Para ello, en primer lugar, analizamos el patrón tisular que presentaba el reportero Tomato (células con linaje *Wt1*, magenta) en IF con los núcleos coteñidos con Dapi (azul) en cortes de OCT de pulmones de ratones control ($Tomato^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}$, paneles superiores) y mutantes HIF2 ($Tomato^{lox/lox}-Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}$, paneles inferiores) en Nx y tras 2 semanas de Hx (**Figura 25A**). Como puede apreciarse en las imágenes representativas, observamos un claro aumento de la señal de Tomato tras 2 semanas de Hx en el ratón mutante reportero *Hif2/Wt1* cKO respecto al control reportero.

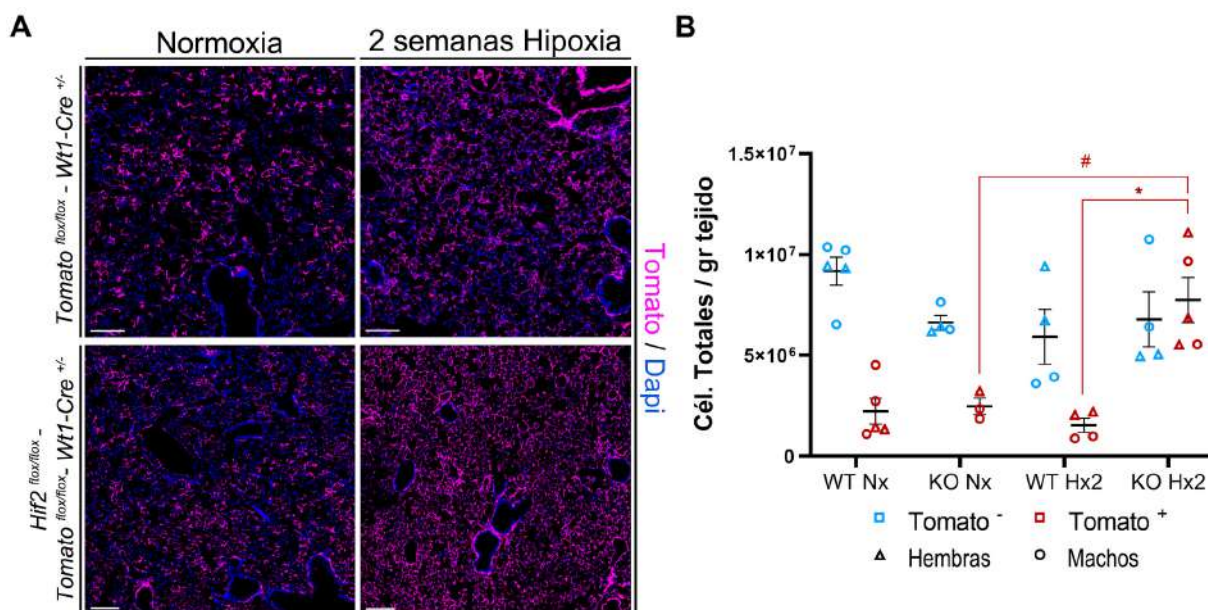


Figura 25. Análisis celular del linaje *Wt1* en el pulmón tras exposición a hipoxia crónica. A) Inmunofluorescencia representativa de la señal de Tomato (magenta) sobre cortes de OCT de pulmones de ratones reporteros control *Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* ($Tomato^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}$, paneles superiores) y mutantes *Hif2lox-Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* cKO ($Tomato^{lox/lox}-Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}$),

paneles inferiores. Los núcleos se cotiñeron con Dapi (azul). Las imágenes representativas de la izquierda corresponden a pulmones de ratones que estuvieron en condiciones de normoxia mientras que las de la derecha son imágenes de ratones que fueron sometidos a 2 semanas de exposición a hipoxia. Barras de escala 200 μ m. **B)** Representación gráfica de la cuantificación del número total de células CD45⁻ por gramo de tejido Tomato⁻ (puntos azules) y Tomato⁺ (puntos rojos) en ratones reporteros control Rosa-tdTomato/Wt1Cre (WT) y mutantes Rosa-tdTomato/Hif2 cKO (KO) en condiciones de normoxia (Nx) y tras 2 semanas de exposición a hipoxia (Hx2). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=16) y círculos para los machos (n=18). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición. Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P \leq 0,05; ** P \leq 0,01; *** P \leq 0,001; **** P \leq 0,0001.

Este cambio cualitativo de la señal de Tomato que presentaban los mutantes de HIF2 tras la exposición a Hx, se confirmó mediante análisis por citometría de flujo/FACS, en los que pudimos apreciar un cambio cuantitativo en el número total de células por gramo de tejido Tomato⁺ (linaje Wt1) en el mutante en Hx en comparación con el control en Hx o el mutante en Nx. Sin embargo, no observamos cambios significativos en el total de células por gramo de tejido en células Tomato⁻ no contribuidas por el linaje Wt1 (**Figura 25B**).

Este aumento en el número total de células Tomato⁺ podría explicarse por el aumento de las CEs Tomato⁺ en el ratón mutante reportero *Hif2/Wt1* cKO tras la exposición a 2 semanas de Hx en comparación con el control en Hx o el mutante *Hif2/Wt1* cKO en Nx (**Figura 26A**), confirmando las observaciones realizadas por IF en la **Figura 24A** y su cuantificación en la **Figura 24B**. Además, este aumento en la población de CEs también se apreciaba en la nube de puntos de densidad celular sobre las regiones (*gates*) definidas por citometría de flujo en la **Figura 26B**, donde se muestran los cambios en las poblaciones Tomato⁻ (subrayado en azul) entre el ratón reportero control (panel de la izquierda) y el reportero mutante (panel derecho), así como en la **Figura 26C**, donde se muestran los cambios en las poblaciones Tomato⁺ (subrayado en rojo) entre el ratón reportero control (panel de la izquierda) y el reportero mutante (panel derecho) tras 2 semanas de Hx.

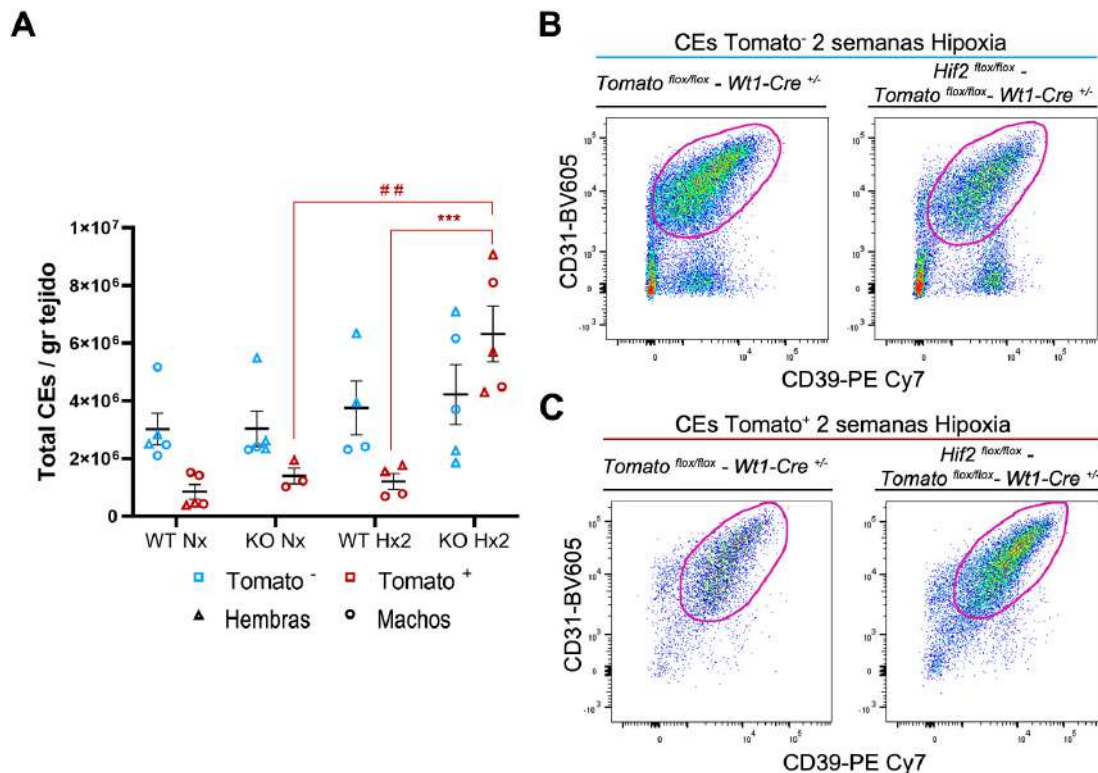


Figura 26. Análisis de los cambios en el endotelio pulmonar tras exposición a hipoxia crónica mediante citometría de flujo. A) Representación gráfica de la cuantificación del número total de CEs por gramo de tejido Tomato⁻ (puntos azules) y Tomato⁺ (puntos rojos) en ratones reporteros control Rosa-tdTomato/Wt1Cre (WT) y mutantes Rosa-tdTomato/Hif2 cKO (KO) en condiciones de normoxia (Nx) y tras 2 semanas de exposición a hipoxia (Hx2). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=16) y círculos para los machos (n=18). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001. **B, C)** Nube de puntos representativas de los análisis de FACS mostrando la densidad de CEs (sobre un total fijo de 24000 células CD45⁻) Tomato⁻ (**B**) y Tomato⁺ (**C**) delimitadas por una línea rosa tanto en ratones reporteros control Rosa-tdTomato/Wt1Cre (*Tomato^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles izquierdos) como mutantes Rosa-tdTomato/Hif2 cKO (*Tomato^{fllox/fllox}-Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles derechos).

Puesto que el linaje Wt1 en pulmón también contribuye a otra población pulmonar vascular esencial, los PCs (**Figura 5**), ampliamos estos análisis a este tipo celular. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en el número total de PCs Tomato⁺ por gramo de tejido entre los ratones control y mutantes en Nx, ni tras 2 semanas de exposición a Hx, aunque sí apreciamos una tendencia no significativa de esta población a aumentar en los ratones mutantes reporteros Rosa-tdTomato/Hif2 cKO (KO) frente a controles Rosa-tdTomato/Wt1Cre (WT) en Hx o al mutante Rosa-tdTomato/Hif2 cKO (KO) en Nx (**Figura 27A**). Estas observaciones también fueron evidentes en gráficos representativos de las nubes celulares correspondientes a PCs en los análisis de FACS mostrados en los paneles B (células Tomato⁻, subrayado en azul) y C (células Tomato⁺, subrayado en rojo) de la **Figura 27**, donde se aprecia

cierto aumento de la nube de puntos correspondiente a la población de PCs Tomato^+ en el mutante reportero $\text{Hif2}/\text{Wt1}$ cKO en Hx respecto al control reportero.

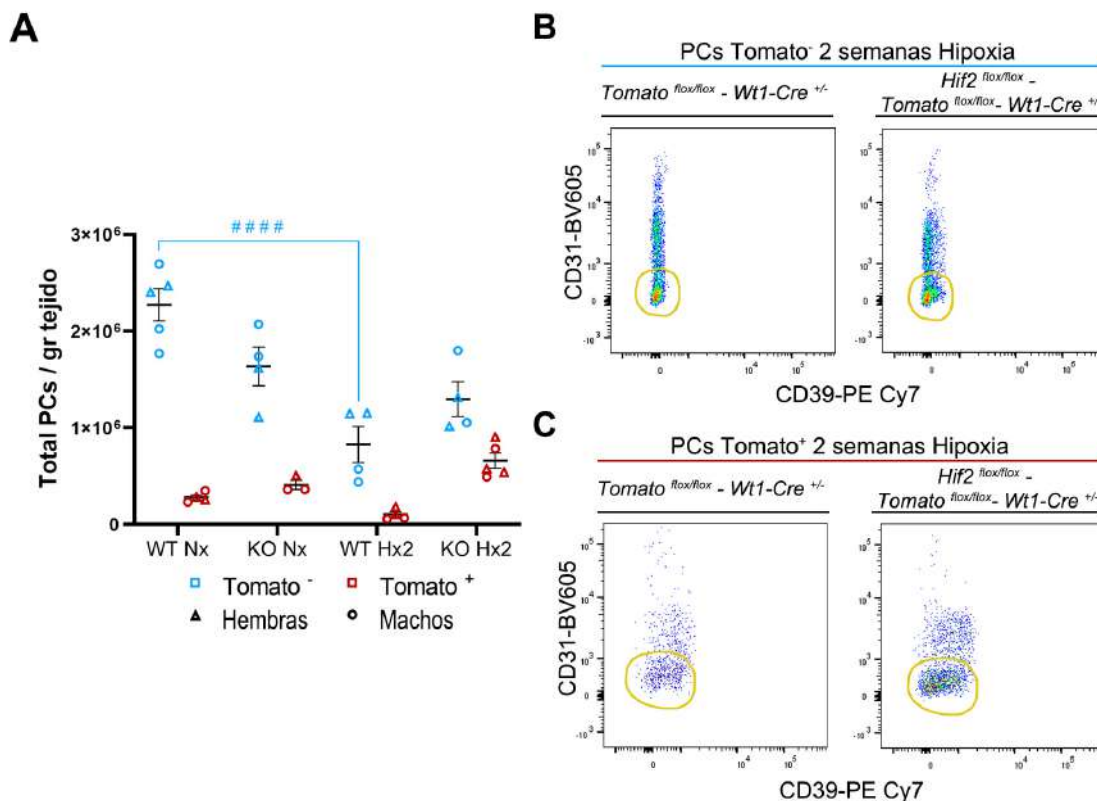


Figura 27. Análisis de los cambios en la población de PCs en pulmón tras exposición a hipoxia crónica mediante citometría de flujo. A) Representación gráfica de la cuantificación del número total de PCs por gramo de tejido Tomato^- (puntos azules) y Tomato^+ (puntos rojos) en ratones reporteros control $\text{Rosa-tdTomato}/\text{Wt1Cre}$ (WT) y mutantes $\text{Rosa-tdTomato}/\text{Hif2}$ cKO (KO) en condiciones de normoxia (Nx) y tras 2 semanas de exposición a hipoxia (Hx2). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=16) y círculos para los machos (n=18). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (#) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de distintas condiciones (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. **B, C)** Nube de puntos representativas de los análisis FACS mostrando la densidad de PCs (sobre un total fijo de 24000 células CD45^-) Tomato^- (**B**) y Tomato^+ (**C**) delimitados por una línea amarilla tanto en ratones reporteros control $\text{Rosa-tdTomato}/\text{Wt1Cre}$ ($\text{Tomato}^{\text{fllox/fllox}} - \text{Wt1-Cre}^{+/-}$, paneles izquierdos) como mutantes reporteros $\text{Rosa-tdTomato}/\text{Hif2}$ cKO ($\text{Hif2}^{\text{fllox/fllox}} - \text{Tomato}^{\text{fllox/fllox}} - \text{Wt1-Cre}^{+/-}$, paneles derechos).

En resumen, el conjunto de estos resultados revela que, aunque la eliminación de HIF2 en el compartimento Wt1 que engloba CEs, PCs y CMLs de las arterias y submucosa bronquial protege al pulmón del remodelado vascular y de la elevación de la PSVD característicos de la aparición de HP, tiene otros efectos perjudiciales para el correcto funcionamiento pulmonar y su adaptación a Hx crónica. Estos defectos incluyen una proliferación acentuada del endotelio capilar que probablemente resulta en una inestabilidad microvascular que favorece la extravasación de eritrocitos al parénquima pulmonar, el engrosamiento de la pared alveolar y

la congestión por extravasación de eritrocitos y presencia de macrófagos alveolares tras exposición crónica a Hx.

2. PAPEL DE HIF2 EN EL LINAJE CARDIACO Wt1 BASALMENTE Y EN RESPUESTA A HIPOXIA CRÓNICA

En contraste con el amplio conocimiento sobre el papel de HIF2 en el pulmón durante la progresión de HP, la importancia de la señalización mediada por HIF2 en corazón es muy limitada más allá de algunos estudios de isquemia (104). Por ese motivo, y dado que el pulmón y el corazón están estrechamente relacionados funcional y fisiológicamente, consideramos relevante para esta tesis doctoral estudiar en detalle el papel de HIF2 en la adaptación a Hx crónica en las poblaciones contribuidas por Wt1. Nuestros hallazgos podrían contribuir a esclarecer el papel desconocido de HIF2 en corazón, así como a establecer una conexión entre los defectos que puedan tener los cambios pulmonares en respuesta a Hx crónica sobre el corazón.

2.1 ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE Wt1 A POBLACIONES CARDIACAS

La función clave de Wt1 durante la formación del corazón o cardiogénesis ha sido bien establecida (89, 91), siendo el mutante de Wt1 letal embrionario a día E16,5-E18,5 de gestación (88) y presentando adelgazamiento del miocardio y anomalías en la formación de los vasos coronarios. Wt1 se expresa en un subgrupo de progenitores del epicardio que mediante un proceso de diferenciación epitelio-mesénquima, dan lugar a la vasculatura coronaria del corazón y fibroblastos intersticiales (82, 88, 105). Además, también se ha descrito su contribución a una pequeña población de cardiomiocitos (89, 90) y su expresión en CEs de la microvasculatura (92). Pese a esta caracterización previa del linaje de Wt1 sobre todo en estadios embrionarios, en primer lugar, decidimos confirmar y valorar la contribución de Wt1 a las distintas poblaciones de corazón adulto utilizando nuestro modelo reportero control (Rosa-tdTomato/Wt1Cre, *Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*).

Para ello, realizamos un análisis cualitativo con IF combinando distintos marcadores específicos de linaje y nucleares para los distintos tipos celulares cardiacos junto con la señal del reportero Tomato (magenta) para determinar el solapamiento entre las poblaciones de CMLs (α -SMA, cyan) (**Figura 28A**), CEs (ERG, verde) (**Figura 28B**), PCs (NG2, blanco) (**Figura 28C**) y Fbs (PDPN, amarillo) (**Figura 28D**). Las IFs revelaron que Wt1 contribuía a todos estos linajes celulares, incluidos los PCs, que no habían sido previamente relacionados con progenitores Wt1, ampliando así la información disponible sobre el linaje Wt1 cardiaco.

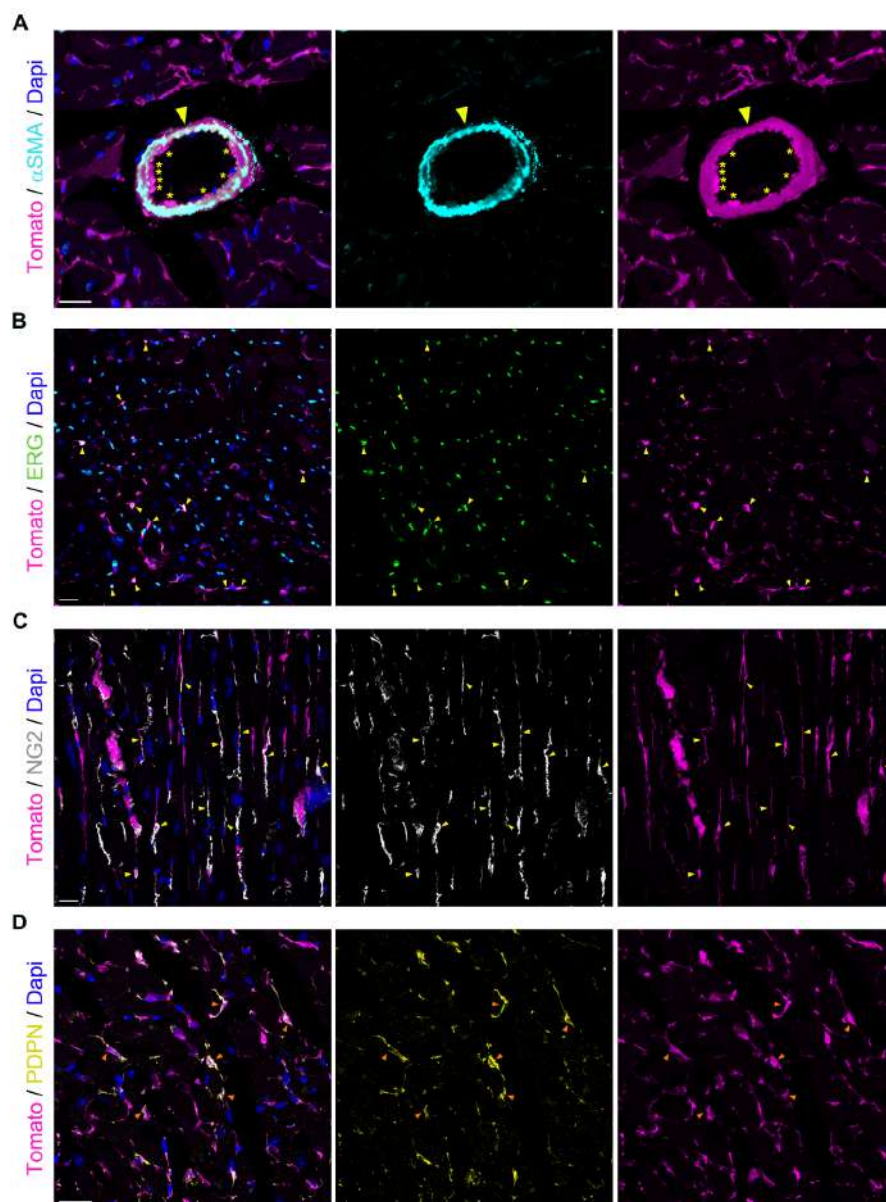


Figura 28.
Contribución del linaje Wt1 a poblaciones cardiacas adultas.
 Inmunofluorescencia sobre cortes en OCT representativos de corazón de ratones reporteros Rosa-tdTomato/Wt1Cre contra **(A)** α SMA (CMLs, cyan); **(B)** ERG (CEs, verde), **(C)** NG2 (PCs, blanco), **(D)** PDPN (FBs, amarillo) y Dapi para coteñir los núcleos. Las flechas tanto amarillas como naranjas indican células dobles positivas en cada imagen. Barras de escala 20 μ m.

Además, también observamos la presencia de pequeños parches de cardiomiocitos (CMs) dispersos tanto en el VD como en el septo interventricular (SIV) y el ventrículo izquierdo (VI) (**Figura 29**), confirmando las observaciones descritas en otros trabajos (87, 90).

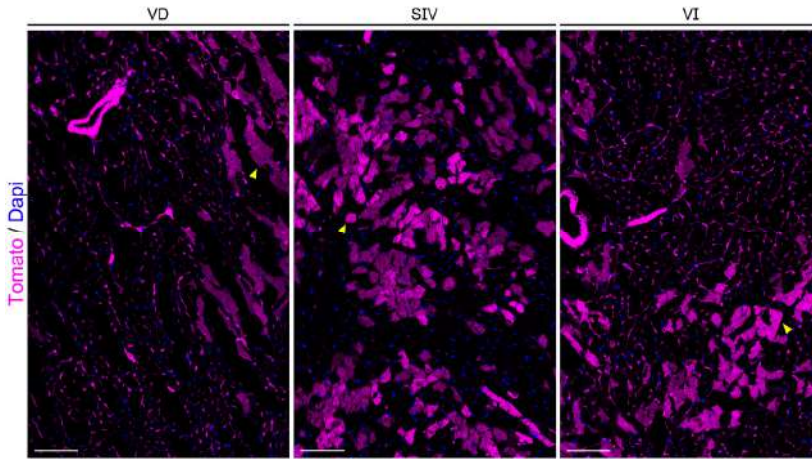


Figura 29. Contribución de Wt1 a CMs. Inmunofluorescencia sobre cortes de OCT representativos de corazón en VD, SIV y VI de ratón reportero control Rosa-tdTomato/Wt1Cre mostrando células de linaje Wt1 (magenta) y núcleos coteñidos con Dapi (azul). Las flechas amarillas indican la señal correspondiente a un CM en cada una de las imágenes. Barras de escala 80µm.

Para confirmar de manera cuantitativa estos hallazgos sobre la contribución de Wt1 en corazón adulto, utilizamos la técnica de citometría de flujo/FACS combinando marcadores de superficie junto con la señal endógena de Tomato. Diseñamos una estrategia de separación y clasificación específica para corazón basada en la selección positiva y negativa de poblaciones según la combinación de marcadores de linaje celular. Así, pudimos esclarecer que la contribución basal del Tomato⁺ en el corazón a la población no miocítica es del 31,4% del total de las células CD45⁻ que se analizaron (**Figura 30A**). Dentro del total de células CD45⁻/Tomato⁺, el 6,4% correspondía a CMLs (CD39⁺/CD90⁺) (**Figura 30B**), el 24% eran PCs (CD90⁺/GP38⁻) (**Figura 30C**), el 50,1% CEs (CD31⁺) (**Figura 30D**) y un 8,4% FBs (CD31⁻/CD90⁻/GP38⁺) (**Figura 30D**).

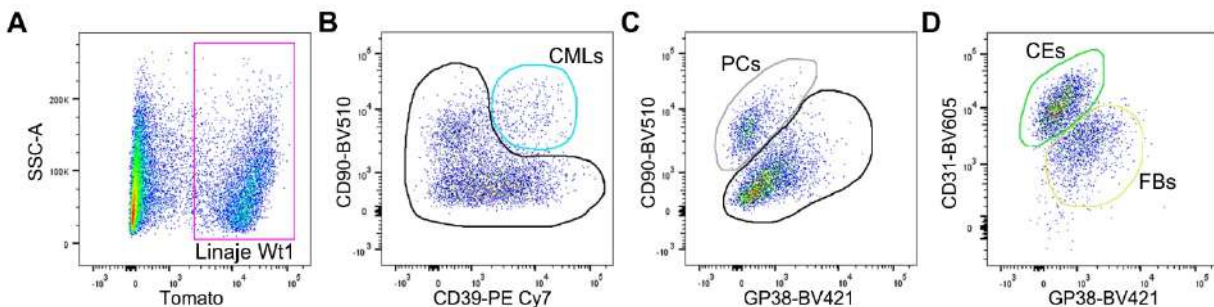


Figura 30. Citometría de Flujo/FACS para el análisis de las poblaciones Wt1⁺ en corazón. Gráficos representativos de la estrategia de clasificación y selección para caracterizar las células del linaje Wt1 en el corazón adulto sobre un total de 34000 células CD45⁻. **A)** las células delimitadas por el rectángulo rosa representan el total de células CD45⁻/Tomato⁺. **B)** Dentro de las CD45⁻/Tomato⁺, la nube de puntos delimitada por la línea azul, a las CMLs (CD90⁺/CD39⁺). El resto de células no caracterizadas en este gráfico se rodean con una línea negra. **C)** Sobre la región de células no caracterizadas en B, distinguimos PCs en gris (CD90⁺/GP38⁻) y el resto de células aun no identificadas se rodean con una línea negra. **D)** De la nube de puntos no identificada en C se obtienen las CEs (CD31⁺/GP38⁻) y los FBs (GP38⁺/CD31⁻).

Con estos análisis de citometría de flujo/FACS pudimos extraer el porcentaje de cada población dentro del total de las células contribuidas por Wt1, como se expone en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Tipo celular	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Media	SD
CEs	45,97	54,46	42,51	54,18	53,22	50,07	5,48
PCS	16,58	26,25	33,08	24,19	20,12	24,04	6,28
FBs	19,57	2,90	4,76	4,86	8,20	8,06	6,72
CMLs	3,13	7,42	7,87	6,42	7,18	6,40	1,90

Tabla 4. Porcentaje de cada población dentro del linaje cardiaco Wt1 (Tomato⁺). Tabla con los valores individuales, la media y la desviación estándar (SD) expresadas en porcentaje de 5 experimentos independientes. Los datos muestran la contribución de cada tipo celular (CEs, PCs, FBs y CMLs) dentro del total de células Wt1⁺ no miocíticas en el corazón.

Además, estos datos también nos permitieron cuantificar dentro de cada población no-miocítica, qué porcentaje estaba contribuido por Wt1 (**Tabla 5**).

Tabla 5

Tipo celular	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Media	SD
CEs	14,59	25,71	21,75	28,76	24,26	23,01	5,35
PCS	76,13	83,60	86,44	79,74	80,52	81,29	3,92
FBs	75,37	41,67	60,77	46,92	57,50	56,44	13,11
CMLs	75,64	78,42	58,55	75,08	78,93	73,32	8,43

Tabla 5. Porcentaje de contribución del linaje cardiaco Wt1 dentro de cada población celular. Tabla con los valores individuales, la media y la desviación estándar (SD) expresados en porcentaje de 5 experimentos independientes. Los datos muestran la contribución de Wt1 dentro de cada población.

En resumen, estos análisis nos permitieron confirmar con distintas estrategias la contribución de Wt1 a CMLs, CEs, FBs y CMs en corazones adultos y además, describir por primera vez que Wt1 también contribuye a PCs en el corazón.

2.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA CARDIACA DE LOS MUTANTES *HIF2/Wt1* cKO EN NORMOXIA

Al igual que en el pulmón, y dado que el modelo de delección de HIF2 es constitutivo y que *Wt1* es importante para la formación del epicardio, arterias coronarias, algunos CMs y FBs intersticiales y, además, contribuye a células de la microvasculatura, incluyendo CEs y PCs, lo primero que nos planteamos fue analizar qué efecto tendría la ausencia de HIF2 desde el desarrollo hasta la edad adulta. Como ya se ha presentado en la **Tabla 3**, la eliminación de HIF2 en el linaje *Wt1* no causaba letalidad embrionaria. Sin embargo, debido a todas las estructuras cardiacas que derivan de células *Wt1*⁺, quisimos explorar si había o no defectos estructurales en los embriones mutantes *Hif2/Wt1* cKO. Para ello, se realizaron cortes en parafina de la región troncal de embriones de día E18,5 y confirmamos que no había evidencias de alteraciones vasculares ni defectos en la formación de ventrículos, aurículas o del árbol aórtico en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel de la derecha) en comparación con los controles (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel de la izquierda) (**Figura 31**).

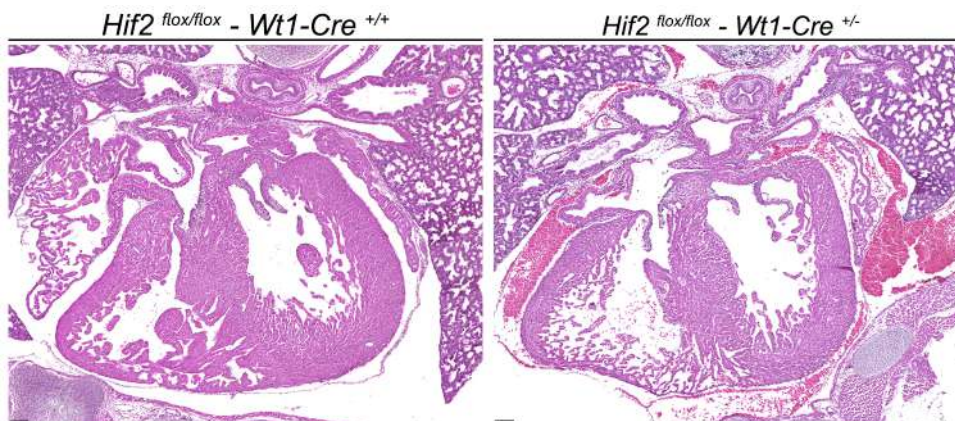


Figura 31. Caracterización histológica del corazón en embriones a E18,5. Imágenes representativas de cortes histológicos en parafina teñidos con HE procedentes de embriones a E18,5 de gestación en ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel de la izquierda) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel de la derecha). Barras de escala 100µm.

Tras confirmar que los embriones no presentaban problemas cardiacos durante el desarrollo, lo siguiente que nos planteamos fue estudiar la estructura del corazón en individuos adultos. En primer lugar, y como una medida indirecta del tamaño del corazón, determinamos el cociente del peso del corazón frente al peso corporal del ratón, el denominado "*Heart Weight/Body weight* (HW/BW) *ratio*" en inglés. Para ello, calculamos el peso de ratones intactos control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) a 14-15 semanas de edad, así como de sus corazones tras una disección post sacrificio. Este análisis reveló que no había cambios significativos entre el HW/BW de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) con respecto a los controles (WT) (**Figura 32A**), lo que indicaba que los corazones de los mutantes *Hif2/Wt1* cKO no eran ni más grandes ni

más pequeños que los de los ratones control en Nx. Además, un examen más detallado de histología sobre cortes en parafina teñidos con HE, nos permitió comprobar que no había diferencias estructurales en cuanto a la formación de cámaras y/o de arterias coronarias, entre los mutantes HIF2 *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) y los controles (*Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/+}*) (Figura 32B).

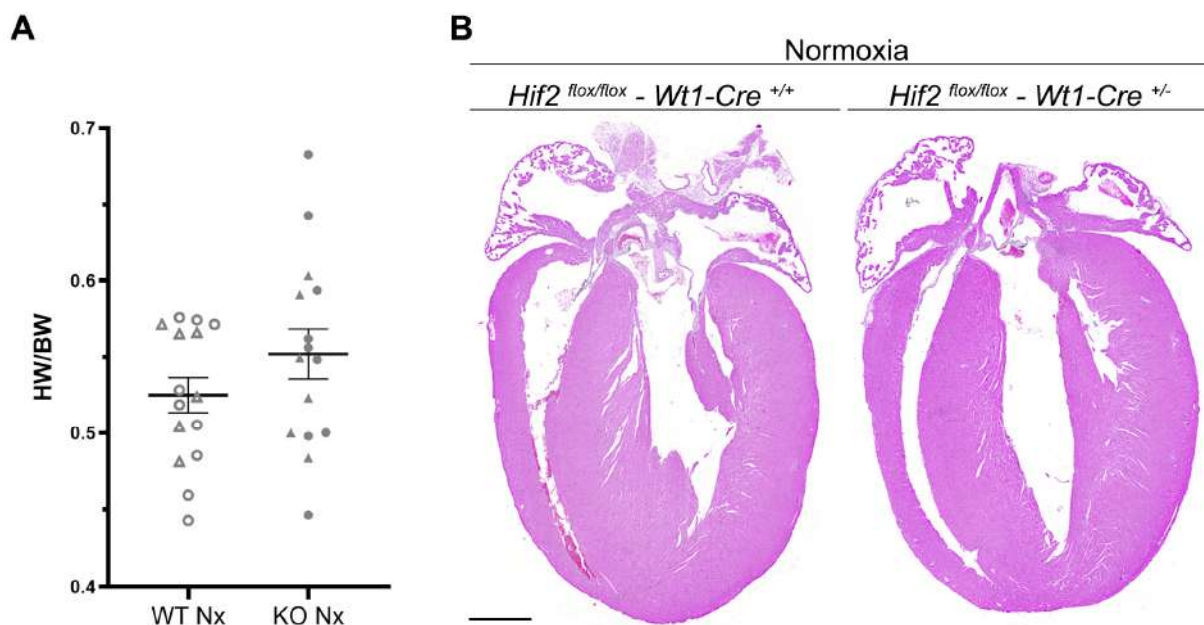


Figura 32. Caracterización del corazón de ratones adultos en normoxia. A) Representación gráfica de los pesos relativos de los corazones en comparación con el peso corporal de los ratones en normoxia (Nx) tanto de controles (WT) como de mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=12) y círculos para los machos (n=18). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico con T-Test, p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. **B)** Imágenes histológicas representativas de secciones de parafina de corazón adulto de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho) teñidas con HE. Barra de escala 1mm.

2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA CARDIACA DE LOS MUTANTES *HIF2/WT1* cKO EN HIPOXIA

A la vista de que los corazones de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO no presentaban alteraciones estructurales ni en desarrollo (Figura 31), ni en la etapa adulta en condiciones basales (Figura 32), y que la falta de HIF2 no afectaba a la supervivencia ni homeostasis (Figura 9, Tabla 3) de los animales, a continuación, quisimos analizar este órgano en ratones adultos deficientes en HIF2 tras el protocolo de exposición a Hx crónica durante 2 y 3 semanas descrito en el apartado anterior (Figura 11).

2. 3. 1 LA ELIMINACIÓN DE HIF2 PROVOCA DISFUNCIÓN CARDIACA TRAS 2 Y 3 SEMANAS DE HIPOXIA

Una vez completados los correspondientes ciclos de 2 ó 3 semanas de Hx, los ratones se extrajeron de la cámara e inmediatamente después se anestesiaron para su estudio funcional por ecocardiografía. Aparte del plano longitudinal lateral del pulmón para obtener los parámetros de función pulmonar descritos en la sección previa (**Figura 15**, **Figura 16** y **Figura 17**), también se realizó un examen exhaustivo del corazón. Esta caracterización ecográfica reveló que la ausencia de HIF2 en el linaje *Wt1* en ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) favorece el desarrollo de hipertrofia cardiaca tanto del VD (**Figura 33A**), como del VI (**Figura 33B**) después de 2, y sobre todo, tras 3 semanas de Hx crónica (Hx2 e Hx3, respectivamente) en comparación con los controles (WT), que permanecen con un grosor de las paredes posteriores semejante al de los valores en Nx. Por otro lado, no observamos alteraciones de la función sistólica del VD (TAPSE) en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en comparación con los controles (WT) ni a 2, ni tras 3 semanas de Hx (**Figura 33C**). En cambio, la función sistólica del VI, también conocida como fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), sí se mostró gravemente comprometida en los ratones *Hif2/Wt1* cKO (KO), mostrando una bajada significativa en comparación con los controles (WT) tras 3 semanas de exposición a Hx (**Figura 33D**). Estas alteraciones del VI en el mutante de *Hif2/Wt1* cKO estaban acompañadas de un aumento del volumen diastólico final, indicativo de dilatación del ventrículo izquierdo (**Figura 33E** y **Figura 33F**).

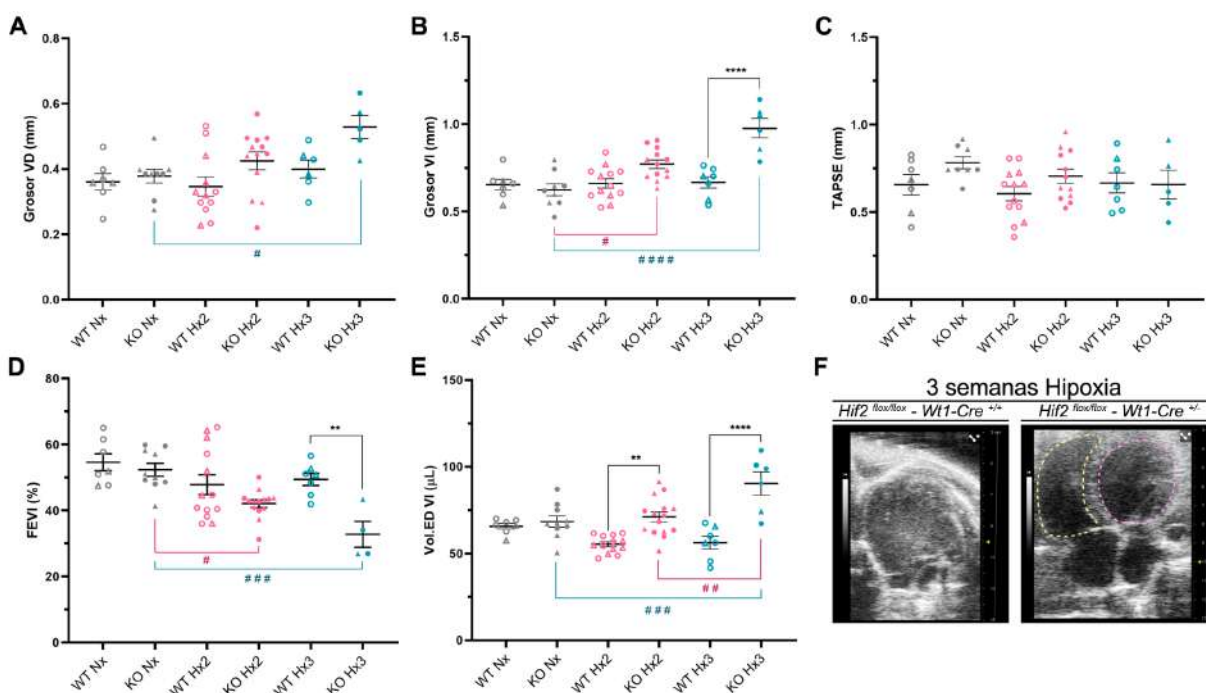


Figura 33. Análisis funcional del corazón por ecocardiografía. A-E) Representaciones gráficas de los distintos parámetros ecográficos tanto en ratones control (WT) como mutantes *Hif2/Wt1* cKO

(KO) en condiciones de normoxia (Nx, puntos grises) y tras 2 (Hx2, puntos rosas) y 3 (Hx3, puntos azules) semanas de exposición a hipoxia. Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras y círculos para los machos. **A)** Medición del grosor de la pared posterior del VD (hembras n= 22, machos n= 31). **B)** Medición del grosor de la pared posterior del VI (hembras n= 20, machos n= 33). **C)** Función de la válvula tricúspide (del inglés, *Tricuspid annular plane systolic excursion*, TAPSE) (hembras n= 19, machos n= 33). **D)** Fracción de Eyección del VI (FEVI) (hembras n= 22, machos n= 33). **E)** Medición del volumen diastólico del VI (hembras n= 23, machos n= 35). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. **F)** Imágenes representativas de corazones control (*Hif2^{flox/flox}/Wt1^{+/+}*, panel izquierdo) y mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1^{+/-}*, panel derecho) en un plano de 4 cámaras tras 3 semanas de exposición a hipoxia. Las líneas discontinuas amarillas delimitan la luz del VD, mientras que las líneas discontinuas rosas delimitan la luz del VI.

En conjunto, estos resultados demuestran que la presencia de HIF2 en el linaje *Wt1* es necesaria para una correcta adaptación a Hx crónica, previniendo la aparición de un fallo cardiaco por disfunción sistólica del VI y dilatación de las cámaras ventriculares.

2. 3. 2 HIF2 PREVIENE EL DESARROLLO DE UNA CARDIOMEGALIA EXCESIVA COMO RESPUESTA ADAPTATIVA DURANTE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA

A la vista de los resultados funcionales obtenidos por ecocardiografía, que indicaban un aumento de la pared posterior de todos los segmentos del corazón en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO con respecto a los controles tras la exposición a Hx crónica, lo siguiente que nos propusimos fue determinar macroscópicamente si esas diferencias en las dimensiones cardiacas evidentes tras 3 semanas de Hx, eran apreciables a simple vista. Como cabría esperar, el corazón de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho) en comparación con el de los controles (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) era considerablemente más grande (**Figura 34A**). Además, estas observaciones se confirmaron tras pesar a los ratones y sus respectivos corazones para poder obtener el *HW/BW* como se describió en el apartado anterior. Como se indica en la (**Figura 34B**), tanto los ratones control (WT) como los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) mostraron una cardiomegalia progresiva tras 2, y sobre todo tras 3 semanas de Hx respecto a los valores de *HW/BW* de Nx. Sin embargo, los corazones mutantes mostraron un tamaño relativo del corazón respecto al peso del cuerpo significativamente mayor que los controles tanto a 2, como a 3 semanas de exposición a Hx (**Figura 34B**).

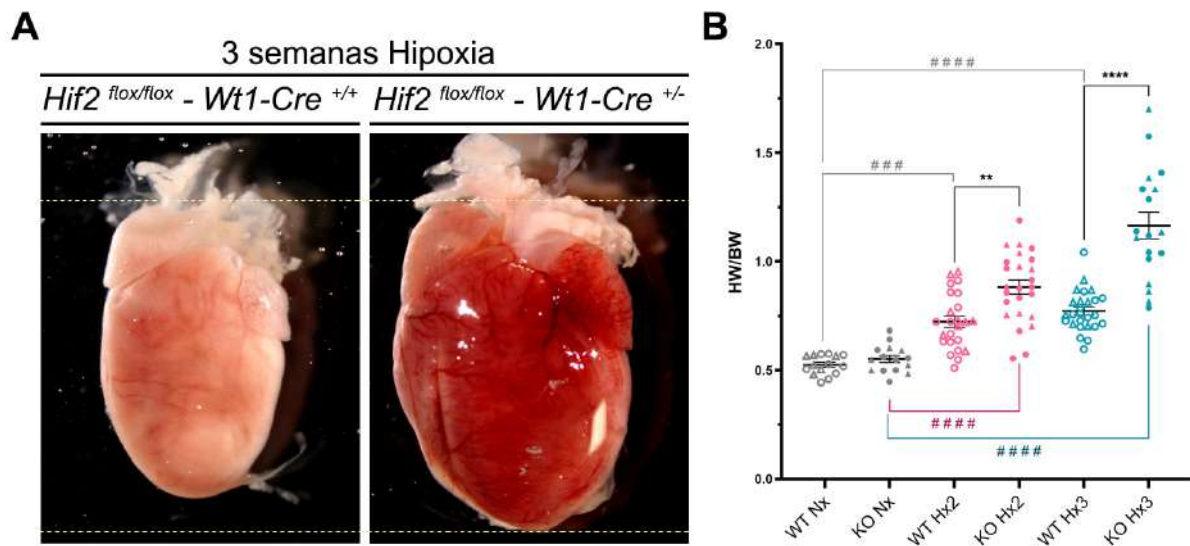


Figura 34. Análisis macroscópico de corazones tras exposición a hipoxia crónica. A) Imágenes representativas de un corazón de ratón control ($Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}$, panel izquierdo) y mutante $Hif2/Wt1$ cKO ($Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}$, panel derecho) tras la exposición a 3 semanas de hipoxia. Las líneas discontinuas amarillas delimitan el tamaño del corazón mutante. Fotografías a 0,8X con lupa Leica MZFLIII. **B)** Representación gráfica del tamaño del corazón relativo al tamaño corporal del ratón en individuos control (WT) y mutantes $Hif2/Wt1$ cKO (KO) en normoxia (Nx, puntos grises) y tras 2 (Hx2, puntos rosas) o 3 (Hx3, puntos azules) semanas de exposición a hipoxia crónica. Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=48) y círculos para los machos (n=73). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

Tras estas observaciones, decidimos realizar un estudio histológico de los corazones con cortes en parafina teñidos con HE y Tricrómico de Masson (TM) para evaluar posibles defectos estructurales que pudieran explicar la cardiomegalia de los mutantes $Hif2/Wt1$ cKO tras la exposición a Hx crónica. Aunque los cortes histológicos evidenciaron el mayor tamaño del corazón de los ratones $Hif2/Wt1$ cKO tras 2, y especialmente después de 3 semanas de Hx, no observamos defectos evidentes en el engrosamiento de las paredes en los mutantes $Hif2/Wt1$ cKO ($Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}$, paneles inferiores) en comparación con los controles ($Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}$, paneles superiores) (**Figura 35A**), ni dilatación de las arterias coronarias. Los análisis de cortes teñidos con TM tampoco revelaron cambios en el patrón de fibrosis entre mutantes y controles (**Figura 35B**). Estos resultados nos motivaron a realizar estudios más detallados mediante IF con marcadores de linaje que nos permitiesen valorar posibles diferencias entre poblaciones celulares cardiacas en ambos modelos.

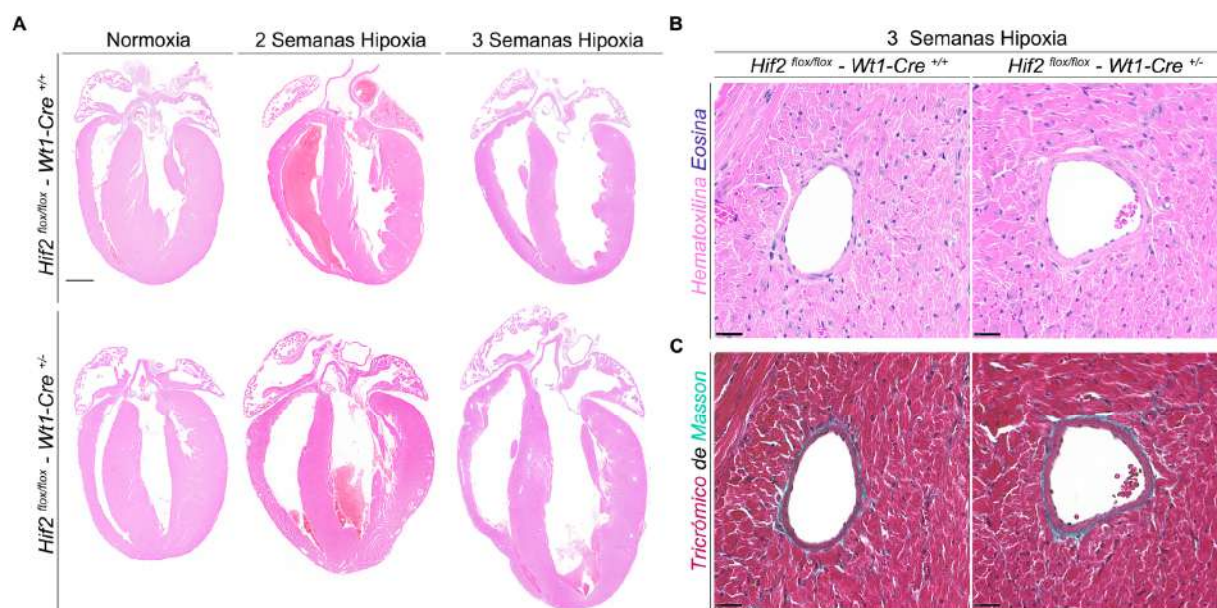


Figura 35. Caracterización histológica del corazón tras exposición a hipoxia. A) Imágenes representativas de cortes histológicos de ratones control ($Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}$, paneles superiores) y mutantes $Hif2/Wt1$ cKO ($Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}$, paneles inferiores) en normoxia (paneles izquierdos), tras 2 semanas de hipoxia (paneles centrales) y tras 3 semanas de hipoxia (paneles derechos) teñidos con HE. Barra de escala de 1mm. **B, C)** Imágenes representativas de la ACD (arteria coronaria derecha) en cortes histológicos de ratones control ($Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}$, paneles izquierdos) y mutantes $Hif2/Wt1$ cKO ($Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}$, paneles derechos) tras 3 semanas de exposición a hipoxia teñidas con HE (**B**) y TM (**C**). Barras de escala 25 μ m.

La primera población que analizamos fueron los CMs, ya que, aunque sólo están contribuidos por *Wt1* en una pequeña proporción, están en contacto directo con el resto de poblaciones (CEs, PCs, CMLs y FBs) derivadas de *Wt1* y podría haber una comunicación célula-célula que hiciera que los CMs de los ratones mutantes $Hif2/Wt1$ cKO se hipertrofiaran y, en consecuencia, al ser más grandes, pudiesen contribuir a la mayor cardiomegalia de los mutantes $Hif2/Wt1$ cKO. Para validar esta hipótesis, realizamos una tinción con Aglutinina de Germen de Trigo (WGA, del inglés "wheat germ agglutinin") que es una lectina que se adhiere a las membranas celulares y, por tanto, permite identificar el perímetro y medir el área de distintas poblaciones celulares. Los CMs son las células más grandes del tejido cardiaco, fácilmente reconocibles con la tinción de WGA por su morfología, lo que permite medir su área de una manera sencilla tal y como se describe en la sección de métodos. Con esta tinción pudimos determinar el área relativa de los CMs de ratones control y mutantes $Hif2/Wt1$ cKO en Nx y tras 2 y 3 semanas de Hx (Hx2 e Hx3, respectivamente) (**Figura 36A**), observando una hipertrofia progresiva de los CMs tanto en ratones control, como mutantes $Hif2/Wt1$ cKO, que se hacía significativa a las 3 semanas de Hx en comparación con los valores en Nx. Sin embargo, no observamos diferencias significativas entre ratones control y mutantes a un mismo tiempo de Hx (**Figura 36B**), por lo

que descartamos la hipótesis de que la cardiomegalia observada en los mutantes de Hif2 (**Figura 34**) se debiera a hipertrofia de los CMs.

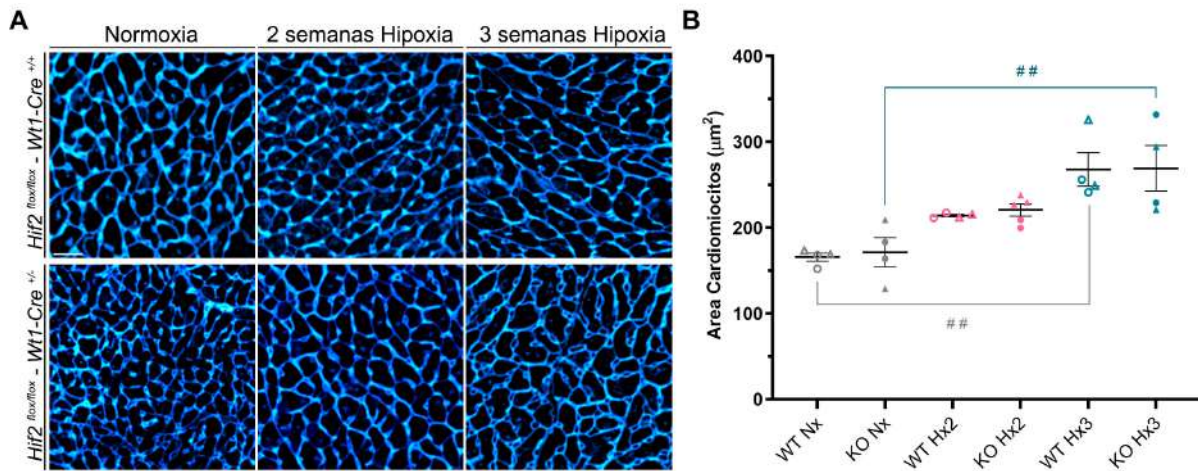


Figura 36. Análisis de la hipertrofia de cardiomiocitos asociada a hipoxia. A) Imágenes representativas de la tinción con WGA para delimitar el contorno de los CM en ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) en condiciones de normoxia (paneles izquierdos), tras 2 semanas de hipoxia (paneles centrales) y tras 3 semanas de hipoxia (paneles derechos). Barra de escala 20µm. **B)** Cuantificación del área de los CM marcados en A con WGA. Cada punto representa la media de las mediciones del tamaño de los CM de 12 campos aleatorios distribuidos por VD, SIV y VI de un individuo tanto de ratones control (WT) como de mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en todas las condiciones: normoxia (Nx, puntos grises) y tras 2 (Hx2, puntos rosas) o 3 semanas de hipoxia (Hx3, puntos azules). Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=13) y círculos para los machos (n=12). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

En conjunto, estos hallazgos indican que en respuesta a Hx crónica el corazón experimenta un incremento en el tamaño de los CMs o hipertrofia que no se ve afectada por la ausencia de HIF2. Además, nuestros resultados sugieren que HIF2 en el linaje Wt1 tiene un papel protector frente al aumento de tamaño del corazón o cardiomegalia tras exposición a Hx crónica, y que dicha cardiomegalia no es secundaria a una mayor hipertrofia de los CMs de mutantes de HIF2.

2. 3. 3 LA AUSENCIA DE HIF2 EN EL LINAJE WT1 PRODUCE INESTABILIDAD Y REMODELADO MICROVASCULAR TRAS LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA

Tras descartar que la hipertrofia de CMs pudiera ser la causa del exceso de cardiomegalia de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras la exposición a Hx crónica, nos planteamos que quizás ese aumento del tamaño del órgano podría deberse al aumento en el número total de células, es decir, que la cardiomegalia fuera consecuencia de una hiperplasia celular. Para valorar esta nueva hipótesis, realizamos estudios por IF utilizando marcadores de linaje celular en combinación con indicadores de proliferación en cortes de parafina de corazones de ratones

control y mutantes *Hif2/Wt1* cKO mantenidos en Nx o expuestos al 10% de O₂ durante 2 o 3 semanas. Primero combinamos Isolectina B4 (IB4, verde), que es una lectina que se une a la membrana de las CE cardiacas y sirve para marcar el contorno de los vasos, con WGA para diferenciar los CMs (blanco), junto con el marcador de proliferación PH3 (verde). Los núcleos se cotiñeron con Dapi (**Figura 37A**). El resultado de esta IF reveló que los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) presentaban un claro aumento del número de células proliferantes PH3⁺ en comparación con los controles (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) tras 2 semanas de Hx y que, además, las células que proliferaban no eran CMs, ya que no había núcleos PH3⁺ dentro de los contornos de WGA de mayor tamaño correspondientes a CMs. Sin embargo, prácticamente todas las células PH3⁺ coincidían dentro de un círculo de IB4, lo que sugería que podrían ser CE las que estuvieran sufriendo un proceso de hiperplasia. A continuación, cuantificamos el número total de células PH3⁺ que estuvieran dentro de una señal de IB4 en una sección completa de corazón y lo relativizamos al área de la sección de corazón analizada. Esta cuantificación confirmó que tras 2 semanas de Hx crónica había una respuesta proliferativa tanto de los ratones control (WT), como de los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) con respecto a los ratones en Nx, pero mucho más exacerbada en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO). Sin embargo, a 3 semanas de exposición a Hx, la proliferación de CE (PH3⁺/IB4⁺) tanto en ratones control, como en mutantes *Hif2/Wt1* cKO, (KO) se reducía hasta igualar prácticamente los valores iniciales de Nx (**Figura 37B**).

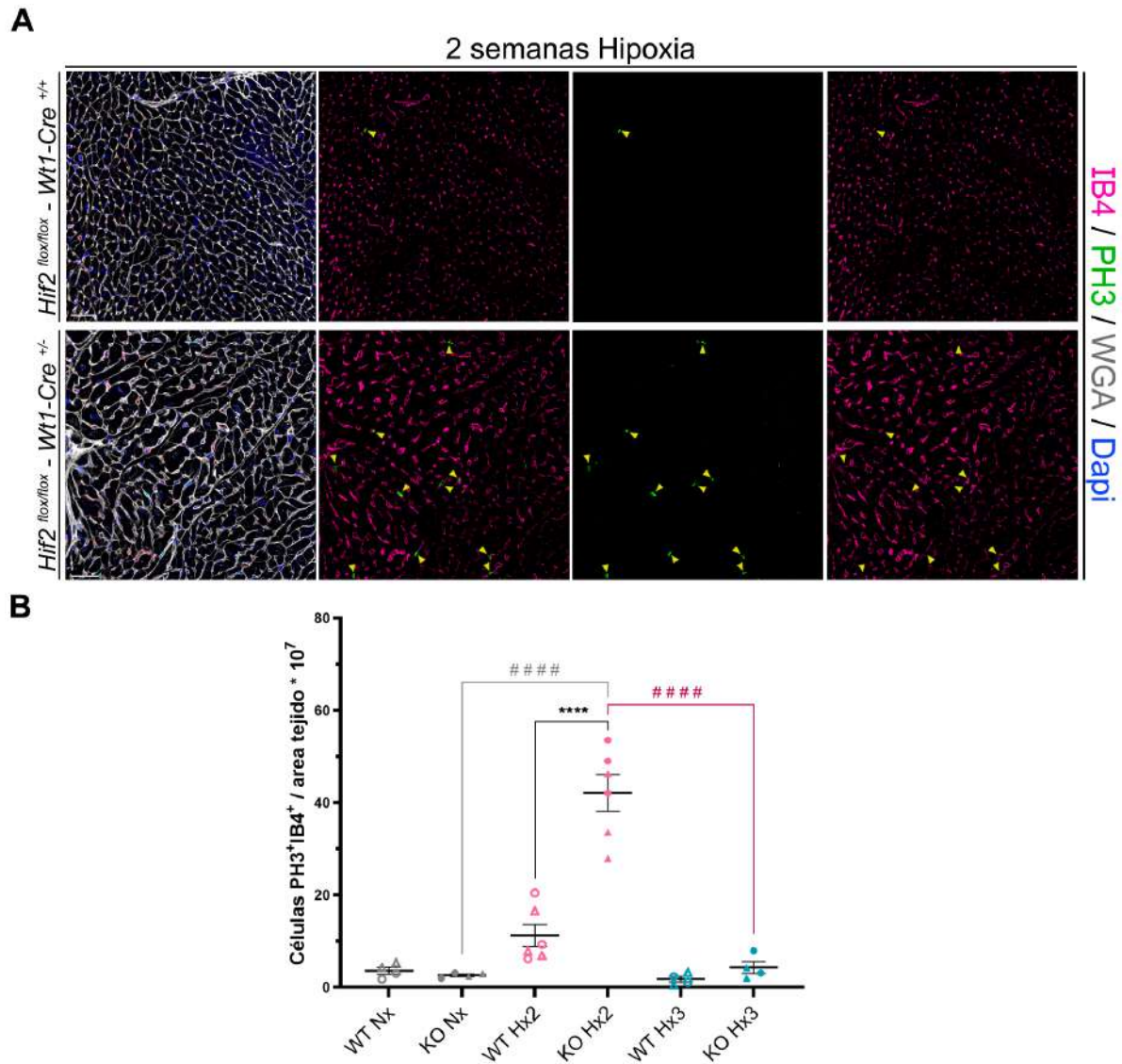


Figura 37. Análisis de la hiperplasia cardiaca asociada a hipoxia. A) Imágenes de inmunofluorescencia representativas con los marcajes IB4 (contorno de CEs, magenta), WGA (contorno celular para discriminación de CM, blanco), PH3 (marcador de proliferación, verde) y Dapi para coteñir los núcleos (azul) sobre cortes en parafina de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) tras 2 semanas de hipoxia. Las flechas amarillas sobre las imágenes muestran CEs proliferando que son IB4⁺/PH3⁺. Barra de escala 40µm. **B)** Cuantificación de las células dobles positivas PH3⁺/IB4⁺ tanto en los ratones control (WT) como en los mutantes (KO) en todas las condiciones: normoxia (Nx, puntos grises), 2 semanas de hipoxia (Hx2, puntos rosas) y 3 semanas de hipoxia (Hx3, puntos azules). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=14) y círculos para los machos (n=14). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

Estos datos sugieren que HIF2 juega un papel represor de la proliferación excesiva en el compartimento microvascular del corazón en respuesta a Hx crónica.

Para confirmar la identidad de las células proliferantes, realizamos otra IF sobre cortes de OCT con un marcador nuclear específico de CEs, el ERG, junto con la IB4 (utilizado anteriormente para marcar el contorno de CEs) y otro marcador de proliferación, el Ki67 (el cambio de marcadores de proliferación responde a la combinación de especies de los anticuerpos primarios). Los núcleos se cotiñeron con Dapi. Con esta IF confirmamos de manera cualitativa que tras 2 semanas de Hx, la mayor parte de las células que estaban proliferando, tanto en ratones control (*Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) como mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores), eran en efecto CEs (ERG⁺/Ki67⁺) (**Figura 38**).

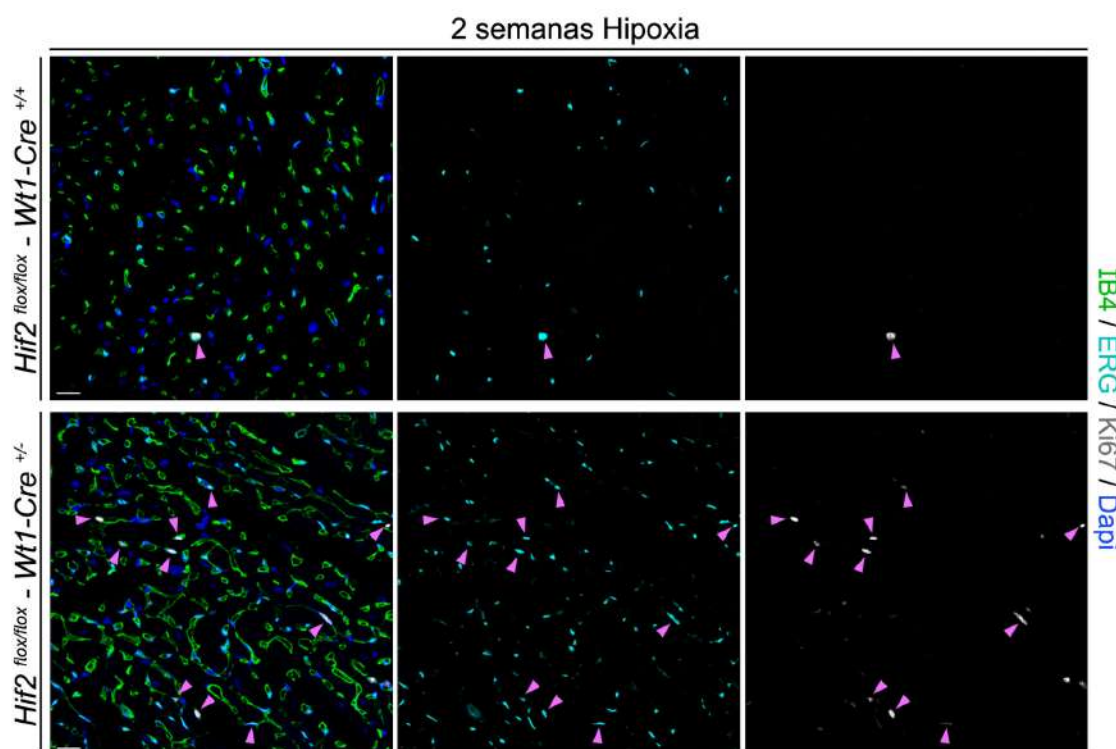


Figura 38. Análisis de la expansión de CEs cardiacas en hipoxia mediante IF. Imágenes representativas de cortes histológicos en OCT de corazones control (*Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) teñidos con IB4 (contorno de CEs, verde), ERG (núcleo de CEs, cyan), Ki67 (proliferación, blanco) y núcleos con Dapi (azul) en inmunofluorescencia tras 2 semanas de exposición a hipoxia. Barras de escala 20µm.

A la vista de estos resultados, quisimos explorar qué consecuencias tenía esta hiperplasia de CEs de la microvasculatura cardiaca en la adaptación a Hx crónica. Para ello, evaluamos la integridad de la red capilar utilizando el marcador IB4 tanto en ratones control (*Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores), como mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{lox/lox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) (**Figura 39A**). El uso de este marcador, que define el perímetro de vasos sanguíneos, nos permitió cuantificar el área de los capilares (**Figura 39B**), revelando un aumento significativo en el diámetro microvascular tras 2 y 3 semanas de Hx en ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) con respecto a los controles (WT), que mostraron valores similares

a los de Nx. Asimismo, estos datos se correlacionaron con la cuantificación del número de capilares por área de tejido, para la que los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO), que presentaban mayor diámetro de los capilares, presentaron menor densidad capilar, mientras que los controles (WT) permanecieron inalterados (**Figura 39C**).

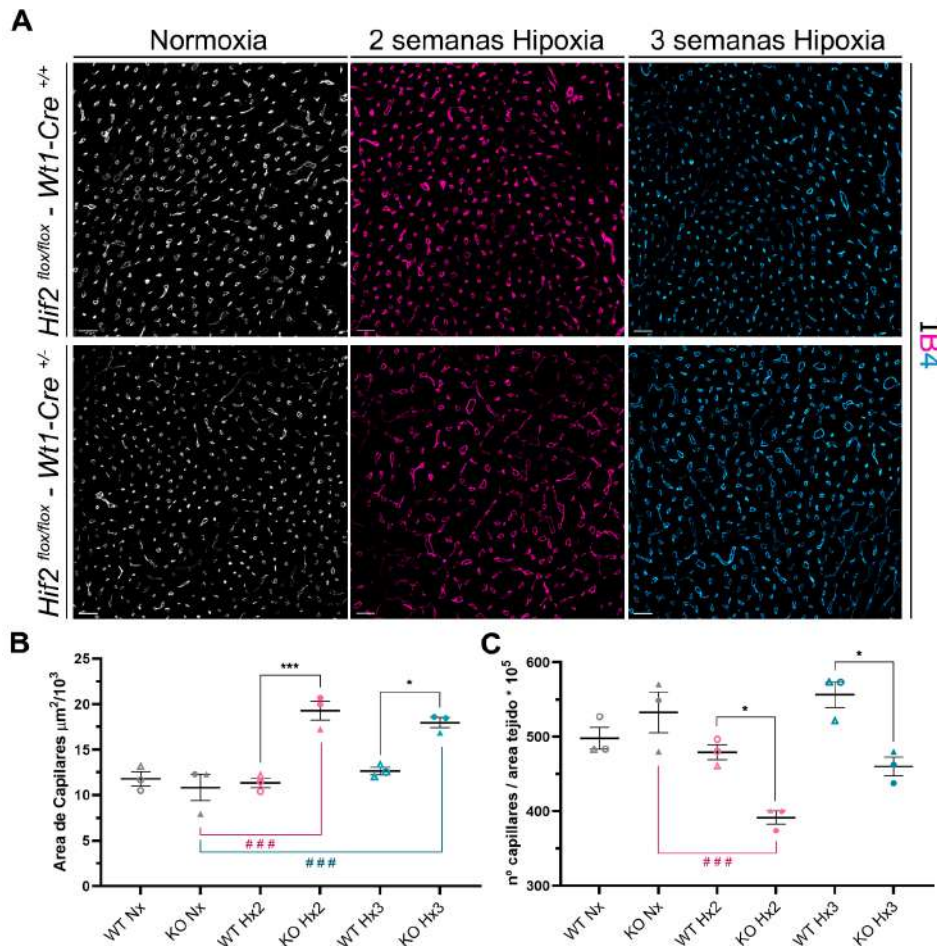


Figura 39. Inestabilidad microvascular cardiaca en respuesta a hipoxia crónica. Imágenes representativas de cortes histológicos en parafina de corazones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) teñidos con IB4 (contorno de CEs, verde) en todas las condiciones: normoxia (paneles izquierdos, blanco), tras 2 semanas de exposición a hipoxia (paneles centrales, magenta) y tras 3 semanas de exposición a hipoxia (paneles derechos, cyan). Barras de escala 20µm. **B, C**) Representación gráfica de la cuantificación del área de los capilares (**B**) y el número por área de tejido (**C**). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=8) y círculos para los machos (n=10). Cada condición: normoxia (Nx, puntos grises), hipoxia 2 (Hx2, puntos rosas) o 3 (Hx3, puntos azules,) semanas se representa como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

Para corroborar de manera cuantitativa estas observaciones basadas en IFs, utilizamos los ratones reporteros para *Wt1*-Tomato control (*Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre, Tomato^{flox/flox}-Wt1-*

Cre^{+/-}) y mutante de HIF2 (*Hif2^{flox}-Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* [reportero *Hif2/Wt1* cKO], *Hif2^{flox/flox}-Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*). Siguiendo una estrategia de selección y clasificación mediante citometría de flujo/FACS similar a la llevada a cabo en el análisis de pulmón (**Figura 25**, **Figura 26** y **Figura 27**), calculamos el número total de células por gramo de tejido de cada población cardiaca identificada con los distintos marcadores de superficie dentro de las células *Tomato⁺* o *Tomato⁻*.

Sorprendentemente, y al contrario de los datos obtenidos en el pulmón, estos análisis revelaron que no había cambios significativos en el número total de células *CD45⁻/Tomato⁺* (puntos rojos) tras la exposición a 2 semanas de Hx, ni en ratones control (WT), ni en los mutantes de Hif2 (KO) (**Figura 40A**, **Figura 40B**). Sin embargo, la población *Tomato⁻* (puntos azules) aumentaba significativamente en los ratones deficientes para Hif2 (KO) con respecto a los controles (WT) en Hx, así como en relación al mutante (KO) en Nx (**Figura 40A**).

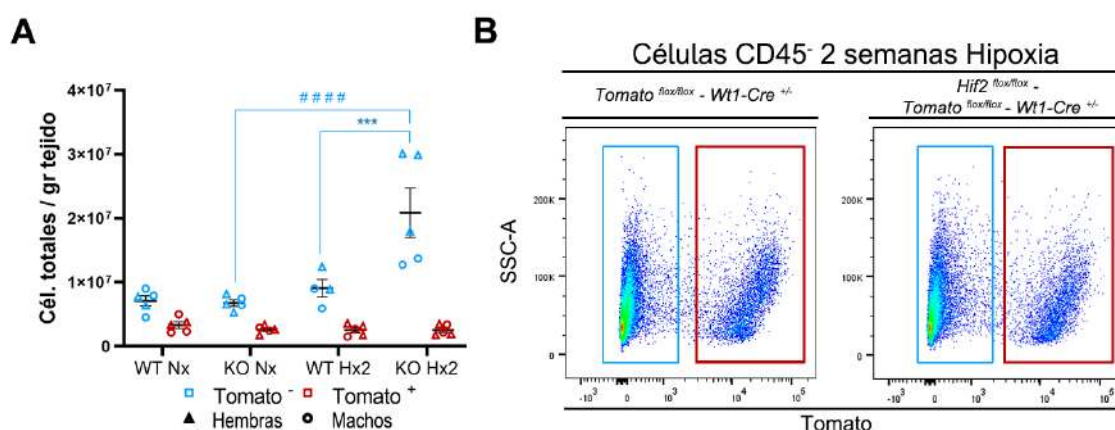


Figura 40. Análisis por FACS de alteraciones celulares del linaje *Wt1* en corazón tras exposición a hipoxia crónica. Análisis por Citometría de Flujo/FACS de ratones reporteros control Rosa26-tdTomato/*Wt1-Cre* (WT) y mutantes *Hif2^{flox}-Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (KO) en normoxia (Nx) y tras 2 semanas de hipoxia (Hx2). **A**) Cuantificación del número de células totales *CD45⁻* por gramo de tejido tanto *Tomato⁻* (puntos azules) como *Tomato⁺* (puntos rojos). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=21) y círculos para los machos (n=18). Cada condición se muestra como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) indican las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx), los (#) la significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001. **B**) Imagen representativa de la nube de puntos correspondiente al total de células *CD45⁻* en ratones control Rosa-tdTomato/*Wt1Cre* (*Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) y mutantes Rosa-tdTomato/*Hif2* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) tras 2 semanas de exposición a hipoxia. Los rectángulos azules corresponden a la nube de puntos de las células *Tomato⁻* y los rectángulos rojos corresponden a la nube de puntos de las células *Tomato⁺*.

Por otro lado, a pesar de la proliferación de CEs observada por IFs en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras 2 semanas de exposición a Hx (**Figura 37** y **Figura 38**), los análisis de

citometría/FACS no revelaron cambios significativos del endotelio en ninguna de las dos poblaciones, ni Tomato⁺, ni Tomato⁻, aunque sí apreciamos una tendencia en los ratones reporteros *Hif2/Wt1* cKO (KO) a tener mayor número de células Tomato⁻ tras 2 semanas de exposición a Hx crónica (**Figura 41**).

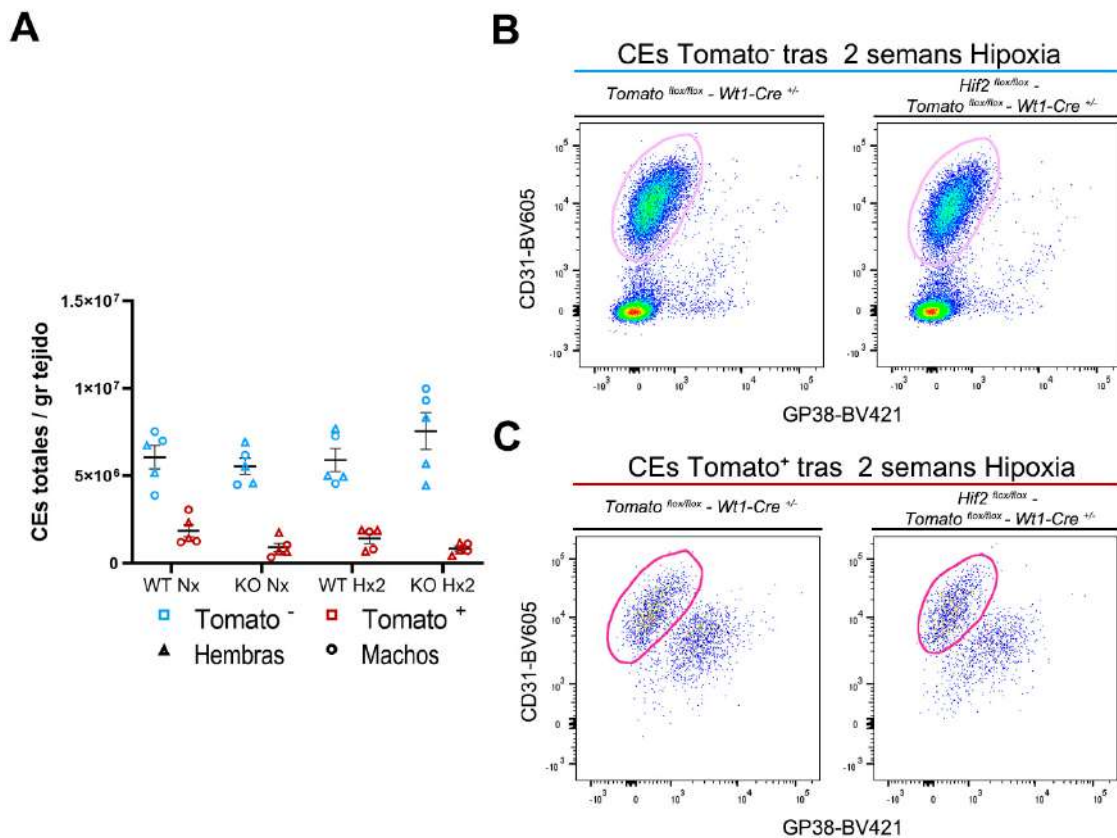


Figura 41. Análisis por FACS de los cambios en la población de CEs del corazón. Análisis por Citometría de flujo/FACS de ratones reporteros control *Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (WT) y mutantes *Hif2^{fllox}-Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (KO) en normoxia (Nx) y tras 2 semanas de hipoxia (Hx2). **A**) Representación de la cuantificación del número de CEs por gramo de tejido tanto Tomato⁻ (puntos azules) como Tomato⁺ (puntos rojos). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=21) y círculos para los machos (n=18). Cada condición se muestra como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) indican las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx), los (#) la significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001. **B, C**) Imágenes representativas de la nube de puntos correspondiente a la cantidad de CEs (sobre un total fijo de 34000 células CD45⁺) Tomato⁻ (**B**) y Tomato⁺ (**C**) en ratones reporteros control (*Tomato^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles izquierdos) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{fllox/fllox}-Tomato^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles derechos) tras 2 semanas de exposición a hipoxia. La línea rosa delimita la nube correspondiente a las CEs.

A la vista de estos resultados, realizamos una IF en cortes de corazones incluidos en OCT procedentes de ratones reporteros *Hif2/Wt1* cKO combinando marcadores de linaje endotelial [ERG (núcleos de CEs, cyan) e IB4 (contorno de CEs, verde)] y de proliferación (Ki67, mitosis, blanco), junto con la señal de Tomato (magenta) (**Figura 42**) para caracterizar la naturaleza

de las CEs proliferantes observadas en la **Figura 38**. En efecto, el análisis de estas IFs reveló que las células $ERG^+/Ki67^+$ no eran $Tomato^+$, lo que confirmaba que la expansión endotelial observada en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras 2 semanas de Hx procedía de CEs no derivadas del linaje *Wt1* y por tanto $Tomato^-$, tal y como se intuía en la **Figura 41**. Cabe mencionar que, si bien la mayoría de células $Ki67^+$ registradas eran también ERG^+ , en el análisis de las IFs encontramos células aisladas $ERG^-/Ki67^+/Tomato^+$ (flechas verdes), aunque de manera muy minoritaria. Por su localización (completamente adheridas al capilar) y morfología, hipotetizamos que pudiera tratarse de PCs.

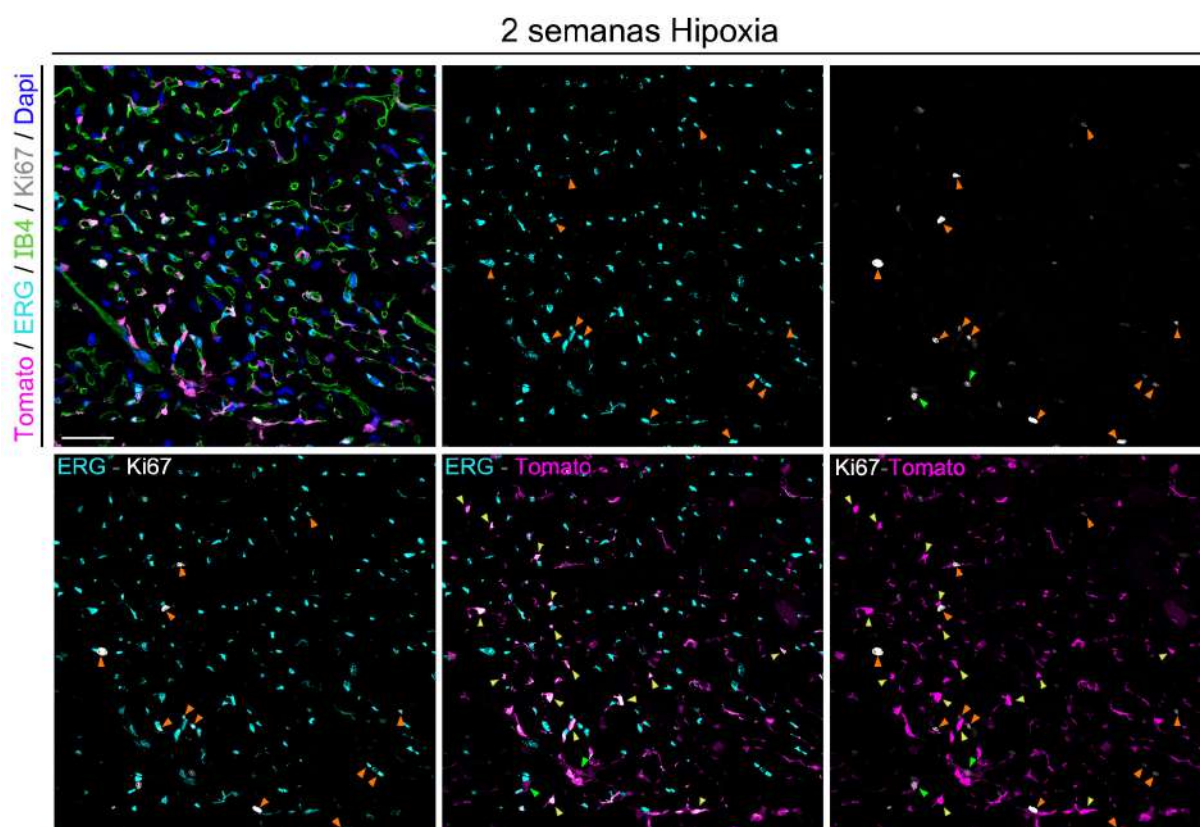


Figura 42. Análisis de la expansión de CEs cardiacas en hipoxia mediante IF. Imágenes representativas de inmunofluorescencia en OCT de un ratón reportero mutante *Hif2^{flox/flox}-Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre (Hif2^{flox/flox}-Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-})* tras 2 semanas de exposición a hipoxia crónica. Se utilizaron los marcajes: IB4 (contorno de CEs, verde), ERG (núcleos de CEs, cyan), Ki67 (mitosis, blanco), Tomato (linaje *Wt1*, magenta) y Dapi (núcleos, azul). Las flechas naranjas señalan CEs proliferantes, no $Tomato^+$ ($ERG^+/Ki67^+/Tomato^-$), las flechas amarillas señalan CEs $Tomato^+$ no proliferantes ($ERG^+/Ki67^-/Tomato^+$) y las flechas verdes señalan células proliferantes $Tomato^+$ que no son CEs ($ERG^-/Ki67^+/Tomato^+$). Barra de escala 40 μ m.

Para valorar esta posibilidad de manera cuantitativa, realizamos análisis por citometría de flujo/FACS marcando PCs sobre los modelos reporteros. Aunque estos análisis presentaron una notable dispersión entre las muestras, los datos cuantitativos del total de PCs por gramo de tejido cardiaco no revelaron cambios en el número de células en los ratones reporteros *Hif2/Wt1*

cKO tras la exposición a 2 semanas de Hx en comparación con los datos en Nx (**Figura 43A**, **Figura 43B** y **Figura 43C**). Sin embargo, observamos que la población de PCs Tomato^+ de los ratones control disminuía significativamente en Hx.

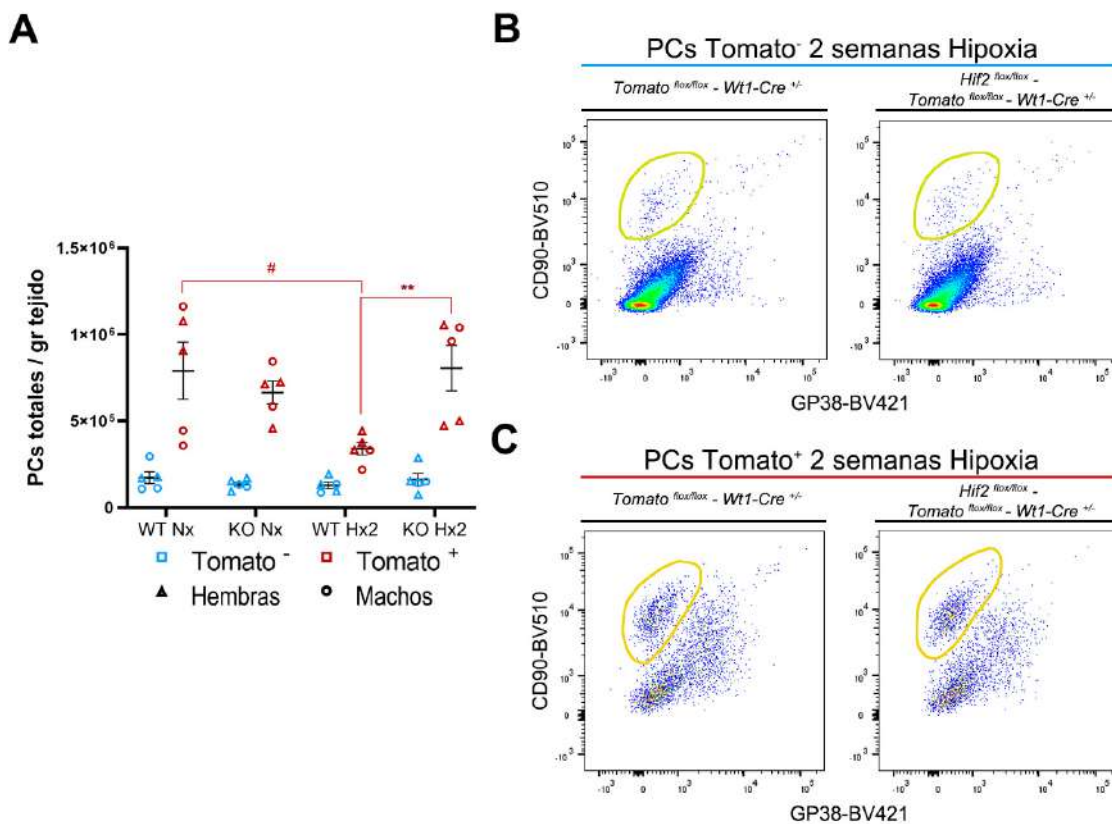


Figura 43. Análisis por FACS de los cambios en la población de PCs cardiacos en hipoxia.

Análisis por Citometría de flujo/FACS de ratones reporteros control *Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (WT) y mutantes *Hif2^{fllox}-Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (KO) en normoxia (Nx) y tras 2 semanas de hipoxia (Hx2). **A**) Representación de la cuantificación del número de PCs por gramo de tejido tanto Tomato^- (puntos azules) como Tomato^+ (puntos rojos). Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=21) y círculos para los machos (n=18). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx), los (#), la significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. **B**, **C**) Imágenes representativas de la nube de puntos correspondiente al total de PCs (sobre un total fijo de 34000 células CD45^-) Tomato^- (**B**, línea azul) y Tomato^+ (**C**, línea roja) en ratones reporteros control *Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (*Tomato^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles izquierdos) y mutantes *Hif2^{fllox}-Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (*Hif2^{fllox/fllox}-Tomato^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles derechos) tras 2 semanas de exposición a hipoxia. La línea amarilla delimita la nube de puntos correspondiente a los PCs.

En resumen, estos resultados indican que HIF2 modula la proliferación de CE microvasculares cardiacas tras 2 semanas de hipoxia, ya que su ausencia desencadena una proliferación excesiva. Esta expansión del compartimento endotelial está asociada a una significativa dilatación capilar y reducción de la densidad de vasos, lo que sugiere un papel protector de HIF2 frente al remodelado microvascular y la inestabilidad en el corazón durante Hx crónica.

3. RESCATE DE ALTERACIONES CARDIACAS Y PULMONARES MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON 1 SEMANA DE REOXIGENACIÓN TRAS LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA

Como ya se describió en los apartados anteriores 1 y 2, tanto los pulmones como el corazón de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO no presentaban ningún defecto funcional ni estructural durante el desarrollo o en la etapa adulta en condiciones basales de Nx. Por ese motivo, nos planteamos determinar si los defectos cardiovasculares y pulmonares desarrollados por el mutante *Hif2/Wt1* cKO tras la exposición a Hx crónica eran total o parcialmente reversibles al restaurar las condiciones normales de O₂ (reoxigenación) (**Figura 44**).

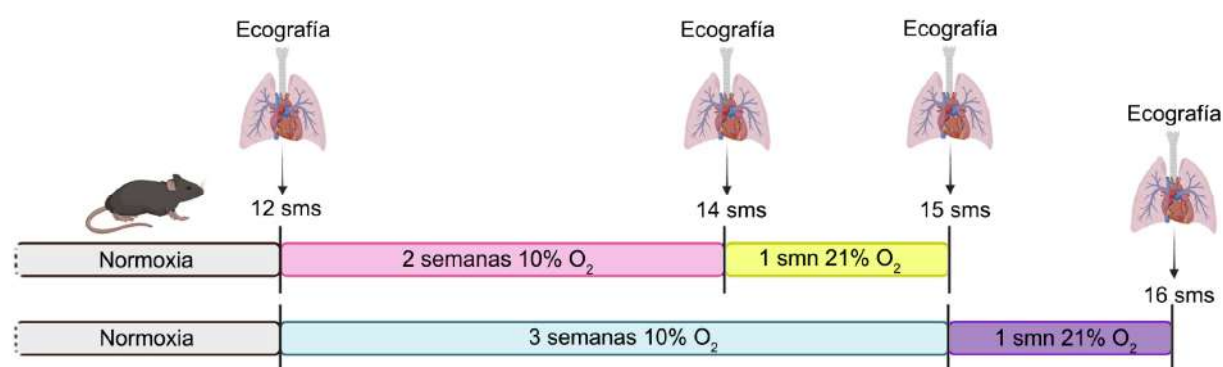


Figura 44. Esquema del plan experimental de tratamiento con reoxigenación. Esquema representativo del segundo diseño experimental de esta tesis para el rescate del fenotipo. Tras el tratamiento ininterrumpido al 10% de O₂, los animales se sacaron de la cámara de hipoxia y se estabularon de nuevo en una habitación al 21% de O₂ durante 1 semana (smn). Transcurrida la semana en normoxia, los animales fueron analizados por ecografía cardíaca y pulmonar y sacrificados siguiendo los protocolos establecidos para el no sufrimiento. Posteriormente se procedió a la extracción y análisis de los tejidos.

Los análisis funcionales mediante ecografía pulmonar, aunque preliminares, revelaron una completa reversión del fenotipo pulmonar de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho) después de 1 semana de reoxigenación tras 2 y de manera más impactante, tras 3 semanas de exposición a Hx crónica, tiempo en el que se observaban los mayores cambios fenotípicos patológicos en el pulmón descritos en el apartado 2 de esta sección de resultados donde describimos el aumento significativo del índice MoLUS (**Figura 17**). El análisis ecográfico de estos nuevos grupos de reoxigenación reveló un patrón de bandas A (bandas horizontales que indican la presencia de aire en el pulmón) de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) equivalente al encontrado en ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*) en Hx (**Figura 16**) como puede apreciarse en la **Figura 45**. Además, la pleura (asterisco rosa) recuperaba su grado de engrosamiento natural, sin alteraciones en su estructura y con buen deslizamiento sobre el pulmón. Estos datos evidenciaban que el líquido

libre presente en los pulmones observado en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras 3 semanas de Hx al 10% O₂, desaparecía después de la semana de reoxigenación al 21% de O₂.

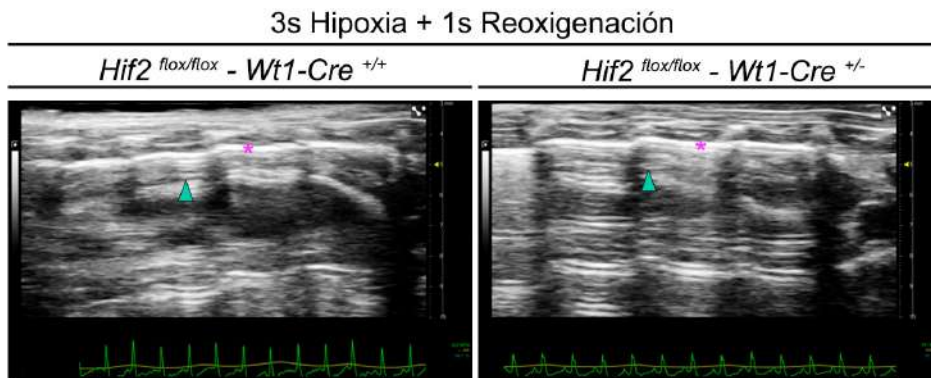


Figura 45. Caracterización funcional por ecografía del pulmón tras 3 semanas de exposición a hipoxia crónica seguido de 1 semana de normoxia. Imágenes representativas del plano longitudinal de un pulmón de ratón control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) y un ratón mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho) tras la exposición a 3 semanas de hipoxia al 10% de O₂ seguidas de 1 semana de reoxigenación al 21% de O₂. Los asteriscos rosas indican en ambas imágenes la localización de la pleura. Las flechas turquesas señalan las únicas bandas que se pueden apreciar en ambos pulmones correspondientes a bandas A horizontales, indicativo de la presencia de aire en el pulmón. No se aprecian defectos en ninguno de los pulmones.

En relación al corazón, el análisis ecocardiográfico mostró una recuperación de los valores correspondientes al grosor de las paredes posteriores del VD (**Figura 46A**) y especialmente, del VI (**Figura 46B**) en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO después del tratamiento con 1 semana de reoxigenación tras 2 ó 3 semanas de exposición a Hx. Sin embargo, aunque observamos que la hipertrofia de las paredes ventriculares se corregía, no confirmamos un rescate total de la función sistólica del VI (FE) (**Figura 46C**), ni una reversión completa de la dilatación ventricular izquierda (**Figura 46D**), lo que sugería que la disfunción cardiaca inducida por Hx en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO persistía tras el tratamiento con 1 semana reoxigenación.

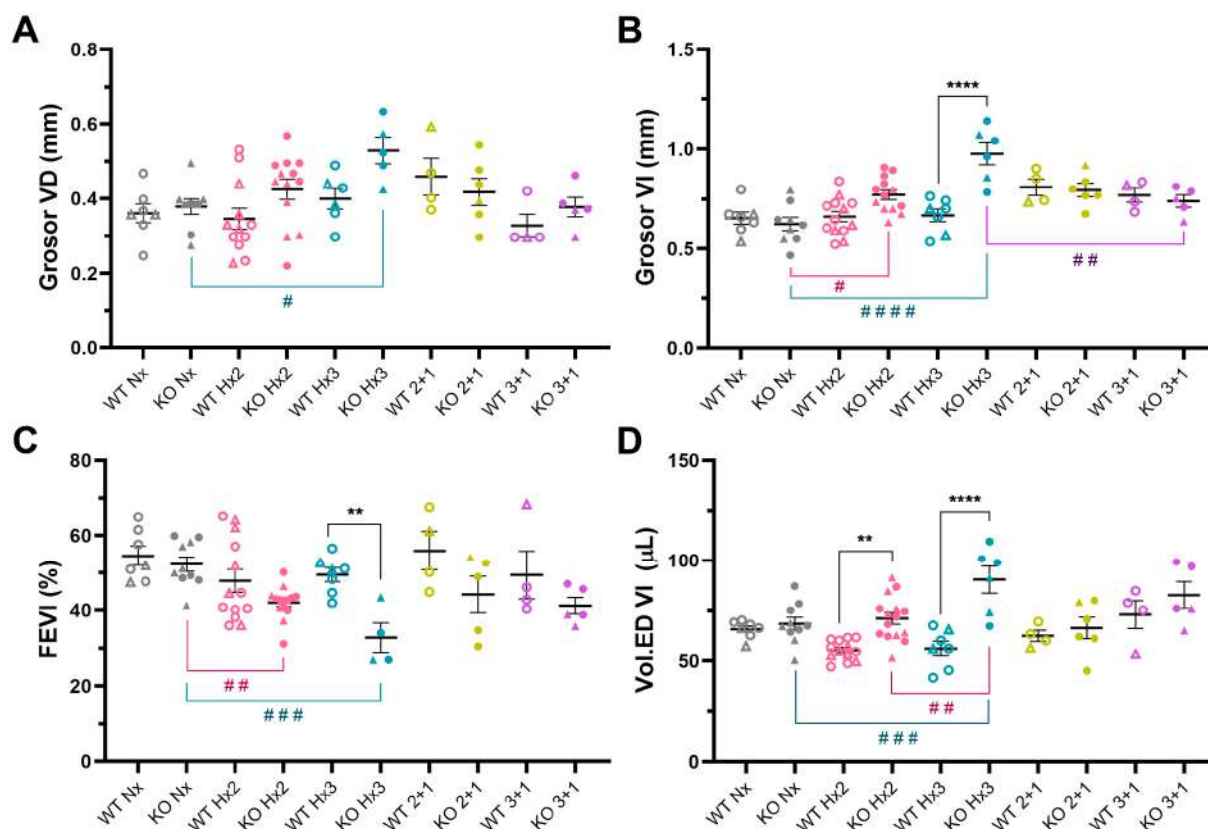


Figura 46. Estudios funcionales por ecocardiografía tras exposición a hipoxia crónica y posterior reoxigenación. Representaciones gráficas de los distintos parámetros ecográficos tanto en ratones control (WT) como mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en condiciones de normoxia (Nx, puntos grises), tras 2 y 3 semanas de exposición a hipoxia (Hx2 con puntos rosas e Hx3 con puntos azules, respectivamente) y tras la reoxigenación de 1 semana al 21% de O₂ después de 2 (2+1, puntos amarillos) o 3 (3+1, puntos morados) semanas de hipoxia respectivamente. Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras y círculos para los machos. **A)** Medición del grosor de la pared posterior del VD (hembras n= 27, machos n= 44). **B)** Medición del grosor de la pared posterior del VI (hembras n= 26, machos n= 48). **C)** Fracción de Eyección del VI (FEVI, hembras n= 27, machos n= 46). **D)** Medición del volumen diastólico del VI (hembras n= 27, machos n= 49). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx), los (#), la significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

A la vista de estos sorprendentes resultados, a continuación, decidimos calcular el cociente *HW/BW* de estos ratones antes de valorar la estructura del corazón y los pulmones. Como se muestra en la **Figura 47**, el tratamiento con 1 semana de reoxigenación promovía una total recuperación del cociente del peso del corazón con respecto al peso corporal, tanto de los ratones control (WT), como de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO), incluso tras 3 semanas de exposición a Hx, restaurándose los valores que presentaban ambos ratones en Nx (**Figura 47**).

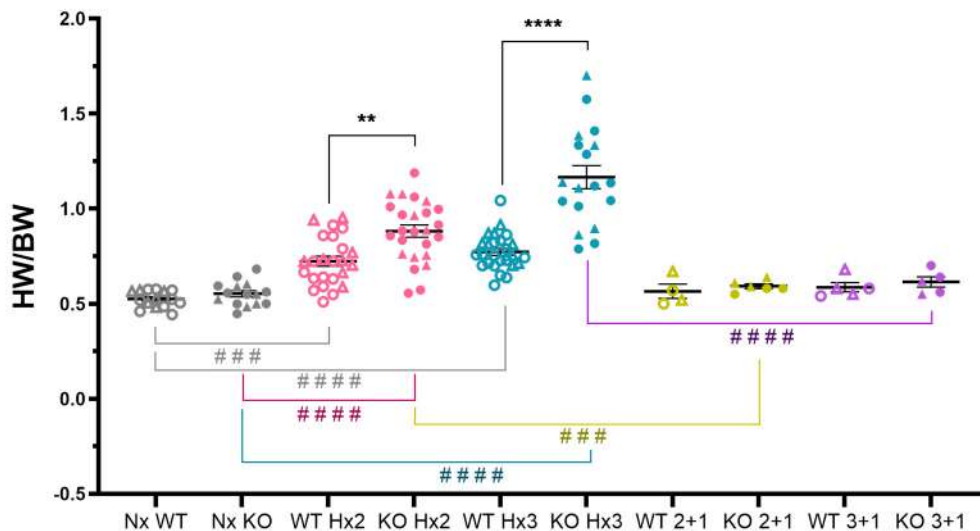


Figura 47. Rescate del HW/BW tras 1 semana de reoxigenación. Representación gráfica del tamaño del corazón relativo al tamaño corporal del ratón en individuos control (WT) y mutantes en condiciones de normoxia (Nx, puntos grises), tras 2 y 3 semanas de exposición a hipoxia (Hx2 con puntos rosas e Hx3 con puntos azules, respectivamente) y tras la reoxigenación de 1 semana al 21% de O₂ después de 2 (2+1, puntos amarillos) o 3 (3+1, puntos morados) semanas de hipoxia respectivamente. Cada punto representa un individuo. Los sexos se muestran con triángulos para las hembras (n=55) y círculos para los machos (n=85). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx), los (#) la significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

En consonancia con los análisis ecográficos (**Figura 45**), los estudios histológicos de pulmón confirmaron que el tratamiento con 1 semana de reoxigenación tras 3 semanas de Hx resultaba en la ausencia de líquido libre en el parénquima alveolar de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho). Los ratones *Hif2/Wt1* cKO presentaban una arquitectura equivalente a la del ratón control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) y a los ratones mutantes en Nx (**Figura 48**).

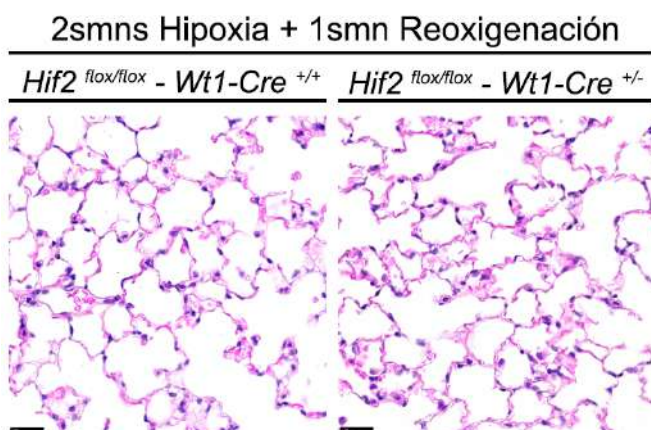


Figura 48. Caracterización histológica pulmonar tras 2 semanas de hipoxia y 1 de reoxigenación. Imágenes representativas de pulmones de ratones control (*Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) y mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho) tras 2 semanas de exposición a hipoxia crónica y 1 semana de reoxigenación sobre cortes de parafina teñidos con HE. Barras de escala de 25µm en ambas imágenes.

Por otro lado, aunque a la vista de los resultados del cociente del *HW/BW* ya intuíamos que los corazones de ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO volverían a tener pesos similares a los ratones en Nx, realizamos una tinción de HE sobre cortes de parafina y confirmamos que las dimensiones de los corazones de ratones control y mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras 2 semanas de Hx seguidas de 1 semana de reoxigenación eran similares a los de Nx (**Figura 49**).

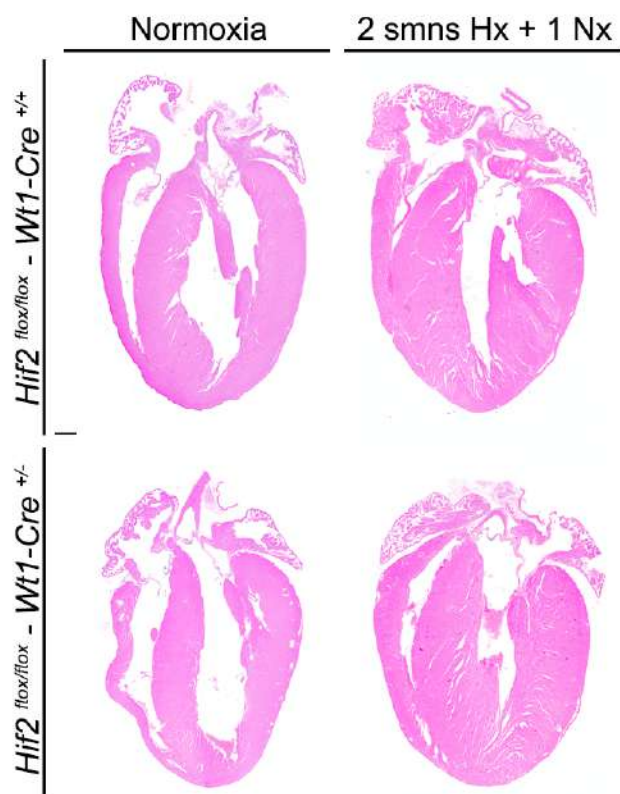


Figura 49. Caracterización histológica cardíaca tras 2 semanas de hipoxia y 1 semana de reoxigenación. Comparación entre imágenes representativas de corazones de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles inferiores) en condiciones de normoxia (paneles izquierdos) o después de 2 semanas de exposición a hipoxia crónica y 1 semana de reoxigenación (paneles derechos). Cortes de parafina teñidos con HE. Barras de escala 500 μ m.

Por último, nos planteamos valorar el estado de la microvasculatura cardíaca tras el tratamiento de reoxigenación de 1 semana. Para ello, realizamos una tinción con IB4 sobre cortes de corazones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) para medir el calibre de los capilares (**Figura 50A**) y cuantificar su densidad (**Figura 50B**). El análisis de esta IF nos permitió comprobar que, si bien el rescate a valores de Nx no era total, sí había una recuperación significativa tanto en el diámetro de los capilares (menor área de capilares que tras 2 y 3 semanas de Hx crónica), así como un aumento del número de capilares por área de tejido en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) tras 2 y 3 semanas de Hx seguidas de 1 semana de reoxigenación.

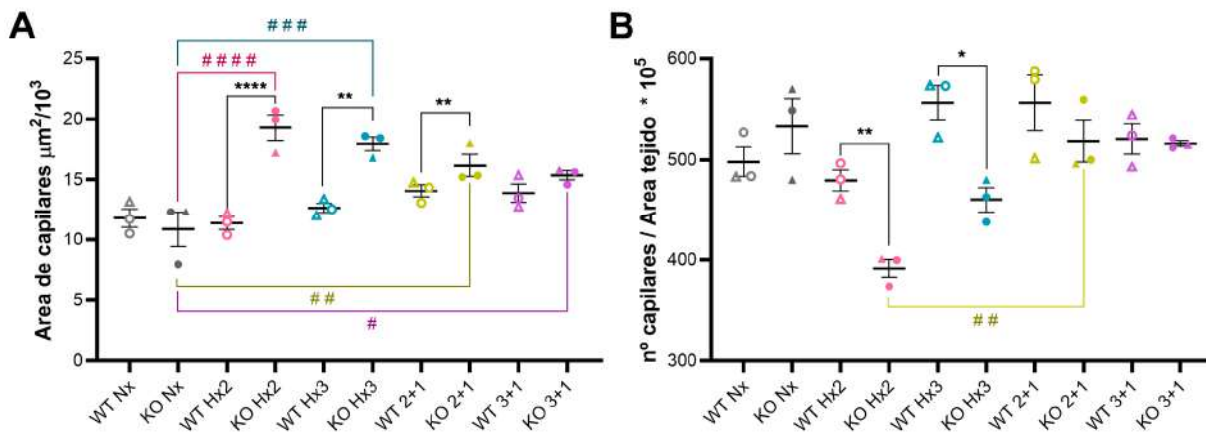


Figura 50. Análisis de la microvasculatura tras 1 semana de reoxigenación. Representación gráfica de la cuantificación del área de los capilares tras tinción con IB4 (A) y el número de capilares por área de tejido (B) en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en todas las condiciones: normoxia (Nx, puntos grises), exposición a hipoxia (2 semanas, Hx2, puntos rosas; 3 semanas, Hx3, puntos azules) y reoxigenación de 1 semana al 21% de O₂ después de 2 (2+1, puntos amarillos) o 3 (3+1, puntos morados) semanas de hipoxia respectivamente. Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

En conjunto, estos resultados nos permiten proponer que la señalización de HIF2 en el linaje *Wt1* es importante para mantener la correcta función cardiopulmonar y la estabilidad de estructuras microvasculares tras la exposición a Hx crónica. Además, los rescates tras el tratamiento con reoxigenación sugieren que los cambios patológicos observados en los compartimentos vasculares contribuidos por *Wt1* en ratones deficientes en *Hif2* *Hif2/Wt1* cKO son dependientes de Hx y reversibles en contacto con tensiones normales de O₂.

4. PAPEL DE HIF2 EN EL LINAJE WT1 DEL CUERPO CAROTÍDEO

Dada la importancia que tiene el CC en la respuesta sistémica ante una situación de Hx, además del papel fundamental que juega HIF2 en ese proceso, dentro de los objetivos de esta tesis nos propusimos evaluar este órgano en los nuevos modelos animales deficientes en *Hif2* en el linaje *Wt1* generados en el laboratorio.

4.1 ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE WT1 A POBLACIONES CAROTÍDEAS

Como se ha descrito en los apartados anteriores, y dado que hasta el momento no hay estudios que exploren la posible contribución del linaje *Wt1* a este órgano, en primer lugar, nos planteamos determinar si *Wt1* contribuía a alguna de las poblaciones que conforman el CC. Para ello, utilizamos el modelo reportero *Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (*Tomato^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*) para analizar la señal de Tomato (linaje *Wt1*) en combinación con el marcador específico de

linaje para células glómicas o tipo I (células de tipo neuronal, tirosina hidroxilasa positivas, TH⁺) junto con WGA para la identificación de perímetros celulares.

Aunque *Wt1* es un progenitor mesodérmico que empieza a expresarse en estadios muy tempranos en el desarrollo, debido a la notable dificultad técnica que supone la disección de las arterias carótidas en embriones, comenzamos a realizar el estudio de trazado de linaje a día embrionario E17,5. Sin embargo, a ese tiempo no observamos señal *Tomato*⁺ en ninguna célula del CC (**Figura 51**).

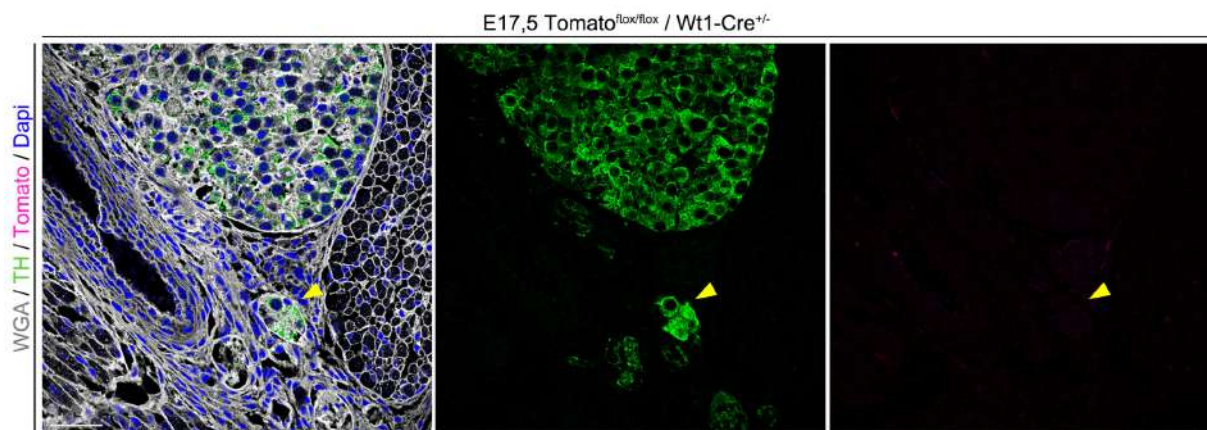


Figura 51. Ausencia de contribución del linaje *Wt1* al CC en etapas embrionarias. Imagen representativa de inmunofluorescencia sobre cortes en parafina de un embrión de ratón reportero control *Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre* (*Tomato*^{flox/flox}-*Wt1-Cre*^{+/-}) a E17,5 de desarrollo. Se identifica el contorno de las células con WGA (blanco), las células TH⁺ con (TH, verde) y las células de linaje *Wt1*, señal endógena de *Tomato* (magenta). Las flechas amarillas indican la localización anatómica del CC. Barra de escala 40µm.

A continuación, nos planteamos analizar el CC en etapas postnatales (P). Para ello, diseccionamos las arterias carótidas a días postnatal P14 (**Figura 52A**), P15 (**Figura 52B**), P16 (**Figura 52C**) y P28 (**Figura 52D**), observando señal *Tomato*⁺, probablemente reflejo de la expresión de *Wt1*, sólo en las células tipo I (TH⁺) a partir de P16, ya que no encontramos señal de *Tomato* ni a P14 ni a P15. A P28 confirmamos que aún se mantenía la expresión de *Tomato* en las células tipo I (TH⁺) y que no se había expandido a ningún otro tipo celular cercano (**Figura 52**).

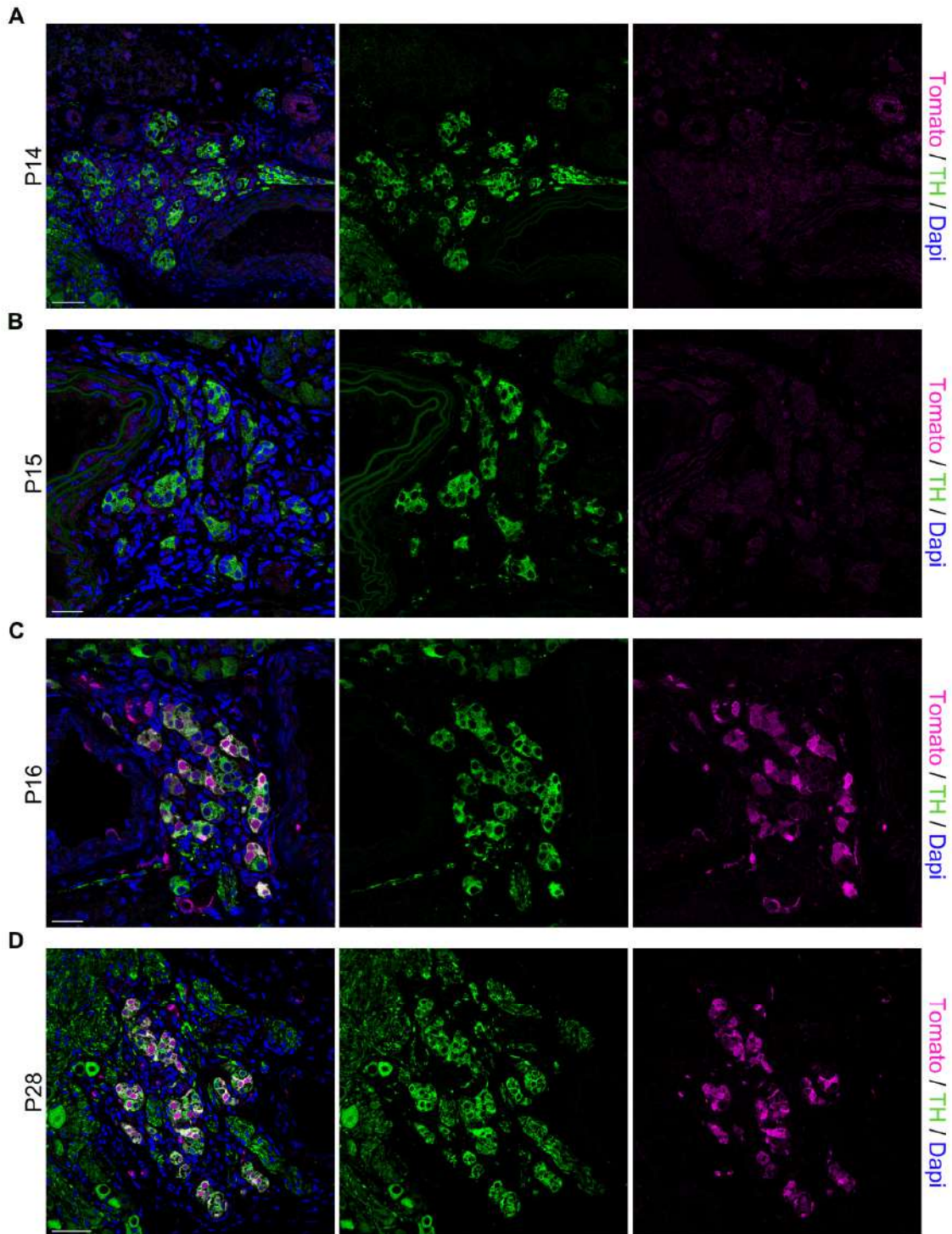


Figura 52. Análisis de trazado del linaje Wt1 sobre el CC en neonatos. Imágenes representativas de inmunofluorescencia sobre cortes en parafina de CCs de neonatos en ratones reporteros control Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre. En todas los paneles pueden observarse los marcajes con TH (células tipo I, verdes), Tomato (células de linaje Wt1, magenta) y núcleos coteñidos con Dapi (azul) en cortes de CCs de neonatos a P14 (**A**), P15 (**B**), P16 (**C**) y P28 (**D**). Barras de escala 40µm.

Así mismo, realizamos IF sobre cortes de CC en animales adultos, confirmando las observaciones en etapas postnatales a P16 y P28, que indicaban que las células del linaje Wt1 sólo eran las de tipo I (TH⁺) y no las de tipo II (GFAP⁺) (**Figura 53**).

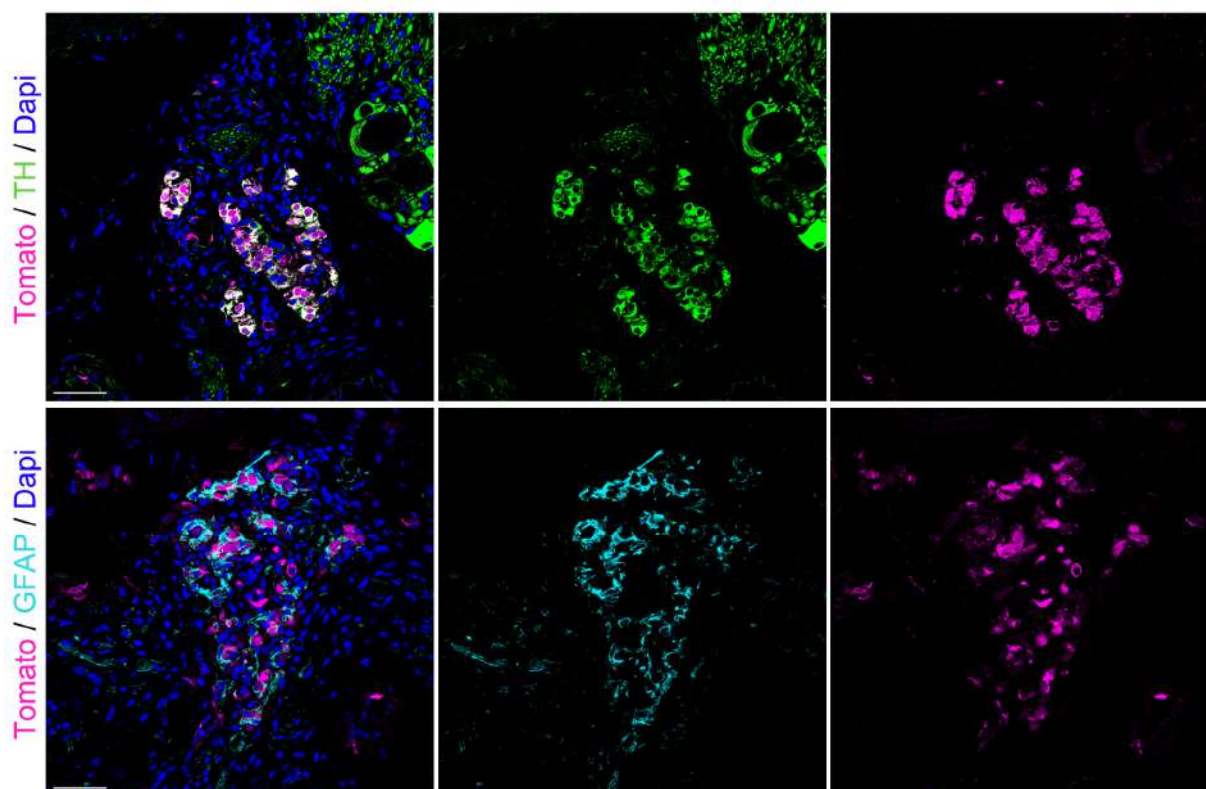


Figura 53. Análisis de la contribución del linaje Wt1 al CC en etapa adulta. Inmunofluorescencias representativas de CCs de ratones reporteros control Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre adultos. **A)** Marcaje contra TH (células de tipo I, verde), Tomato (células de linaje Wt11, magenta) y núcleos coteñidos con Dapi (azul) donde puede verse la contribución de Wt1 a las células de tipo I (TH⁺/Tomato⁺). **B)** Marcaje contra GFAP (células de tipo II, cyan), Tomato (células de linaje Wt11, magenta) y núcleos coteñidos con Dapi (azul) donde no se observa contribución de Wt1 a las células de tipo II (GFAP⁺/Tomato⁻). Barras de escala 40µm.

4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL CC EN LOS MUTANTES *Hif2/Wt1* cKO EN NORMOXIA

Una vez confirmada la contribución del linaje Wt1 a células glómicas de tipo I, que son precisamente las encargadas de sensor el O₂ en sangre para iniciar la respuesta sistémica a Hx, y considerando la importancia que tiene HIF2 en la organogénesis del CC (28), a continuación decidimos comprobar si la ausencia de HIF2 a partir de P16 en la población de células glómicas derivadas de Wt1 podía generar algún defecto en la integridad del CC y la adaptación a Hx.

Para ello, realizamos tinción de HE sobre cortes en parafina en ratones adultos control y mutantes *Hif2/Wt1* cKO. Tal y como se aprecia en la **Figura 54**, los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO tenían un CC perfectamente formado y con un área similar a los controles, lo que sugiere que la ausencia de HIF2 en células glómicas a partir de P16, una vez formado el CC, no resulta esencial para su correcto mantenimiento en condiciones de Nx.

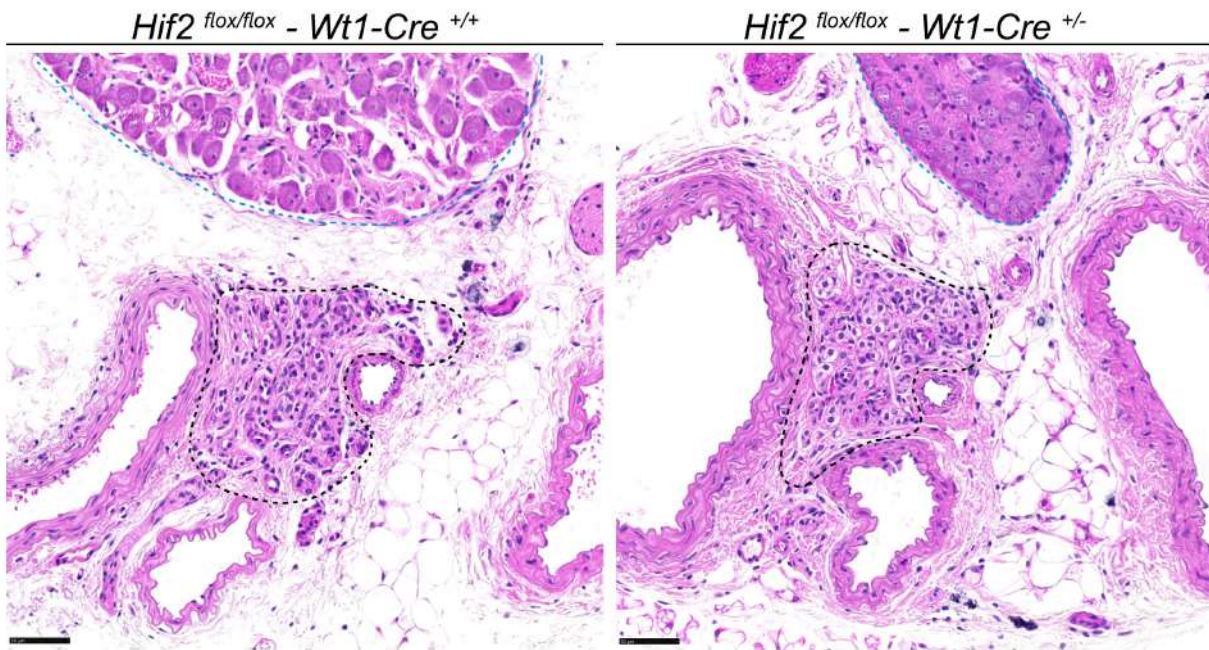


Figura 54. Caracterización histológica del CC en normoxia. Imágenes representativas de cortes en parafina del CC de ratones adultos control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) y mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho). El CC está delimitado por una línea discontinua negra, mientras que el ganglio cervical superior está delimitado por una línea discontinua azul. Barras de escala 50µm.

4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL CC EN MUTANTES *HIF2/WT1* CKO EN HIPOXIA

Como ya se mencionó en la introducción, el CC, aunque es un órgano pequeño es esencial para una correcta respuesta sistémica ante situaciones de Hx. Además, pese a ser un órgano con origen neuronal, hasta el momento es el único que se conoce que está formado por células que tienen un dinamismo proliferativo adaptativo según las condiciones ambientales y las necesidades sistémicas. En condiciones de Hx sostenida, el CC responde aumentando su tamaño. Las células TH⁺ estimulan la población de células madre GFAP⁺ del parénquima del CC para dar lugar a más células glómicas (28). Por ese motivo, y a la vista de la morfología normal del CC de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO, decidimos analizar la estructura de este pequeño órgano en los ratones control y deficientes para *Hif2α* tras la aplicación de los protocolos de Hx crónica de 2 y 3 semanas descritos anteriormente (**Figura 11**). Para ello, se realizó la tinción de HE sobre cortes transversales en parafina de las carótidas en estas condiciones de tensión de O₂ (**Figura 55A**). Como era de esperar en base a la literatura, los CC de los ratones control (paneles superiores) aumentaron su tamaño en respuesta a la bajada sostenida en la tensión de O₂ durante 2 y 3 semanas. Sin embargo, aunque el tamaño del CC de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO en Nx era similar al de los controles, durante la exposición a Hx no aumentaron el tamaño del órgano, manteniéndose con las mismas dimensiones que en condiciones de Nx (paneles inferiores) (**Figura 55B**).

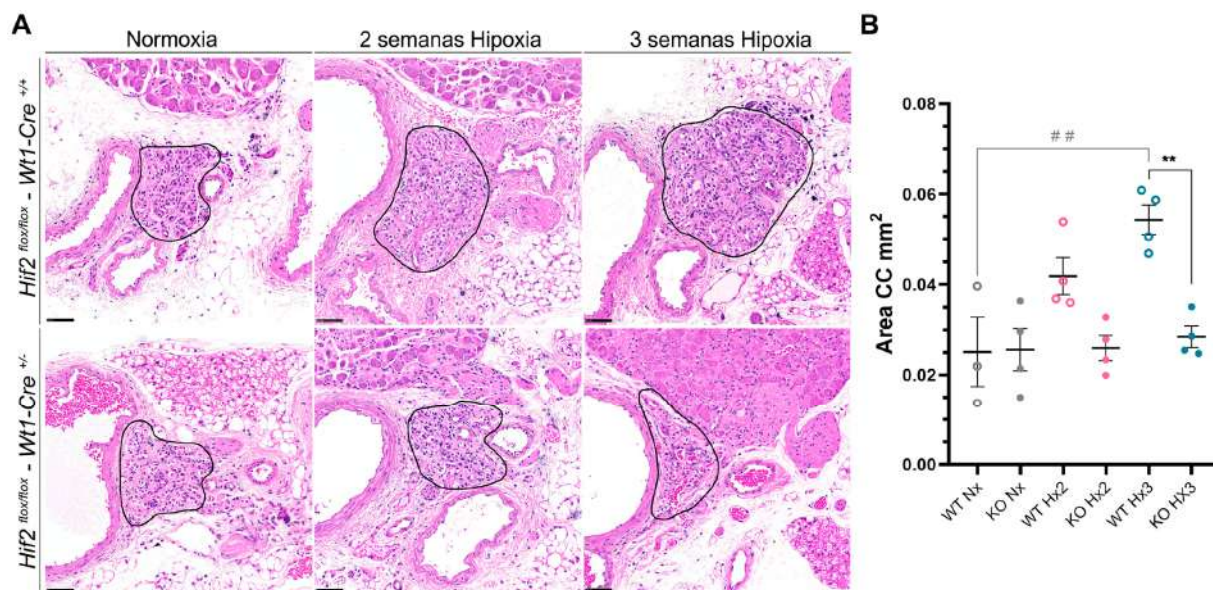


Figura 55. Caracterización histológica del CC tras exposición a hipoxia crónica. **A)** Imágenes representativas de cortes en parafina del CC de ratones adultos control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{-/-}*, paneles inferiores) en condiciones de normoxia (paneles izquierdos) y tras 2 (paneles centrales) o 3 (paneles derechos) semanas de exposición a hipoxia crónica. El CC está delimitado por una línea negra. Barras de escala 50µm. **B)** Cuantificación representada en gráfico de puntos del área del CC en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en todas las condiciones: Normoxia (Nx, puntos grises), 2 semanas de hipoxia (Hx2, puntos rosas) y 3 semanas de hipoxia (Hx3, puntos azules). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

Para explorar más en detalle qué mecanismos estaban operando a nivel celular, llevamos a cabo estudios de IF con marcadores para células glómicas tipo I (TH⁺, verde), células sustentaculares tipo II (GFAP⁺, magenta) y los núcleos se detectaron con Dapi (Azul) en ratones control y mutantes *Hif2/Wt1* cKO tanto en condiciones de Nx, como tras 2 y 3 semanas de Hx (**Figura 56A**). Las imágenes por IF mostraron un claro aumento del número de células TH⁺ en los ratones control (paneles superiores) tras 2 y 3 semanas de Hx en comparación con los valores de Nx. Sin embargo, en los CC de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (paneles inferiores) el número de células TH⁺ permanecía igual en Hx (2 y 3 semanas) que en la situación de Nx (**Figura 56**).

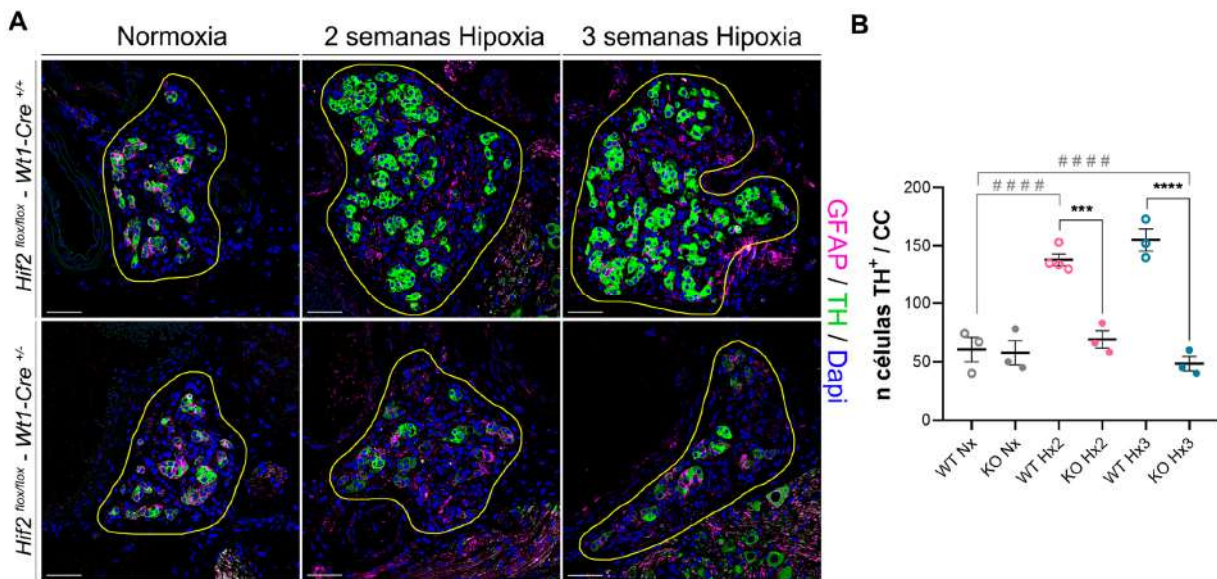


Figura 56. Caracterización celular del CC tras exposición a hipoxia crónica. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia con los marcajes: TH (células tipo I, verde), GFAP (células tipo II, magenta) y Dapi (núcleos, azul) sobre cortes en parafina del CC de ratones adultos control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles superiores) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{-/-}*, paneles inferiores) en condiciones de normoxia (paneles izquierdos) y tras 2 (paneles centrales) o 3 (paneles derechos) semanas de exposición a hipoxia crónica. El CC está delimitado por una línea amarilla. Barras de escala 40µm. **B)** Cuantificación representada en gráfico de puntos del número de células TH⁺ por CC en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en todas las condiciones: Normoxia (Nx, puntos grises), 2 semanas de hipoxia (Hx2, puntos rosas) y 3 semanas de hipoxia (Hx3, puntos azules). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

Estos resultados indican que HIF2 en el linaje Wt1 en las células glómicas de tipo I del CC, no es esencial para un correcto mantenimiento del órgano en condiciones de Nx, pero sí para su expansión y función en respuesta a Hx crónica.

5. PAPEL DE HIF2 EN EL LINAJE DE Wt1 DEL BAZO

Por último, decidimos analizar el papel de HIF2 en el linaje Wt1 del bazo, ya que este órgano también se ha descrito que está contribuido parcialmente por Wt1 (91) y responde a bajos niveles de O₂ mediante una respuesta hipertrófica (esplenomegalia) para favorecer una mayor recuperación de eritrocitos en Hx (30, 36, 106). Alicia Bellomo et al., describieron previamente la contribución de Wt1 a la red de fibroblastos que actúan como nicho celular que sustenta a los macrófagos de la pulpa roja (MPR) de este órgano (38), si bien el papel de HIF2 en esta población en respuesta a Hx no se ha evaluado. Por ello, decidimos llevar a cabo un estudio preliminar sobre la importancia de la señalización por HIF2 en el bazo de animales control o deficientes para Hif2 en el linaje Wt1 expuestos a Hx.

5.1 ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE Wt1 A POBLACIONES ESPLÉNICAS

Aunque la caracterización de la contribución de Wt1 al bazo ha sido estudiada previamente, quisimos confirmar si, al igual que en el resto de órganos analizados en este trabajo de tesis, Wt1 contribuía a la microvasculatura del bazo y, como sucede en el pulmón, descartar su contribución a poblaciones hematopoyéticas, en concreto a células linfoides de la pulpa blanca (PB) y MPR. Para valorar este punto, realizamos dos IFs incluyendo marcadores de linaje vascular y hematopoyético. Por una parte, combinamos Tomato (linaje Wt1, magenta) junto con IB4 (contorno de CEs, verde) y Dapi (azul) para coteñar los núcleos (**Figura 57A**). Por otra parte, combinamos Tomato (linaje Wt1, magenta) junto con el marcador B220 (que tiñe la membrana de los linfocitos B localizados principalmente en los nichos de la PB, cyan), F480 (que tiñe las membranas de los macrófagos, verde) y Dapi para coteñar los núcleos en azul (**Figura 57B**).

Tras el análisis de estas IFs, pudimos observar que, a diferencia de lo que observamos en el corazón o el pulmón, en el bazo casi no hay colocación de la señal Tomato con la de IB4, ni a nivel de microvasculatura, ni en las áreas de endotelio arterial (**Figura 57A**). Además, tampoco encontramos solapamiento de Tomato con las señales de B220 ni F480, descartando por tanto la contribución de Wt1 a las poblaciones linfoides y a macrófagos del bazo (**Figura 57B**). Sin embargo, el patrón de la señal de Tomato que pudimos detectar, incluía el mesotelio externo (91) y además, podría corresponder a los fibroblastos que conforman el nicho de la PR donde se sustentan los macrófagos, de acuerdo a lo que ha sido previamente publicado (38).

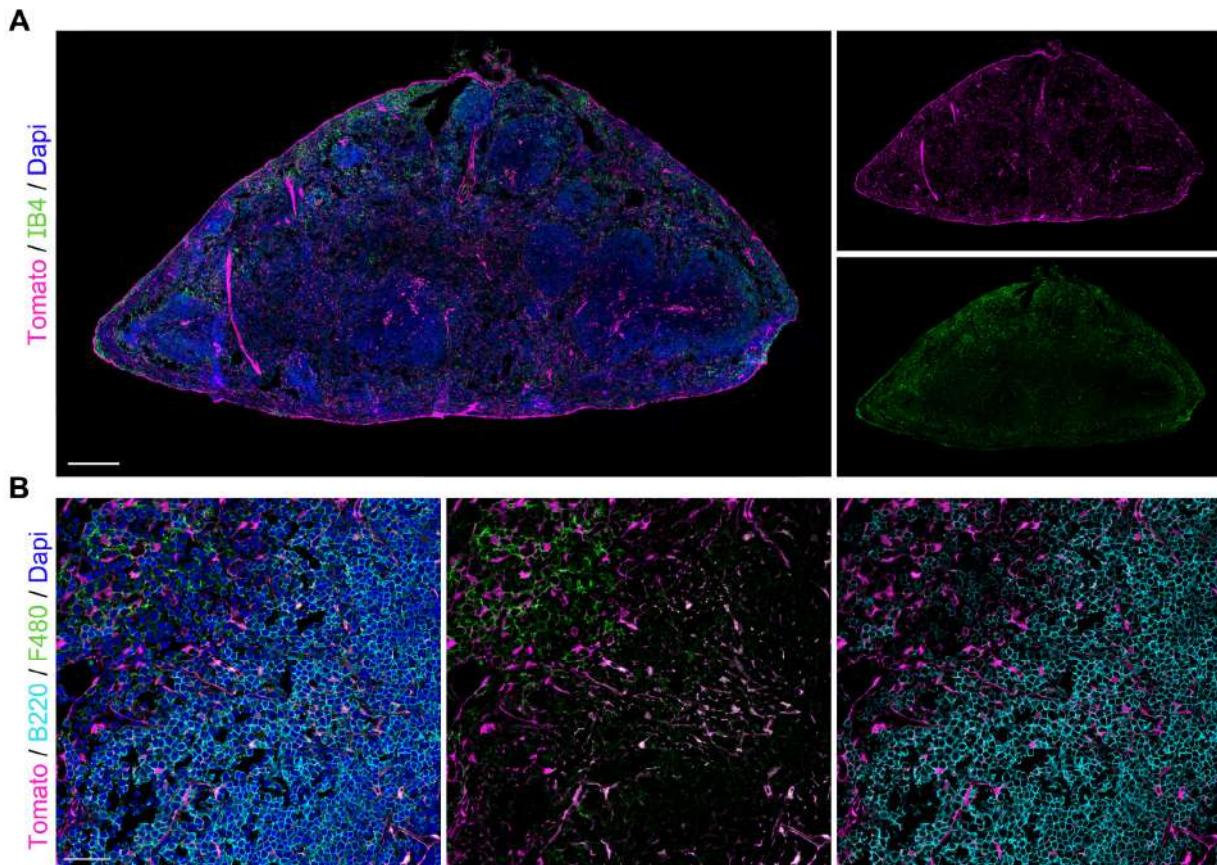


Figura 57. Análisis de trazado de linaje de la contribución de Wt1 al bazo. Imágenes representativas de inmunofluorescencias realizadas sobre cortes en OCT del bazo de un ratón reportero adulto *Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre*. **A)** Marcaje combinando IB4 (contorno de CEs, verde), Tomato (células de linaje Wt1) y núcleos con Dapi (azul). Barra de escala 250μm. **B)** Marcaje con F480 (contorno de macrófagos, verde), B220 (contorno de linfocitos B, cyan), Tomato (células de linaje Wt1) y núcleos con Dapi (azul). Barra de escala 40μm.

5.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL BAZO EN MUTANTES *Hif2/Wt1* CKO EN NORMOXIA

Una vez confirmada la contribución de Wt1 con respecto a la literatura científica, al igual que en apartados anteriores, procedimos a efectuar una valoración en Nx del estado del bazo en ratones control y mutantes *Hif2/Wt1* cKO. Para ello, primero, al igual que en los estudios cardiacos, calculamos el peso del bazo con respecto al peso corporal del ratón (*Spleen Weight/Body Weight*, SW/BW), observando que en este órgano tampoco había diferencias significativas entre los bazos de los ratones control (WT) con respecto a los bazos de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en condiciones de Nx (**Figura 58**).

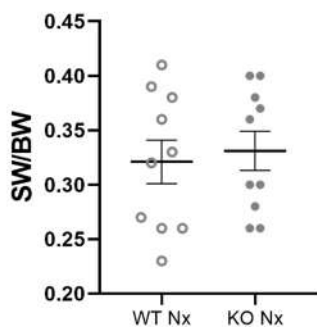


Figura 58. Análisis del peso del bazo en normoxia. Comparación entre el cociente *spleen weight to body weight* (SW/BW) de ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en condiciones de normoxia. Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm el error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico con T-Test.

A continuación, realizamos una IF con los marcadores B220 (amarillo) y F480 (magenta) para marcar la PB y la PR respectivamente junto con Dapi (azul) para determinar si el patrón de distribución de ambas pulpas en los ratones control y mutantes *Hif2/Wt1* cKO era similar o presentaba alguna diferencia (**Figura 59**).

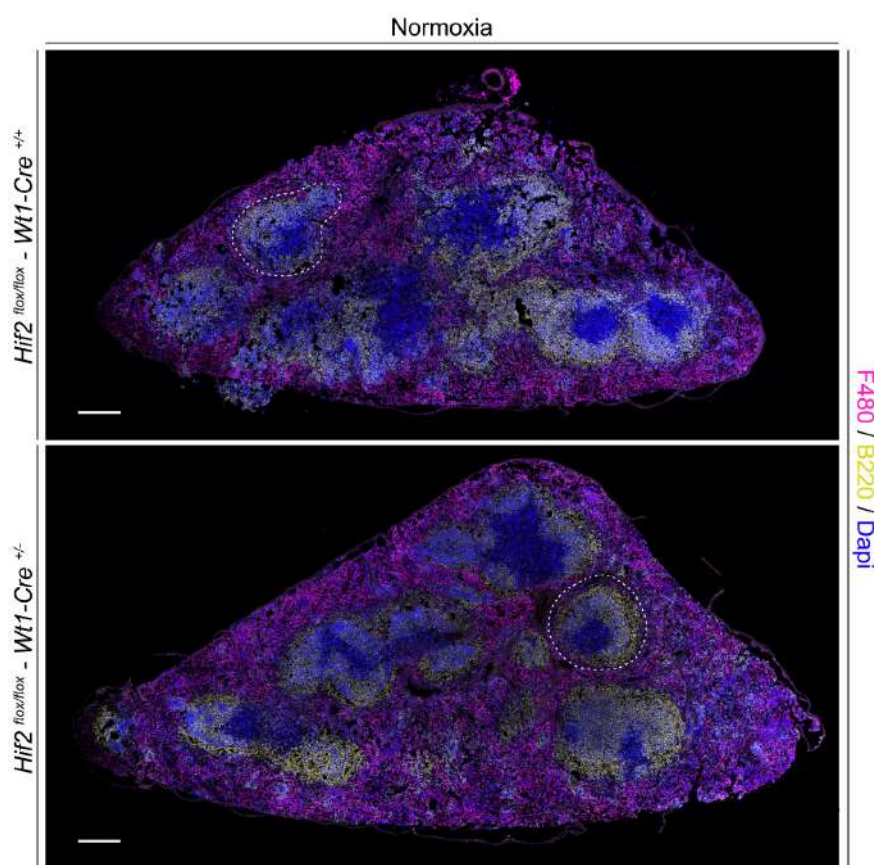


Figura 59. Caracterización del patrón de distribución de las poblaciones de pulpa blanca y pulpa roja en normoxia. Imágenes representativas de inmunofluorescencia realizada sobre cortes en OCT de bazo de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel superior) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel inferior) con los marcajes F480 (macrófagos de la PR, magenta), B220 (linfocitos de la PB, amarillo) y Dapi (núcleos, azul). En ambas imágenes la línea discontinua blanca delimita uno de los nichos de PB. Barras de escala 250 μ m.

Como puede apreciarse en la imagen representativa de la **Figura 59**, la distribución de ambas pulpas era similar en los ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel superior) y los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel inferior) en Nx, distinguiéndose bien ambas pulpas tal y como se indica por una línea discontinua blanca que define un nicho de la PB.

Estos datos indican que, al igual que ocurría en los demás órganos estudiados en esta tesis, la eliminación de HIF2 en células del linaje *Wt1* no tiene ningún efecto perjudicial para la correcta homeostasis del bazo en condiciones de tensiones normales de O_2 .

5.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL BAZO EN MUTANTES *HIF2/Wt1* cKO EN RESPUESTA A HIPOXIA

Una observación recurrente en las necropsias realizadas durante el desarrollo de esta tesis, fue el claro aumento del tamaño del bazo (esplenomegalia) que presentaban los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO respecto a los controles tras la exposición a Hx crónica durante 2 y 3 semanas (**Figura 60A**). Al igual que en los análisis de Nx y los estudios cardiacos tras Hx sostenida, calculamos el peso del bazo con respecto al peso corporal del ratón para determinar si efectivamente, esa apreciación macroscópica sobre el tamaño del bazo se traducía en diferencias significativas en el tamaño de este órgano entre los ratones control y los mutantes *Hif2/Wt1* cKO.

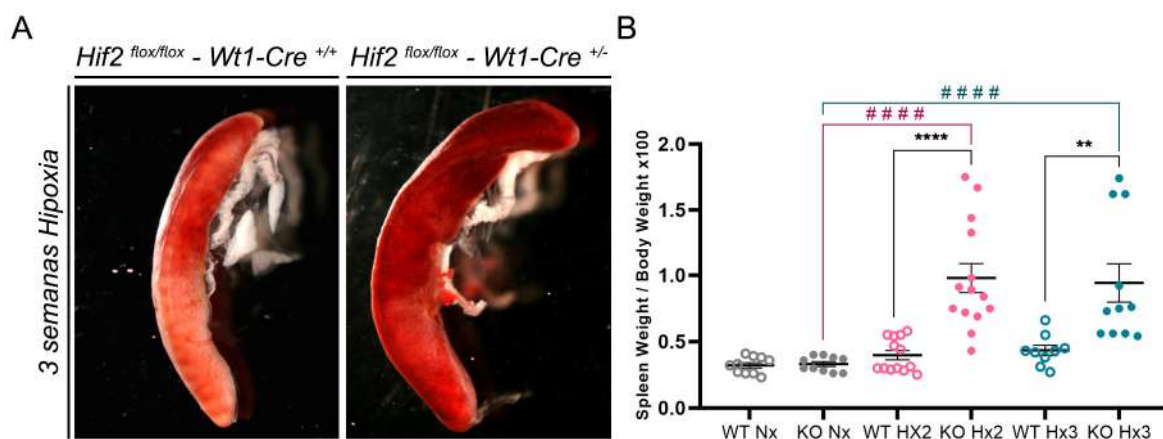


Figura 60. Análisis macroscópico de los cambios sufridos en el bazo tras exposición a hipoxia crónica. A) Imágenes representativas de un bazo de ratón control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) y mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel derecho) tras la exposición a 3 semanas de hipoxia. Fotografías a 0,8X con lupa Leica MZFLIII. **B)** Representación gráfica del tamaño del bazo relativo al tamaño corporal del ratón en individuos control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en todas las condiciones: Normoxia (Nx, puntos grises), 2 semanas de hipoxia (Hx2, puntos rosas) y 3 semanas de hipoxia (Hx3, puntos azules). Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales ± el error estándar de la media (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0,0001.

Como puede apreciarse tanto en la **Figura 60A**, como en la gráfica de cuantificación de pesos (**Figura 60B**), los bazos de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO eran significativamente más grandes que los controles, que presentaban un tamaño y peso similares a los bazos en Nx.

Para investigar en profundidad las bases de estos cambios fenotípicos, a continuación, realizamos un análisis histológico detallado sobre cortes de parafina teñidos con HE para valorar la estructura tisular del bazo en estos modelos tras la exposición a Hx (**Figura 61**).

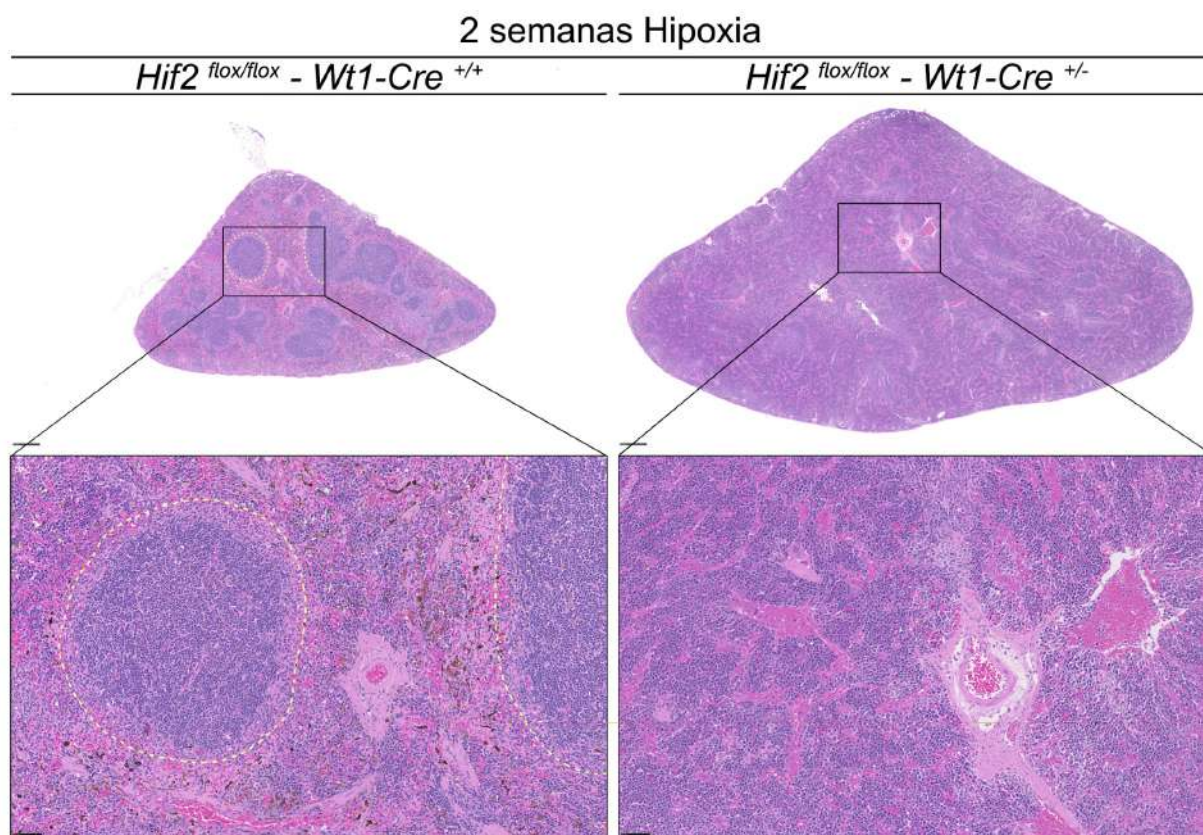


Figura 61. Caracterización histológica del bazo tras exposición a hipoxia crónica. Imágenes representativas de bazos de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles izquierdos) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles derechos) en cortes de parafina teñidos con HE. Tanto en la imagen completa del bazo del ratón control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*) como en la magnificación de los paneles inferiores, están delimitados los nichos de PB con una línea discontinua amarilla. Barras de escala de bazos completos 250 μ m. Barras de escala de magnificaciones, 50 μ m.

Como se aprecia en la **Figura 61**, el bazo de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles izquierdos) presenta una morfología similar a la observada en Nx, con una buena distinción entre PR (color rosa) y PB (áreas más o menos redondeadas de tonalidad morada [en la magnificación, delimitadas por líneas discontinuas amarillas]). En cambio, el bazo de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, paneles derechos) ha perdido esa organización y apenas pueden distinguirse la PR de la PB. Además, cabe destacar su aumento de tamaño en comparación con el control como puede apreciarse tanto en esta **Figura 61** como en las imágenes macroscópicas del bazo (**Figura 60A**) y el cociente de su peso (**Figura 60B**). Por otro lado, en los cortes histológicos de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, paneles izquierdos) apreciamos numerosos depósitos de hemosiderina (manchas marrones) distribuidos por la PR, resultado de la degradación de hemoglobina en glóbulos rojos por parte de los

macrófagos residentes para asegurar el reciclaje de eritrocitos senescentes. Sin embargo, en los cortes de bazo de ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO, no apreciamos estos depósitos de hemosiderina al teñir con HE (**Figura 61**). Por ese motivo, decidimos realizar un análisis más específico para poder detectar de manera más eficiente estos acúmulos de hierro, para lo que empleamos la tinción de Perls (**Figura 62**).

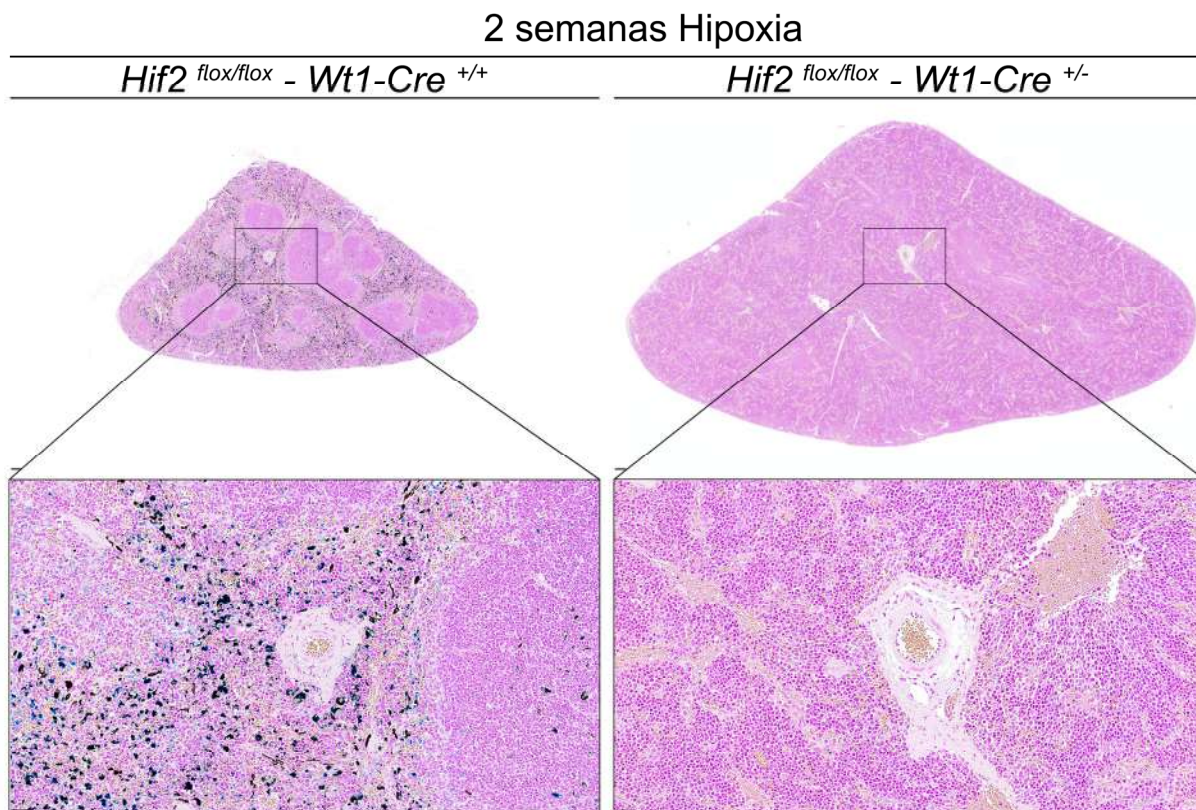


Figura 62. Caracterización de los depósitos de hemosiderina tras la exposición a 2 semanas de hipoxia crónica. Imágenes representativas en cortes de parafina teñidos con Perls para la localización y distinción de los depósitos de hemosiderina (teñidos de color azul). Las imágenes de la izquierda corresponden al corte transversal de un bazo completo y su magnificación de un ratón control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*), mientras que las imágenes de la derecha muestran un bazo completo en corte transversal y su magnificación de un ratón mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*). Barras de escala de bazos completos 250µm. Barras de escala de magnificaciones, 50µm.

Con esta nueva tinción específica (**Figura 62**), los acúmulos de hierro eran fácilmente identificables ya que se tiñeron de color azul. Los resultados obtenidos confirman las observaciones previas con la tinción de HE de la **Figura 61**. Los ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel izquierdo) presentaron numerosos depósitos de hemosiderina a lo largo de toda la PR. Por el contrario, en la imagen de la derecha, donde se muestra una imagen representativa de un bazo de ratón mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*), no se observó ningún foco de color azul que identificara acúmulos de hemosiderina característico de esta tinción (**Figura 62**).

Para comprender mejor la organización del tejido y la distribución de PR y PB en los bazo, tanto de ratones control como mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras la exposición a Hx crónica, repetimos la IF que habíamos realizado anteriormente en Nx para analizar la organización de ambas pulpas. Combinamos el marcador de linfocitos B, B220 (amarillo, delimitaría principalmente la PB), junto con el F480 para identificar macrófagos (magenta, delimitaría principalmente la PR) y coteñimos los núcleos con Dapi (azul) (**Figura 63**).

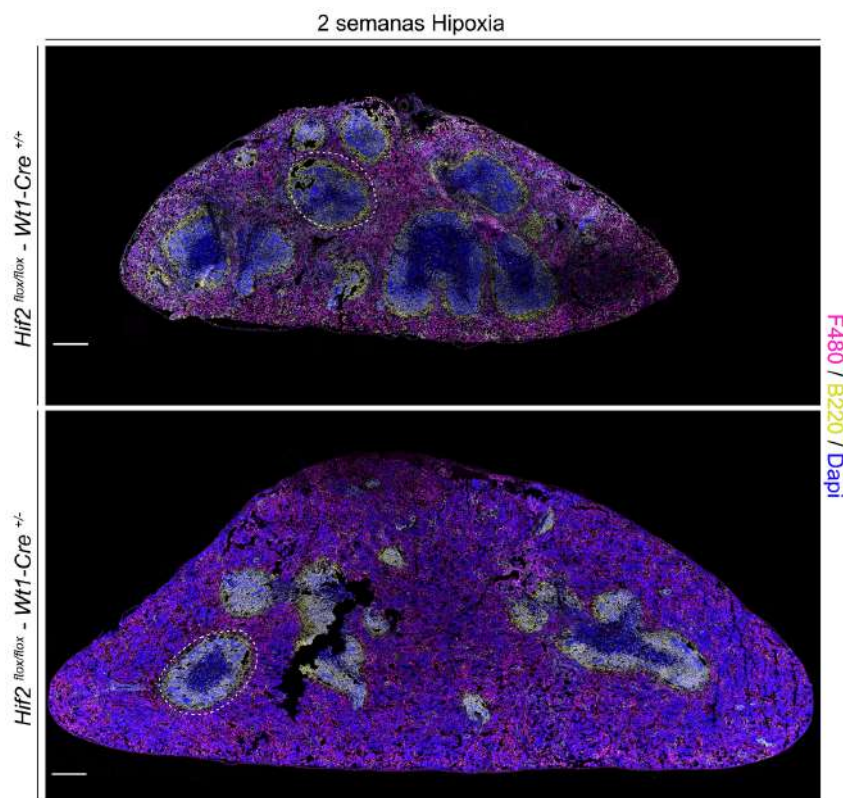


Figura 63. Caracterización del patrón de distribución de las poblaciones de PB y PR tras 2 semanas de exposición a hipoxia.

Imágenes representativas de inmunofluorescencia realizada sobre cortes en OCT de bazo de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel superior) y mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel inferior) con los marcajes F480 (macrófagos de la PR, magenta), B220 (linfocitos de la PB, amarillo) y Dapi (núcleos, azul). En ambas imágenes la línea discontinua blanca delimita uno de los nichos de PB. Barras de escala 250µm.

Tal y como se aprecia en la imagen representativa de la **Figura 63**, los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel inferior) sí presentaban PB (línea discontinua blanca sobre uno de los nichos), aunque no resultaba fácilmente distinguible ni por tinción con HE (**Figura 61** y **Figura 62**), ni con la tinción de Perls anteriores y además, apreciamos una disminución del tamaño de los folículos y sus centros germinales. Esta IF reveló que el tejido correspondiente a la PR se había extendido, separando los nichos de PB y dándole al bazo un aumento de tamaño. Para confirmar esta apreciación, realizamos otra IF combinando los marcajes de linaje IB4 (contorno de CEs, rojo, permitiendo a su vez, valorar el estado de la microvasculatura) junto con el marcador de proliferación Ki67 (blanco) y Dapi (azul) para coteñar los núcleos (**Figura 64**). El análisis de esta IF evidenció que, efectivamente, es la PR la que se expande tras la exposición a Hx crónica y que si bien en respuesta a Hx se aprecia un notable nivel de proliferación de PR tanto en ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel superior)

como mutantes *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel inferior), en los ratones deficientes para HIF2 resultaba más patente, no siendo posible encontrar zonas de la PR que no presenten señal positiva de Ki67. Además, como podemos apreciar en las magnificaciones de la figura 64 remarcados en verde (A y B), mientras que en el ratón control (**Figura 64A**) prácticamente no encontramos CEs proliferando (zona delimitada por línea amarilla en A), en el ratón mutante *Hif2/Wt1* cKO (**Figura 64B**) identificamos CEs Ki67⁺ (zona delimitada por línea amarilla en B), lo que sugiere que en estos ratones no sólo hay proliferación de células que componen la PR sino que también hay una expansión del endotelio esplénico.

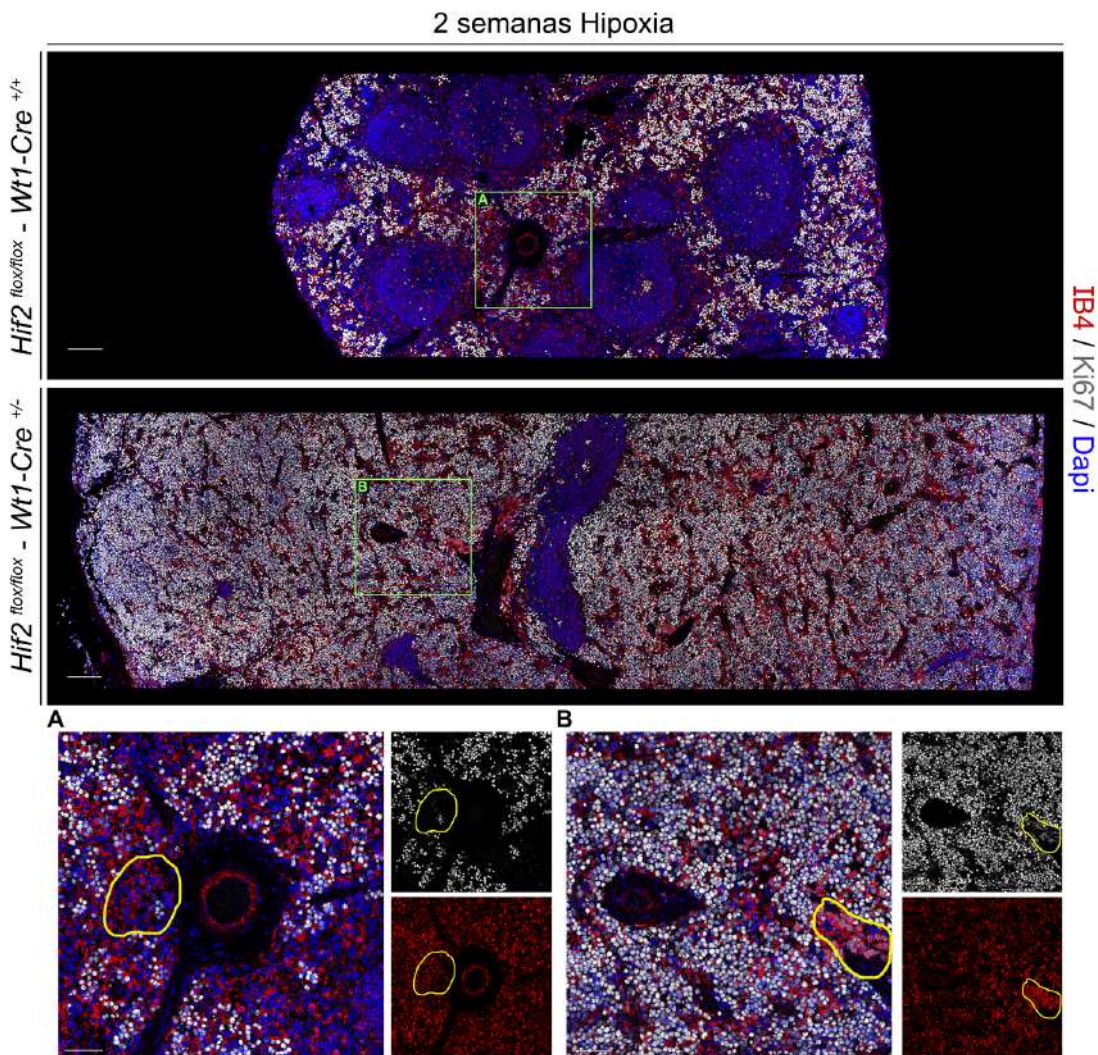


Figura 64. Determinación del patrón de proliferación de las poblaciones esplénicas tras 2 semanas de exposición a hipoxia. Imágenes representativas de inmunofluorescencia realizada sobre cortes en OCT de bazo de ratones control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, panel superior) y mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, panel inferior) con los marcajes IB4 (contorno de CEs, rojo), Ki67 (proliferación, blanco) y Dapi (núcleos, azul). Barras de escala 250µm. **A)** Magnificación sobre bazo de ratón control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*). **B)** Magnificación sobre bazo de ratón mutante *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*). Las líneas amarillas delimitan una zona con gran contenido en endotelio en base a la señal IB4⁺. Barras de escala de magnificaciones, 40µm.

Asimismo, confirmamos que los nichos de la PB prácticamente no proliferaban, habiendo muy poca señal de Ki67 en su interior tanto en los ratones control como en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (**Figura 64**).

En base a estos resultados de proliferación, quisimos explorar preliminarmente mediante citometría de flujo/FACS si efectivamente había mayor número de células CD45⁺ en los bazoos procedentes de ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en comparación con los procedentes de controles (WT).

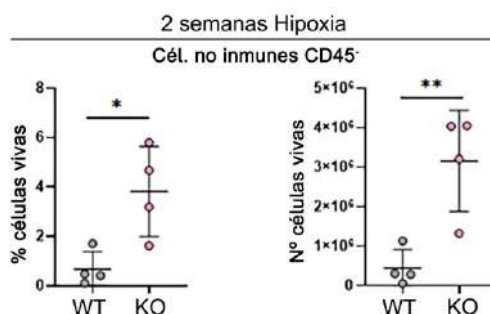


Figura 65. Análisis por citometría de flujo de poblaciones no hematopoyéticas del bazo.

Representación en gráfico de puntos del porcentaje (%; panel izquierdo) y valor absoluto (Nº; panel derecho) de células vivas CD45⁺ en bazoos de ratones control (WT, puntos grises) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO, puntos rosas) tras 2 semanas de exposición a hipoxia. Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm la desviación estándar (SD). Análisis estadístico con T-Test, p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

Tal y como puede observarse en la **Figura 65**, sí que hay un claro aumento tanto en el porcentaje (panel izquierdo) como en el número absoluto (panel derecho) de células CD45⁺, en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (puntos rosas) en comparación con los controles (puntos grises). Si bien es cierto que estas células podrían ser tanto CEs, como FBs o eritrocitos (entre otras poblaciones), tras las observaciones previas de proliferación mostradas en la **Figura 64**, es evidente que parte de ese incremento era debido al aumento de CEs como ocurría en los órganos descritos anteriormente en este trabajo de tesis. Aunque estas observaciones son preliminares y sería necesario aumentar el tamaño muestral para reducir la dispersión de los datos, análisis adicionales de citometría de flujo/FACS mostraron un aumento significativo de la población de macrófagos de la zona marginal (zona que rodea la PB, paneles izquierdos) y una tendencia al alza de macrófagos de la PR (paneles derechos) en los bazoos de ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en comparación con los controles (WT) (**Figura 66**).

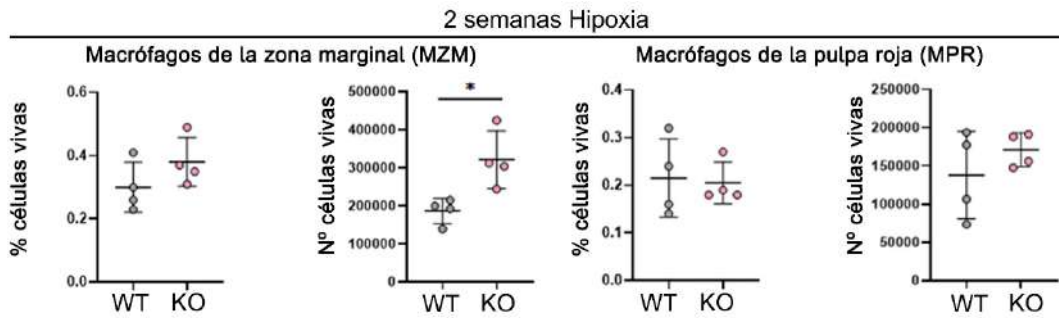


Figura 66. Análisis por citometría de flujo de los macrófagos de la Zona Marginal (MZM) y la Pulpa Roja (MPR) en hipoxia. Representación en gráfico de puntos del porcentaje y número total de los macrófagos de la zona germinal (MZM, paneles izquierdos) y de macrófagos de la pulpa roja (MPR, paneles derechos) en bazo de ratones control (WT, puntos grises) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO, puntos rosas) tras 2 semanas de exposición a hipoxia. Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm la desviación estándar (SD). Análisis estadístico con T-Test, p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

Por otro lado, y basándonos en los resultados previos descritos sobre la ausencia de hemosiderina en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO que observábamos tanto con la tinción de HE (Figura 61), como con Perls (Figura 62), realizamos hematologías básicas a los ratones control y mutantes *Hif2/Wt1* cKO en condiciones de Nx y tras 2 y 3 semanas de exposición a Hx crónica con el fin de valorar los niveles de hematocrito (glóbulos rojos/volumen de sangre, Figura 67A), hemoglobina (Figura 67B) y plaquetas (Figura 68).

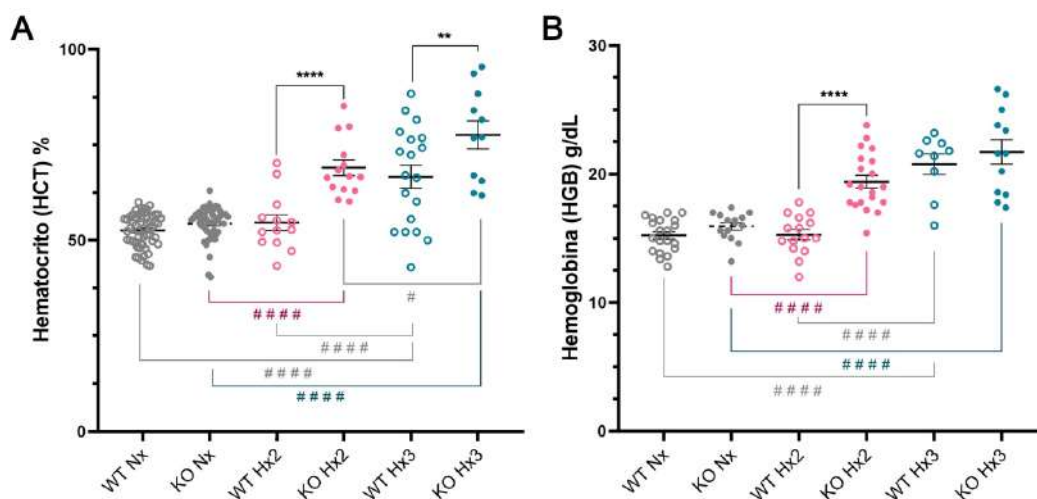


Figura 67. Análisis de los niveles de hematocrito y hemoglobina en sangre. Representación en gráfico de puntos de los valores obtenidos por hematología tras punción cardiaca en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en todas las condiciones de tensiones de O_2 : normoxia (Nx, puntos grises), 2 semanas de hipoxia (Hx2, puntos rosas) y 3 semanas de hipoxia (Hx3, puntos azules). **A)** Valores del hematocrito, expresado en porcentaje. **B)** Valores de la hemoglobina, expresada en gramos/decilitro. Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm la desviación estándar (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

Los resultados obtenidos del hematocrito y la hemoglobina sugieren que si bien se producía una respuesta adaptativa a Hx en el ratón control (WT) incrementando ambos valores tras 3 semanas de Hx para compensar la falta de O₂ en los tejidos, la respuesta a Hx de los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) estaba potenciada y acelerada, aumentando ya los valores tanto de HCT como de HBG de manera significativa a 2 semanas de Hx, como puede verse en la **Figura 67**. Además, las hematologías revelaron una bajada significativa natural de las plaquetas tanto en los controles (WT) como en los mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) tras la exposición a Hx crónica. Sin embargo, este descenso en el número de plaquetas era mucho más acusado en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO), pudiendo reflejar el fenotipo de inestabilidad vascular y hemorrágico de los órganos de estos animales analizados (**Figura 68**).

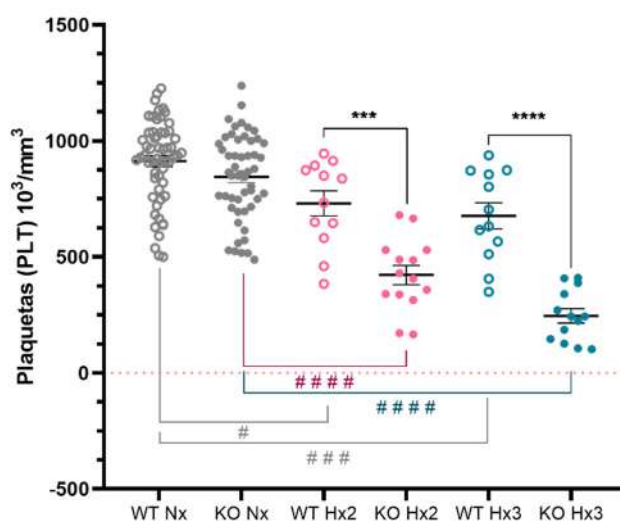


Figura 68. Análisis de los niveles de plaquetas en sangre. Representación en gráfico de puntos de los valores obtenidos por hematología tras punción cardiaca en ratones control (WT) y mutantes *Hif2/Wt1* cKO (KO) en todas las condiciones de tensiones de O₂: normoxia (Nx, puntos grises), 2 semanas de hipoxia (Hx2, puntos rosas) y 3 semanas de hipoxia (Hx3, puntos azules). La línea discontinua naranja establece el valor 0. Cada condición se representa como la media (línea negra) de valores individuales \pm la desviación estándar (SEM). Los (*) muestran las diferencias estadísticas entre ratones WT y KO de la misma condición (Nx o Hx). Los (#) indican significación entre ratones con el mismo genotipo pero distinta condición (Nx vs Hx). Análisis estadístico mediante ANOVA de 1 factor para comparaciones múltiples con corrección de Tukey. p valor: * P \leq 0,05; ** P \leq 0,01; *** P \leq 0,001; **** P \leq 0,0001.

Estos resultados sugieren que la ausencia de HIF2 en el linaje *Wt1* en este órgano tras exposición a Hx crónica, desencadena una proliferación descontrolada de células, tanto de la PR como del endotelio, favoreciendo la esplenomegalia. Además, la pérdida de acúmulos de hemosiderina (señal del buen funcionamiento del bazo) en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO, nos permite proponer un nuevo papel de HIF2 en el bazo durante la adaptación a Hx crónica. Así, la falta de HIF2 en los fibroblastos que componen el nicho de la PR sobre la que se sustentan los macrófagos, puede provocar que los macrófagos, aunque estén presentes, no sean

funcionales y por ese motivo no sean capaces de degradar los eritrocitos senescentes en el bazo como sugiere la ausencia de acúmulos de hemosiderina (**Figura 61** y **Figura 62**), lo que conduce a un nivel de HCT y HBG muy superior al fisiológicamente necesario como medida compensatoria a la hipoxia (**Figura 67**). Estas adaptaciones, sumadas a la bajada en el número de plaquetas, podrían explicar el color rojo oscuro que observamos en las imágenes macroscópicas debido a la acumulación de esos eritrocitos en el bazo (**Figura 60**) y demás órganos analizados (**Figura 18** y **Figura 34**).

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

DISCUSIÓN

1. IMPORTANCIA DE HIF2 EN LA PROGRESIÓN DE HP MÁS ALLÁ DE SU PAPEL EN ENDOTELIO

Como ya se ha comentado a lo largo de este trabajo de tesis, la Hx crónica en pacientes con enfermedades cardiorespiratorias está asociada a un remodelado vascular severo con remuscularización de las arteriolas distales del pulmón, inflamación y fibrosis a lo largo de las arterias principales, resultando en la oclusión parcial de la vasculatura del pulmón, la elevación de la PSVD y el subsiguiente fallo del VD (70). Estudios previos han demostrado que estos cambios en las arterias pulmonares también se dan en modelos de experimentación (ratas y ratones) sometidos a Hx, ofreciendo así un buen modelo de estudio para la enfermedad de HP y otras alteraciones cardiovasculares que puedan tener lugar durante la exposición a Hx crónica. Además, se ha implicado directamente al factor de transcripción HIF2 α y su papel en las CEs con el desarrollo y progresión del remodelado vascular y la elevación de la PSVD durante la exposición a Hx crónica en ratones (59-61). Sin embargo, HIF2 no juega un papel crucial en CMLs (78) o en PCs (79) para el desarrollo de la HP.

Precisamente debido a la escasez de estudios que valoren el impacto de la pérdida de función de HIF2 de forma simultánea en distintos tipos celulares, como podría ocurrir de manera sistémica en los pacientes con HP o residentes a altitud elevada, en este trabajo hemos generado un nuevo modelo de ratón *Hif2/Wt1* cKO, en el que se ha deletado *Hif2 α* en el linaje *Wt1*, que recordamos, contribuye a CEs, tanto de la microvasculatura como de las arterias, CMLs de la capa muscular de las arterias, PCs y FBs intersticiales tanto del corazón como de los pulmones (**Figura 5**, **Figura 7**, **Figura 28** y **Figura 30**). Por lo tanto, este nuevo modelo, junto con los ratones reporteros para localizar las células contribuidas por *Wt1* con la señal de Tomato, nos ha permitido revisar el papel de HIF2 durante la exposición a Hx crónica por un periodo de 2 y 3 semanas y valorar así los defectos estructurales y funcionales en el corazón y los pulmones más allá del compartimento endotelial. Ciertamente, la ventaja que proporciona este modelo frente a los descritos anteriormente, es que las alteraciones producidas tras la exposición a Hx crónica podrían anticipar algunos de los efectos secundarios asociados a la administración sistémica de inhibidores específicos para HIF2, que recientemente se han propuesto como tratamiento alternativo no sólo para HP (74, 75), sino para frenar algunos tipos de cáncer (107, 108).

En este trabajo demostramos que, aunque la Cre para deletar *Hif2 α* en el linaje *Wt1* es constitutiva, y por tanto resulta en la eliminación de *Hif2 α* a tiempos muy tempranos cuando se empieza a expresar *Wt1* (E8,5-E9,0), no observamos ninguna alteración basal en embriones a

día E18,5 de gestación (**Figura 31**). Tampoco se aprecian defectos en la etapa adulta en los órganos estudiados, presentando los mutantes *Hif2/Wt1* cKO un correcto desarrollo y homeostasis del corazón (**Figura 32**) y los pulmones (**Figura 10**), y sin alteraciones en su capacidad de supervivencia (**Figura 9, Tabla 3**). Por otro lado, los resultados obtenidos tras la exposición a Hx crónica de estos ratones *Hif2/Wt1* cKO están en consonancia con los trabajos previos en el campo de HP que demuestran que la eliminación de HIF2 en el endotelio de la vasculatura pulmonar previene la remuscularización de las arterias del pulmón y la elevación de la PSVD (**Figura 12, Figura 13 y Figura 14**). Sin embargo, a pesar de la protección frente al desarrollo y progresión de HP, la ausencia de HIF2 en el linaje *Wt1* compromete la correcta adaptación tanto del corazón como de los pulmones ante tensiones bajas de O₂, dando lugar a un remodelado microvascular y disfunción en ambos órganos. En pulmón, observamos tanto por ecografía (**Figura 16**), como por análisis macroscópico (**Figura 18**) y en estudios histológicos (**Figura 19 y Figura 20**), una hemorragia severa, con extravasación de eritrocitos hacia el espacio alveolar, acompañada del engrosamiento de la pared de los alveolos, reduciendo drásticamente su superficie de intercambio (**Figura 19, Figura 20 y Figura 21**). Además, se evidencia un aumento de inflamación, con mayor cantidad y proliferación de macrófagos alveolares (**Figura 22 y Figura 23**). Estos defectos probablemente sean secundarios a la inestabilidad microvascular debida a la alta tasa de proliferación del endotelio (**Figura 24 y Figura 26**) en estos ratones *Hif2/Wt1* cKO tras la exposición a Hx crónica. Además de los problemas pulmonares en su intento de adaptación a Hx, en paralelo en el corazón observamos que los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras exposición a bajas tensiones de O₂ no muestran hemorragias evidentes como en el pulmón, pero sin embargo, presentan cardiomegalia progresiva según se aumentan los tiempos de exposición a Hx, lo cual hemos comprobado tanto por análisis funcionales por ecografía (**Figura 33**), como macroscópicamente (**Figura 34**) y con análisis histológicos (**Figura 35**). Además de este aumento de tamaño del órgano, hemos comprobado el desarrollo de hipertrofia no vinculada al aumento de tamaño de los CMs en ambos ventrículos (**Figura 33A, Figura 33B, Figura 36**), así como disfunción cardíaca, con bajada en la fracción de eyección del VI (**Figura 33D**), posiblemente debido a la dilatación de los capilares (**Figura 39**) que conforman la red microvascular de este órgano. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en pulmón, donde observamos un aumento claro del número de CEs del linaje *Wt1* tras 2 semanas de exposición a Hx (**Figura 26**), la proliferación de CEs cardíacas que intervendrían en la dilatación de los capilares, tiene lugar en células no contribuidas por *Wt1* (**Figura 41 y Figura 42**), es decir, células que genéticamente serían equivalentes a CEs control. Esto sugiere que, aunque las células que proliferan no son células del linaje *Wt1* (porque son Tomato⁻) (**Figura 42**), debe existir una comunicación entre el endotelio derivado de *Wt1* (Tomato⁺) e independiente de *Wt1*

(Tomato⁺) que provoque esa inestabilidad y remodelado vascular al eliminar HIF2 en las CE del linaje *Wt1* en corazón durante Hx crónica. Los mecanismos moleculares dependientes de HIF2 en este compartimento endotelial serán objeto de estudios posteriores en marcha en el laboratorio, pero que por limitaciones técnicas y temporales no han podido abordarse en este trabajo de tesis.

Sorprendentemente, los profundos defectos estructurales observados en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO en el pulmón y el corazón tras 2 y 3 semanas de exposición a Hx al 10% de O₂, son reversibles casi en su totalidad tras un periodo de reoxigenación de tan sólo 1 semana en condiciones basales de O₂ al 21%. Los estudios funcionales revelan una completa mejoría de los pulmones de los ratones deficientes en HIF2 (**Figura 45**), así como la ausencia de líquido libre hemorrágico en el parénquima alveolar, y un grosor de la pared del alveolo normal (**Figura 48**). Por otro lado, la cardiomegalia se restaura y los corazones tanto de 2 como de 3 semanas de exposición a Hx, tras 1 semana de reoxigenación, restauran su peso relativo respecto al peso corporal (**Figura 47**) y sus dimensiones (**Figura 49**), asemejándose a corazones en Nx. Si bien es cierto que el rescate de la cardiomegalia va acompañado de la reducción de la hipertrofia de ambos ventrículos (**Figura 46A**, **Figura 46B**), la función cardiaca no se restaura por completo en los mutantes de *Hif2*, que continúan mostrando valores de fracción de eyección alterados (**Figura 46C**) y dilatación ventricular izquierda (**Figura 46D**). Estos resultados concuerdan con la mejoría parcial de la dilatación de la microvasculatura (**Figura 50A**) y la densidad capilar por área de tejido (**Figura 50B**). En cuanto a esta recuperación sólo parcial de la función cardiaca tras exposición a 1 semana de reoxigenación, no podemos descartar que un tiempo más largo de este tratamiento pudiera revertir por completo estas alteraciones funcionales mostradas por el mutante de *Hif2/Wt1* cKO.

En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de funciones protectoras inhibitorias mediadas por la señalización de HIF2 en la vasculatura cardiopulmonar que operan sólo en condiciones de Hx.

Ya se ha mencionado que el papel de HIF2 en el compartimento endotelial del pulmón y sus defectos asociados al desarrollo y progresión de HP han sido ampliamente estudiados (59-61, 73), y que en cambio se sabe muy poco sobre el papel que desempeña HIF2 en otros tipos celulares. Recientemente, Kim et al., han publicado un trabajo utilizando un nuevo modelo de ratón de sobreexpresión y delección de HIF2 en PCs utilizando NG2-CreERT2 (79). Estos autores observaron que la sobreexpresión de HIF2 en PCs induce la remuscularización arterial y la elevación de la PSVD tras 3 semanas de exposición a la Hx, mientras que su eliminación en esas mismas células no evita ni la remuscularización de las arterias, ni la elevación de la PSVD

durante la Hx crónica (79). Teniendo en cuenta estos resultados, la protección frente a la elevación de la PSVD que muestran los mutantes *Hif2/Wt1* cKO objeto de estudio de esta tesis, en los que un 14% de los PCs pulmonares estarían contribuidos por el linaje *Wt1* (**Tabla 2**), parecería proceder del papel de HIF2 en el endotelio y no en PCs. Estos resultados irían en consonancia con trabajos previos, en los que se describe el papel fundamental de HIF2 en CEs en la progresión de HP (59-61) y ayudan a comprender de manera global la importancia de la señalización por HIF2 en el contexto de progresión de HP. En ese sentido, nuestro modelo de delección de *Hif2 α* en el linaje *Wt1* aporta esa visión sistémica y además, evidencia que, a pesar de la protección frente al remodelado vascular de los mutantes *Hif2/Wt1* cKO tras la exposición a Hx crónica, los pulmones de estos ratones presentan disfunción con daño severo en el parénquima alveolar, especialmente tras 3 semanas de exposición a Hx, con reducción del significativa de espacio alveolar, hemorragias e inflamación, aportando información sobre las consecuencias deletéreas no descritas hasta el momento secundarias a la eliminación de *HIF2 α* . La caracterización de estos defectos pulmonares en el modelo *Hif2/Wt1* cKO es relevante en el contexto de aplicación de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de inhibidores específicos de HIF2 administrados a nivel sistémico que están siendo propuestos como posibles tratamientos para la HP (74).

Por lo tanto, teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, nuestros resultados sugieren que sólo la delección simultánea de *Hif2 α* en CEs, PCs y CMLs, tras periodos prolongados de Hx, conlleva a los defectos vasculares observados en el pulmón y su encharcamiento por hemorragia, que no apreciaban el resto de grupos de investigación al eliminar *Hif2 α* sólo en un tipo celular, ya fueran CEs, PCs o CMLs individualmente.

Curiosamente, aunque muchos trabajos han valorado la importancia de HIF2 durante la adaptación a Hx crónica en el pulmón, apenas hay avances sobre el papel que desempeña HIF2 en el corazón en esas mismas situaciones de bajas tensiones de O_2 . En el contexto de HP, Smith et al., (109) exploraron la posibilidad de que la hipertrofia del VD tras la Hx crónica pudiera deberse, no sólo al aumento de la carga del lado derecho del corazón tras la remodelación arterial pulmonar, sino también a factores independientes de los pulmones que actuaran directamente sobre el corazón y que podrían conducir a la activación de HIF. De hecho, el grupo de Schumacker demostró que tanto la señalización de HIF1 como de HIF2 en CMs está implicada en la aparición de hipertrofia ventricular derecha durante Hx crónica (109). Estos datos están en la misma línea que los descritos en este trabajo de tesis con el mutante *Hif2/Wt1* cKO, donde observamos una hipertrofia progresiva de CMs en respuesta a la exposición a Hx crónica (**Figura 36**), no sólo del VD sino también del VI, sugiriendo efectivamente papeles independientes de los factores HIF en el corazón y el pulmón. Además, como hemos

mencionado anteriormente, los mutantes *Hif2/Wt1* cKO no sólo presentaban hipertrofia de ambos ventrículos, sino que también tenían disfunción de VI y VD y dilatación sobre todo del VI (**Figura 33**). Asimismo, teniendo en cuenta que *Wt1* contribuye a los capilares tanto del VD como del VI (**Figura 28** y **Figura 30**), y que no observamos diferencias significativas entre el área de los CMs de ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO y los CMs de ratones control en Hx (**Figura 36**), planteamos la hipótesis de que el aumento del grosor de las paredes ventriculares (VD y VI) y la cardiomegalia observados en ausencia de HIF2 podrían deberse a la remodelación microvascular y dilatación capilar observadas en estos mutantes (**Figura 39**). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la señalización funcional de HIF2 en el compartimento microvascular del corazón para garantizar una adaptación funcional adecuada a Hx crónica. En este sentido, nuestros datos contribuyen a aumentar la comprensión que se tiene acerca de la respuesta cardíaca a la Hx independientemente de la remodelación pulmonar.

En base a los hallazgos detallados anteriormente relativos a los cambios fenotípicos y funcionales del corazón y los pulmones en Hx crónica, proponemos el siguiente modelo de trabajo:

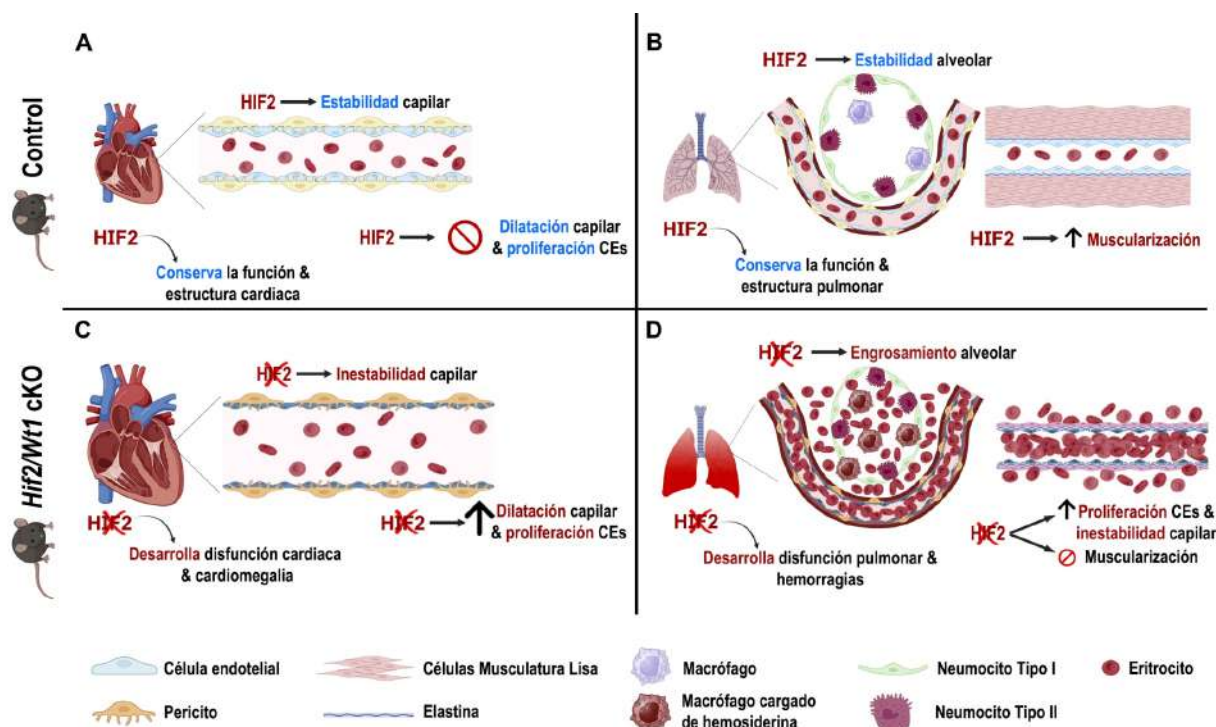


Figura 69. Modelo sobre el papel de HIF2 en el linaje *Wt1* en el sistema cardiorrespiratorio.

Modelo propuesto de defectos cardiopulmonares en ratones control y *Hif2/Wt1* cKO tras 3 semanas de hipoxia crónica. Los ratones control tras 3 semanas de exposición a hipoxia están protegidos frente a cardiomegalia, dilatación de capilares y aumento de la proliferación de CEs (**A**), mientras que los ratones *Hif2/Wt1* cKO desarrollan cardiomegalia asociada a dilatación de capilares y proliferación de CEs (**C**). Los pulmones de los ratones control muestran un parénquima alveolar normal, sin proliferación microvascular, pero, sin embargo, muestran muscularización de las arterias distales del pulmón mediada por HIF2 y un aumento de la PSVD (**B**). Por el contrario, los ratones *Hif2/Wt1* cKO

están protegidos frente a la muscularización arterial, pero presentan varios defectos pulmonares estructurales incluyendo: congestión de eritrocitos y macrófagos, hemorragias y engrosamiento de la pared alveolar, probablemente asociados a la remodelación y proliferación capilar alveolar (**D**). En conjunto, estos resultados sugieren que HIF2 desempeña una función inhibitoria sobre las CE, PCs y CMLs cardiacas y pulmonares que previene la remodelación microvascular excesiva y la disfunción del órgano en respuesta a la hipoxia crónica.

2. HIF2 ES ESENCIAL PARA DESENCADENAR LA RESPUESTA CELULAR Y SISTÉMICA A HIPOXIA

Para que puedan darse las respuestas sistémicas a Hx, ya sea aguda (corta en el tiempo) o crónica (prolongada en el tiempo), y que el organismo experimente las modificaciones necesarias para su adaptación a las nuevas tensiones de O₂, es esencial que el CC actúe adecuadamente. Este órgano es el encargado de detectar las bajadas en las PO₂ arteriales y desencadenar, mediante la liberación de vesículas que contienen dopamina, ATP, acetilcolina y otros neurotransmisores y neuropéptidos (24), la respuesta del sistema nervioso simpático, que iniciará los procesos de la RVH (23, 27, 28). Como se detalla en la introducción, el CC está formado principalmente por dos tipos de células, las células tipo I (TH⁺), encargadas de sensor los niveles de O₂ de la sangre, y las células tipo II (GFAP⁺), que dan sustento a las de tipo I. Se ha descrito que la eliminación de HIF2α de manera constitutiva con la Cre específica para células catecolaminérgicas (TH⁺), genera un problema en el correcto desarrollo de este órgano (28). En este trabajo de tesis hemos ampliado el conocimiento que se tiene acerca de la naturaleza del CC, demostrando que una fracción de células TH⁺ del CC pertenecen al linaje Wt1 (células TH⁺/Tomato⁺), al contrario que las células GFAP⁺, que no mostraron colocalización con la señal de Tomato endógeno del ratón reportero Rosa26-tdTomato/Wt1-Cre (**Figura 53**). En nuestro caso, aunque la eliminación de HIF2 en células del linaje Wt1 también se hace de manera constitutiva, tal y como se aprecia en la **Figura 52**, Wt1 no empieza a expresarse en las células TH⁺ hasta día P16 neonatal, por lo que la organogénesis del CC no se ve afectada en el modelo *Hif2/Wt1* cKO objeto de estudio de esta tesis. En este sentido, al estar eliminado Hif2α a partir de P16 en las células TH⁺, nuestro modelo es equivalente y coincide con las observaciones descritas en el trabajo de Fielding et al. (29), en el que utilizan una línea TH-Cre inducible por tamoxifeno. En ambos trabajos, Fielding et al. (29) y el nuestro, se observa que tras la exposición a Hx durante 2 – 4 semanas al 10% de O₂, los ratones deficientes en Hif2α en células TH⁺ el volumen del CC no aumenta en comparación con los controles (**Figura 55**) y además, la densidad de células TH⁺ de los ratones mutantes es menor que los controles (**Figura 56**). Sin embargo, estos cambios en el tamaño del CC y densidad de las células TH⁺, no se aprecian en el mismo modelo en el que se elimina Hif2α en células TH⁺ con la TH-Cre inducible pero sólo se exponen los ratones al 10% de O₂ durante 1 semana en vez de 2 a 4 semanas (27). En este

caso, los autores sólo observaron diferencias significativas en la RVH cuando sometieron a los ratones a un tratamiento de Hx aguda al 10% O₂ en combinación con 3% de CO₂, no observando cambios sólo con la bajada de los niveles de O₂ al 10%.

Estos datos en conjunto sugieren que la eliminación de Hif2 α en células TH⁺ desencadena fallos en la adaptación a Hx crónica a partir de 2 semanas al 10% de O₂ sólo una vez que se ha formado el CC, no viéndose afectada la respuesta sistémica ante situaciones de Hx aguda.

Por otro lado, dado que la respuesta a la bajada en las tensiones de O₂ es llevada a cabo por las células tipo I del CC, cabría esperar que un problema en el órgano por la disfunción de estas células en la capacidad de sensar el O₂, conduzca a la no adaptación a Hx. Cuando el organismo no se adapta correctamente a los cambios ambientales en los niveles de O₂ es cuando se desencadenan las patologías asociadas a Hx como la progresión de HP. En este sentido, el trabajo de Macías et al., donde eliminan Hif2 α en células TH⁺ de manera constitutiva (28), no sólo describe problemas en la formación del CC durante la embriogénesis, sino que además, muestra que tras la exposición a 3 semanas de Hx de ratones deficientes en HIF2 α en células TH⁺, sólo el 40% sobrevive al tratamiento, y además, los que sobreviven, desarrollan cardiomegalia, hipertrofia del VD, elevación en la PSVD y esplenomegalia debida a la hematopoyesis extramedular, sumado a una elevación en los niveles de HCT y HBG. Estos resultados concuerdan con los descritos en este trabajo de tesis, donde también observamos cardiomegalia (**Figura 34**), elevación de la PSVD (**Figura 14**) y esplenomegalia (**Figura 60**), junto con la elevación del HCT y la HBG (**Figura 67**). Sin embargo, los ratones mutantes para HIF2 en las células TH⁺ del trabajo de Macías et al. (28), sí desarrollan HP, con remodelado de la vasculatura pulmonar, por lo que los defectos cardiacos observados por el grupo del Dr. López-Barneo podrían directamente asociarse al remodelado vascular que acontece durante la progresión de esta patología. Por el contrario, los ratones de estudio de esta tesis, no desarrollan HP ya que la ausencia de HIF2 en el linaje Wt1 previene de dicho remodelado pulmonar y previene la elevación de la PSVD como se detalla en el bloque de resultados. Además, nuestros resultados sugieren que los defectos cardiacos observados en los ratones *Hif2a/Wt1* cKO son intrínsecos al corazón e independientes al fenotipo patológico observado en el pulmón. En otro trabajo anterior, el Macías et al. (110), generaron un modelo de ratón de delección de VHL con la línea TH-Cre constitutiva. En este caso, observaron problemas en la formación del CC, apreciando que las células TH⁺ no se organizaban en glomérulos y se entremezclaban con las células TH⁺ del ganglio cervical superior, a partir de cual se segregan los progenitores simpáticos que darán lugar al parénquima del CC. Además, aunque estos ratones contenían un buen número de células madre, presentaban problemas en la formación

y diferenciación de nuevas células glómicas, impidiendo el aumento de tamaño característico de este órgano tras exposición a Hx, y por tanto, mostraban un defecto en la aclimatación a las bajadas de O₂. Por otro lado, estos ratones deficientes en VHL en células TH⁺ presentaron una tasa de supervivencia gravemente comprometida tras la exposición a 7 días de Hx al 10% O₂, y los ratones que sobrevivieron presentaron cardiomegalia con dilatación del VD, esplenomegalia con cambios histológicos compatibles con hematopoyesis extramedular y alteraciones en los pulmones asociadas a HP, con pequeños edemas y microhemorragias en el parénquima. Sin embargo, en estos trabajos no se detallan en profundidad esos cambios observados en los órganos más allá del CC.

En resumen, nuestro modelo mutante *Hif2/Wt1* cKO abre la posibilidad de estudiar los mecanismos implicados en la respuesta celular a Hx por parte de células TH⁺ del CC en animales adultos sin la necesidad de utilizar modelos constitutivos basados en el uso de la línea TH-Cre, que presentan graves problemas de supervivencia además de malformaciones durante la organogénesis del CC y desarrollan HP. Por otro lado, los resultados descritos en este trabajo de tesis, contribuyen a ampliar nuestro conocimiento sobre el CC y sugieren que existe una heterogeneidad dentro de las células glómicas TH⁺, que contendrían una población derivada del linaje *Wt1* que en etapas postnatales interviene de manera crucial en la respuesta a hipoxia crónica, y en la que HIF2 es fundamental. Por ello, creemos que este modelo ofrece nuevas herramientas para estudios futuros sobre el CC y su papel en la RVH en animales adultos.

3. RELEVANCIA DE LA SEÑALIZACIÓN DE HIF2 PARA UNA CORRECTA FUNCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS DE LA PULPA ROJA TRAS LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA

La exposición a Hx es un estrés ambiental que implica una respuesta adaptativa rápida. Como ya se ha indicado anteriormente, el CC es el órgano encargado de iniciar esa respuesta (28). Una de las reacciones sistémicas a la bajada en la concentración de O₂ es el aumento de los niveles de eritropoyetina (EPO) en el riñón (30, 111, 112), que a su vez estimula a las células madre de la médula ósea para que aumenten la producción de eritrocitos (113). Sin embargo, si la demanda de glóbulos rojos persiste, puede activarse una mayor producción de eritrocitos en otros tejidos, lo que se denomina hematopoyesis extramedular, que principalmente tiene lugar en el hígado y el bazo (106). El bazo además, es un reservorio de eritrocitos y alberga entre el 15 y el 25% del total del volumen de glóbulos rojos del cuerpo (36). La PR del bazo contiene células madre hematopoyéticas que ante la demanda de eritrocitos causados por un agente estresante, como puede ser la bajada en los niveles de oxígeno, desencadenan el proceso de eritropoyesis, dando lugar a la esplenomegalia característica inducida por Hx (106).

En los modelos anteriores descritos por Macías et al. y mencionados en el apartado 2 de esta sección de discusión, tanto con el ratón VHL-TH KO (110), como con el HIF2-TH KO (28) los autores describen un fenotipo de esplenomegalia en comparación con sus respectivos controles, probablemente debido a un aumento de hematopoyesis extramedular de la PR, aunque no se comenta en detalle esta observación en sus trabajos. En este trabajo de tesis, exploramos minuciosamente el bazo y sus estructuras en ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO y controles tras la exposición a Hx, observando que tras largos periodos de Hx, los ratones deficientes en HIF2 dentro del linaje *Wt1* desarrollan una esplenomegalia descontrolada en comparación con los controles en Hx (**Figura 60**). Esta esplenomegalia es consecuencia de la expansión de la PR claramente visible por tinción de HE como se aprecia en la **Figura 61**, como mediante estudios de IF tal y como se muestra en la **Figura 63**. Posiblemente la hematopoyesis extramedular que se da en el bazo como respuesta sistémica a Hx (34) justifique esa expansión de la PR y su aumento de tamaño, y además puede estar ligada a la elevación del HCT y la HBG (**Figura 67**) para compensar la Hx y poder abastecer con más O₂ a las células y tejidos que lo precisan. Además, como podemos observar en la **Figura 64**, se distinguen una gran cantidad de células en división dentro de la PR tanto en el bazo de los ratones control, como los mutantes *Hif2/Wt1* cKO. A pesar de ello, los bazos de los ratones control mantienen un tamaño similar a los bazos en Nx tras los periodos de Hx (**Figura 60**). Esto podría ser debido a que los bazos de los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO, además de la expansión de células hematopoyéticas residentes en la PR, también presentan proliferación del endotelio (**Figura 64**). Con los análisis por FACS, apreciamos que las poblaciones CD45⁻ están muy aumentadas en los mutantes de HIF2 en comparación con los controles en Hx (**Figura 65**). Así mismo, mientras que en Hx los bazos de los ratones control tienen una alta tasa de reciclaje de hierro por parte de los MPR, como ponen de manifiesto los acúmulos de hemosiderina a lo largo de toda la PR (**Figura 61** y **Figura 62**), los ratones deficientes en HIF2 en el linaje *Wt1*, no presentan estos depósitos, lo que podría indicar que los MPR no están siendo capaces de reciclar el hierro de los eritrocitos eficazmente. Esto podría ser debido a que en el bazo, como se ha descrito previamente, *Wt1* contribuye de manera específica a una población de fibroblastos que componen el nicho celular de la PR sobre el que se sustentan los MPR (38). Estos fibroblastos *Wt1*⁺, son los encargados de liberar al medio la citoquina CSF1, necesaria para el correcto desarrollo, función y mantenimiento de los MPR. En nuestro modelo de delección de *Hif2α* en las células de linaje *Wt1* del bazo, estaríamos afectando a funciones esenciales mediadas por HIF2 en el nicho de los MPR formado por FBs *Wt1*⁺ y posiblemente estemos inhibiendo esa comunicación entre FBs y MPR, lo que se traduciría en una función deficiente de los MPR para reciclar hierro de los eritrocitos senescentes. Por ello, proponemos la hipótesis de que los niveles de CSF1 procedentes de los fibroblastos *Wt1*⁺

estarían disminuidos en el mutante *Hif2/Wt1* cKO, en base a estudios previos que describen la importancia de HIF2 en la producción de CSF1 e IL6 durante la activación alternativa de macrófagos asociados a tumor (114).

En resumen, nuestros resultados, si bien todavía preliminares en relación a la importancia de la señalización de HIF2 mediada por el linaje *Wt1* en el bazo en respuesta a Hx, apuntan a que HIF2 α ejerce un papel fundamental sobre los FBs de la PR para que puedan regular los MPR, favoreciendo su maduración y función de reciclaje de hierro de los eritrocitos senescentes en respuesta a Hx sostenida, posiblemente controlando la liberación de CSF1.

4. IMPLICACIONES DE LA INHIBICIÓN DE HIF2 SISTÉMICO

Como ya hemos mencionado, estudios previos han demostrado el papel clave de HIF2 sobre la progresión y desarrollo de HP (59-61), y que su bloqueo mediante inhibidores de pequeño tamaño como el belzutifan (PT2977) tiene un efecto beneficioso para prevenir la progresión de HP *in vivo* (74, 75). Sin embargo, las consecuencias de la inhibición sistémica prolongada de la señalización de HIF2 en otros órganos esenciales para la homeostasis fisiológica, como el corazón, el CC o el bazo, continúan siendo desconocidas al no haberse analizado en estos estudios de manera exhaustiva. En este trabajo de tesis doctoral caracterizamos las anomalías estructurales y funcionales en corazón, pulmón, CC y bazo tras la delección de *Hif2 α* en el linaje vascular/intersticial *Wt1* durante la exposición a Hx crónica. Nuestros resultados describen características fenotípicas novedosas en todos los órganos analizados ligadas a la delección de *Hif2 α* , y descubren funciones protectoras hasta ahora desconocidas de la señalización de HIF2 en la microvasculatura del corazón y el pulmón, sugiriendo que HIF2 es esencial para mantener redes microvasculares estables en ambos órganos durante la exposición sostenida a bajas tensiones de O₂. Asimismo, describimos una función protectora fundamental de HIF2 sobre el correcto funcionamiento del nicho de fibroblastos *Wt1*⁺ en el bazo y confirmamos su importancia para un correcto funcionamiento de las células sensoras de O₂ del CC y su respuesta de crecimiento en Hx. Estas observaciones contribuyen a ampliar nuestros conocimientos sobre el papel de HIF2, tanto en el sistema cardiovascular como en órganos implicados en la respuesta a Hx (CC y bazo), y podrían ser relevantes para evaluar posibles efectos a largo plazo en el contexto de nuevas terapias basadas en la inhibición específica de HIF2 como las propuestas para el tratamiento de carcinoma renal de célula clara o la HP, especialmente en pacientes con afecciones pulmonares que podrían sufrir Hx crónica.

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

CONCLUSIONES

- 1.** El linaje Wt1 contribuye a distintos tipos celulares de órganos importantes en la respuesta a hipoxia como el corazón, los pulmones, el cuerpo carotídeo y el bazo. En corazón y pulmón contribuye parcialmente a células endoteliales, células de músculo liso, pericitos y fibroblastos, así como a parches de cardiomiocitos. En el cuerpo carotídeo a células glómicas TH⁺ a partir de día postnatal 16 (P16), y en el bazo, a fibroblastos de soporte de la pulpa roja.
- 2.** La eliminación de HIF2 α en células del linaje Wt1 no provoca defectos durante la embriogénesis, ni repercute en la homeostasis o supervivencia de ratones adultos. No obstante, en condiciones de hipoxia crónica, la pérdida de función de HIF2 α en el linaje Wt1, independientemente del sexo, provoca alteraciones cardiopulmonares y de órganos sensibles a la concentración de oxígeno como el cuerpo carotídeo y el bazo, así como un aumento en el hematocrito y la hemoglobina, y una disminución muy acusada de las plaquetas.
- 3.** La eliminación de HIF2 α en el linaje Wt1 previene el remodelado vascular de arterias pulmonares, así como la elevación de la presión sistólica del ventrículo derecho característicos de la progresión de HP tras la exposición a hipoxia crónica. Sin embargo, la ausencia de HIF2 α resulta en alteraciones del parénquima pulmonar como inflamación y extravasación de eritrocitos, lo que provoca la aparición de hemorragias, reducción del espacio alveolar, congestión y disfunción pulmonar.
- 4.** El endotelio pulmonar contribuido por Wt1 deficiente en HIF2 α presenta una elevada tasa de proliferación tras exposición a hipoxia crónica, lo cual podría asociarse a mayor inestabilidad vascular y explicar el alto índice de hemorragias en los ratones mutantes *Hif2/Wt1* cKO en respuesta a bajos niveles de oxígeno.
- 5.** La delección de HIF2 α en el linaje Wt1 provoca un aumento de la pared posterior de ambos ventrículos, especialmente del izquierdo, disminución de la fracción de eyección y dilatación de la cámara ventricular izquierda en condiciones de hipoxia sostenida. Estas alteraciones resultan en disfunción cardíaca sistólica y apuntan a la existencia de cambios fisiopatológicos mediados por HIF2 α en hipoxia intrínsecos al corazón e independientes del pulmón.

6. Los ratones *Hif2/Wt1* cKO presentan cardiomegalia no asociada a hipertrofia de cardiomiocitos ni a fibrosis tras exposición a hipoxia crónica, si bien este aumento de peso y volumen del corazón podría explicarse por las alteraciones vasculares asociadas a la dilatación de los capilares cardiacos que sufren estos ratones en hipoxia.
7. Una semana de reoxigenación tras la exposición a hipoxia crónica es suficiente para revertir la disfunción pulmonar asociada a la pérdida de HIF2 α , rescatándose totalmente el remodelado del parénquima alveolar y las hemorragias de los ratones *Hif2/Wt1* cKO. Asimismo, a nivel cardiaco la reoxigenación previene la cardiomegalia y la hipertrofia ventricular, aunque no se restauran los parámetros de fracción de eyección, volumen del ventrículo izquierdo ni la densidad y volumen de los capilares.
8. El cuerpo carotídeo de ratones deficientes en HIF2 α en el linaje *Wt1* no responde correctamente a la bajada en la presión arterial de O₂ (PO₂) ya que no aumenta su tamaño en hipoxia, presentando una menor densidad de células tirosina hidroxilasa positivas (TH⁺) sensoras de O₂, pudiendo comprometer su adaptación ante una situación de hipoxia crónica.
9. La eliminación de HIF2 α en el linaje *Wt1* durante largos periodos de hipoxia provoca una notable esplenomegalia -aumento del tamaño del bazo- asociada con la expansión de la PR junto con hematopoyesis extramedular, así como una mayor proliferación del endotelio esplénico.
10. Los macrófagos de la pulpa roja (MPR) de ratones *Hif2/Wt1* cKO no reciclan correctamente el hierro de los eritrocitos senescentes en el bazo tras la exposición a hipoxia crónica. Aunque *Wt1* no contribuye de manera directa a estos macrófagos, debido a que *Wt1* sí contribuye a los fibroblastos que actúan como nicho de los MPRs, la ausencia de HIF2 α en esta población impediría de manera indirecta la correcta función de los MPRs en respuesta a la bajada de los niveles de O₂.

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text.

REFERENCIAS

1. Patterson AJ, Zhang L. Hypoxia and fetal heart development. *Curr Mol Med*. 2010;10(7):653-66.
2. Compennolle V, Brusselmans K, Franco D, Moorman A, Dewerchin M, Collen D, et al. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cardiovasc Res*. 2003;60(3):569-79.
3. Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*. 1999;209(2):254-67.
4. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev*. 1998;12(21):3320-4.
5. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1^{-/-} mice. *Nat Genet*. 2003;35(4):331-40.
6. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15):8386-91.
7. Dunwoodie SL. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell*. 2009;17(6):755-73.
8. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(4):285-96.
9. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-32.
10. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):1-15.
11. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008;30(4):393-402.
12. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):294-309.
13. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006;441(7092):437-43.
14. Calzada MJ, del Peso L. Hypoxia-inducible factors and cancer. *Clin Transl Oncol*. 2007;9(5):278-89.
15. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(24):9361-74.
16. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*. 2009;284(25):16767-75.
17. Choueiri TK, Kaelin WG, Jr. Author Correction: Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma. *Nat Med*. 2024.
18. Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature*. 2016;539(7627):112-7.
19. Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(14):6496-500.
20. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, et al. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2396-409.
21. Lopez-Barneo J, Macias D, Platero-Luengo A, Ortega-Saenz P, Pardal R. Carotid body oxygen sensing and adaptation to hypoxia. *Pflugers Arch*. 2016;468(1):59-70.
22. Lopez-Barneo J. Oxygen sensing and stem cell activation in the hypoxic carotid body. *Cell Tissue Res*. 2018;372(2):417-25.
23. Bishop T, Talbot NP, Turner PJ, Nicholls LG, Pascual A, Hodson EJ, et al. Carotid body hyperplasia and enhanced ventilatory responses to hypoxia in mice with heterozygous deficiency of PHD2. *J Physiol*. 2013;591(14):3565-77.
24. Ortega-Saenz P, Moreno-Dominguez A, Gao L, Lopez-Barneo J. Molecular Mechanisms of Acute Oxygen Sensing by Arterial Chemoreceptor Cells. Role of Hif2alpha. *Front Physiol*. 2020;11:614893.
25. Platero-Luengo A, Gonzalez-Granero S, Duran R, Diaz-Castro B, Piruat JI, Garcia-Verdugo JM, et al. An O₂-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. *Cell*. 2014;156(1-2):291-303.
26. Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, Lopez-Barneo J. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*. 2007;131(2):364-77.

27. Hodson EJ, Nicholls LG, Turner PJ, Llyr R, Fielding JW, Douglas G, et al. Regulation of ventilatory sensitivity and carotid body proliferation in hypoxia by the PHD2/HIF-2 pathway. *J Physiol.* 2016;594(5):1179-95.
28. Macias D, Cowburn AS, Torres-Torrelo H, Ortega-Saenz P, Lopez-Barneo J, Johnson R. Correction: HIF-2alpha is essential for carotid body development and function. *Elife.* 2018;7.
29. Fielding JW, Hodson EJ, Cheng X, Ferguson DJP, Eckardt L, Adam J, et al. PHD2 inactivation in Type I cells drives HIF-2alpha-dependent multilineage hyperplasia and the formation of paraganglioma-like carotid bodies. *J Physiol.* 2018;596(18):4393-412.
30. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013;27(1):41-53.
31. Watts D, Gaete D, Rodriguez D, Hoogewijs D, Rauner M, Sormendi S, et al. Hypoxia Pathway Proteins are Master Regulators of Erythropoiesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
32. Qiang Y, Sissoko A, Liu ZL, Dong T, Zheng F, Kong F, et al. Microfluidic study of retention and elimination of abnormal red blood cells by human spleen with implications for sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;120(6):e2217607120.
33. Yang WP, Li MQ, Ding J, Li JY, Wu G, Liu B, et al. High-altitude hypoxia exposure inhibits erythrophagocytosis by inducing macrophage ferroptosis in the spleen. *Elife.* 2024;12.
34. Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, et al. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature.* 2015;527(7579):466-71.
35. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):455-65.
36. Wang H, Liu D, Song P, Jiang F, Chi X, Zhang T. Exposure to hypoxia causes stress erythropoiesis and downregulates immune response genes in spleen of mice. *BMC Genomics.* 2021;22(1):413.
37. Kurotaki D, Uede T, Tamura T. Functions and development of red pulp macrophages. *Microbiol Immunol.* 2015;59(2):55-62.
38. Bellomo A, Mondor I, Spinelli L, Lagueyrie M, Stewart BJ, Brouilly N, et al. Reticular Fibroblasts Expressing the Transcription Factor WT1 Define a Stromal Niche that Maintains and Replenishes Splenic Red Pulp Macrophages. *Immunity.* 2020;53(1):127-42 e7.
39. Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2013;3(10):a013847.
40. Martin-Puig S, Wang Z, Chien KR. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):320-31.
41. Lee YM, Jeong CH, Koo SY, Son MJ, Song HS, Bae SK, et al. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn.* 2001;220(2):175-86.
42. Krishnan J, Ahuja P, Bodenmann S, Knapik D, Perriard E, Krek W, et al. Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function. *Circ Res.* 2008;103(10):1139-46.
43. Guimaraes-Camboa N, Stowe J, Aneas I, Sakabe N, Cattaneo P, Henderson L, et al. HIF1alpha Represses Cell Stress Pathways to Allow Proliferation of Hypoxic Fetal Cardiomyocytes. *Developmental cell.* 2015;33(5):507-21.
44. Menendez-Montes I, Escobar B, Gomez MJ, Albendea-Gomez T, Palacios B, Bonzon-Kulichenko E, et al. Activation of amino acid metabolic program in cardiac HIF1-alpha-deficient mice. *iScience.* 2021;24(2):102124.
45. Menendez-Montes I, Escobar B, Palacios B, Gomez MJ, Izquierdo-Garcia JL, Flores L, et al. Myocardial VHL-HIF Signaling Controls an Embryonic Metabolic Switch Essential for Cardiac Maturation. *Dev Cell.* 2016;39(6):724-39.
46. Ream M, Ray AM, Chandra R, Chikaraishi DM. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(2):R583-95.
47. Compornolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, et al. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med.* 2002;8(7):702-10.
48. Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(2):152-6.
49. Groenman F, Rutter M, Caniggia I, Tibboel D, Post M. Hypoxia-inducible factors in the first trimester human lung. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(4):355-63.
50. Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest.* 2022;132(11).

51. Braun RD, Lanzen JL, Snyder SA, Dewhirst MW. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(6):H2533-44.
52. Knutson AK, Williams AL, Boisvert WA, Shohet RV. HIF in the heart: development, metabolism, ischemia, and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2021;131(17).
53. Gale DP, Harten SK, Reid CD, Tuddenham EG, Maxwell PH. Autosomal dominant erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 alpha mutation. *Blood.* 2008;112(3):919-21.
54. Gordeuk VR, Miasnikova GY, Sergueeva AI, Lorenzo FR, Zhang X, Song J, et al. Thrombotic risk in congenital erythrocytosis due to up-regulated hypoxia sensing is not associated with elevated hematocrit. *Haematologica.* 2020;105(3):e87-e90.
55. Salud OMD. Enfermedades Cardiovasculares 2021 [Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
56. Pirri D, Fragiadaki M, Evans PC. Diabetic atherosclerosis: is there a role for the hypoxia-inducible factors? *Biosci Rep.* 2020;40(8).
57. Association PH. About Pulmonary Hypertension. The Five Groups [Available from: <https://phassociation.org/types-pulmonary-hypertension-groups/>].
58. Sheikh AQ, Saddouk FZ, Ntokou A, Mazurek R, Greif DM. Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Regulation of SMC Progenitors in Pulmonary Hypertension. *Cell Rep.* 2018;23(4):1152-65.
59. Cowburn AS, Crosby A, Macias D, Branco C, Colaco RD, Southwood M, et al. HIF2alpha-arginase axis is essential for the development of pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(31):8801-6.
60. Kapitsinou PP, Rajendran G, Astleford L, Michael M, Schonfeld MP, Fields T, et al. The Endothelial Prolyl-4-Hydroxylase Domain 2/Hypoxia-Inducible Factor 2 Axis Regulates Pulmonary Artery Pressure in Mice. *Mol Cell Biol.* 2016;36(10):1584-94.
61. Dai Z, Li M, Wharton J, Zhu MM, Zhao YY. Prolyl-4 Hydroxylase 2 (PHD2) Deficiency in Endothelial Cells and Hematopoietic Cells Induces Obliterative Vascular Remodeling and Severe Pulmonary Arterial Hypertension in Mice and Humans Through Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Circulation.* 2016;133(24):2447-58.
62. Olivier Boucherat AB, Sandra Breuils-Bonnet, Steeve Provencher, Sébastien Bonnet. Role of CHK1 in Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal.* 2018;52.
63. Walker AM, Langleben D, Korelitz JJ, Rich S, Rubin LJ, Strom BL, et al. Temporal trends and drug exposures in pulmonary hypertension: an American experience. *Am Heart J.* 2006;152(3):521-6.
64. Mair KM, Johansen AK, Wright AF, Wallace E, MacLean MR. Pulmonary arterial hypertension: basis of sex differences in incidence and treatment response. *Br J Pharmacol.* 2014;171(3):567-79.
65. Voelkel NF, Tuder RM, Bridges J, Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(6):664-75.
66. Rabinovitch M, Gamble WJ, Miettinen OS, Reid L. Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery. *Am J Physiol.* 1981;240(1):H62-72.
67. White K, Johansen AK, Nilsen M, Ciucan L, Wallace E, Paton L, et al. Activity of the estrogen-metabolizing enzyme cytochrome P450 1B1 influences the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2012;126(9):1087-98.
68. Lahm T, Albrecht M, Fisher AJ, Selej M, Patel NG, Brown JA, et al. 17beta-Estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension via estrogen receptor-mediated effects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(9):965-80.
69. Nadadur RD, Umar S, Wong G, Eghbali M, Iorga A, Matori H, et al. Reverse right ventricular structural and extracellular matrix remodeling by estrogen in severe pulmonary hypertension. *J Appl Physiol (1985).* 2012;113(1):149-58.
70. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297(6):L1013-32.
71. Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA, Berger RM. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;305(1):L1-14.
72. Shimoda LA, Manalo DJ, Sham JS, Semenza GL, Sylvester JT. Partial HIF-1alpha deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(1):L202-8.

73. Brusselmans K, Compennolle V, Tjwa M, Wiesener MS, Maxwell PH, Collen D, et al. Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest*. 2003;111(10):1519-27.
74. Macias D, Moore S, Crosby A, Southwood M, Du X, Tan H, et al. Targeting HIF2alpha-ARNT heterodimerisation as a novel therapeutic strategy for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2021;57(3).
75. Hu CJ, Poth JM, Zhang H, Flockton A, Laux A, Kumar S, et al. Suppression of HIF2 signalling attenuates the initiation of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2019;54(6).
76. Ball MK, Waypa GB, Mungai PT, Nielsen JM, Czech L, Dudley VJ, et al. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1alpha. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(3):314-24.
77. Sheikh AQ, Misra A, Rosas IO, Adams RH, Greif DM. Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*. 2015;7(308):308ra159.
78. Tang H, Babicheva A, McDermott KM, Gu Y, Ayon RJ, Song S, et al. Endothelial HIF-2alpha contributes to severe pulmonary hypertension due to endothelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018;314(2):L256-L75.
79. Kim H, Liu Y, Kim J, Kim Y, Klouda T, Fisch S, et al. Pericytes contribute to pulmonary vascular remodeling via HIF2alpha signaling. *EMBO Rep*. 2024;25(2):616-45.
80. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. 2005;7(4):452-64.
81. Alarcon-Martinez L, Yemisci M, Dalkara T. Pericyte morphology and function. *Histol Histopathol*. 2021;36(6):633-43.
82. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008;454(7200):109-13.
83. del Monte G, Casanova JC, Guadix JA, MacGrogan D, Burch JB, Perez-Pomares JM, et al. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res*. 2011;108(7):824-36.
84. Porras D, Brown CB. Temporal-spatial ablation of neural crest in the mouse results in cardiovascular defects. *Dev Dyn*. 2008;237(1):153-62.
85. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development*. 1999;126(9):1845-57.
86. Cano E, Carmona R, Munoz-Chapuli R. Wt1-expressing progenitors contribute to multiple tissues in the developing lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305(4):L322-32.
87. Munoz-Chapuli R, Macias D, Gonzalez-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Perez-Pomares JM. [The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development]. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55(10):1070-82.
88. Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet*. 2010;42(1):89-93.
89. Wagner N, Ninkov M, Vukolic A, Cubukcuoglu Deniz G, Rassoulzadegan M, Michiels JF, et al. Implications of the Wilms' Tumor Suppressor Wt1 in Cardiomyocyte Differentiation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
90. Diaz Del Moral S, Barrena S, Hernandez-Torres F, Aranega A, Villaescusa JM, Gomez Doblaz JJ, et al. Deletion of the Wilms' Tumor Suppressor Gene in the Cardiac Troponin-T Lineage Reveals Novel Functions of WT1 in Heart Development. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:683861.
91. Wilm B, Munoz-Chapuli R. The Role of WT1 in Embryonic Development and Normal Organ Homeostasis. *Methods Mol Biol*. 2016;1467:23-39.
92. Duim SN, Goumans MJ, Kruijthof BPT. WT1 in Cardiac Development and Disease. In: van den Heuvel-Eibrink MM, editor. *Wilms Tumor*. Brisbane (AU)2016.
93. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2301-6.
94. Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development*. 2008;135(1):145-57.
95. Villalba-Orero M, Lopez-Olaneta MM, Gonzalez-Lopez E, Padron-Barthe L, Gomez-Salinerio JM, Garcia-Prieto J, et al. Lung ultrasound as a translational approach for non-invasive assessment of heart failure with reduced or preserved ejection fraction in mice. *Cardiovasc Res*. 2017;113(10):1113-23.

96. IHC World Internet [cited 2024. Available from: <https://ihcworld.com/category/protocols/special-stain/>.
97. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature*. 2020;587(7835):619-25.
98. Skelly DA, Squiers GT, McLellan MA, Bolisetty MT, Robson P, Rosenthal NA, et al. Single-Cell Transcriptional Profiling Reveals Cellular Diversity and Intercommunication in the Mouse Heart. *Cell Rep*. 2018;22(3):600-10.
99. Stellato M, Czepiel M, Distler O, Blyszczuk P, Kania G. Identification and Isolation of Cardiac Fibroblasts From the Adult Mouse Heart Using Two-Color Flow Cytometry. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:105.
100. Ugorski M, Dziegiel P, Suchanski J. Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am J Cancer Res*. 2016;6(2):370-86.
101. Sorokin SP, Hoyt RF, Jr. Macrophage development: I. Rationale for using Griffonia simplicifolia isolectin B4 as a marker for the line. *Anat Rec*. 1992;232(4):520-6.
102. Horie M, Castaldi A, Sunohara M, Wang H, Ji Y, Liu Y, et al. Integrated Single-Cell RNA-Sequencing Analysis of Aquaporin 5-Expressing Mouse Lung Epithelial Cells Identifies GPRC5A as a Novel Validated Type I Cell Surface Marker. *Cells*. 2020;9(11).
103. Lin C, Song H, Huang C, Yao E, Gacayan R, Xu SM, et al. Alveolar type II cells possess the capability of initiating lung tumor development. *PLoS One*. 2012;7(12):e53817.
104. Vogler M, Zieseniss A, Hesse AR, Levent E, Tiburcy M, Heinze E, et al. Pre- and post-conditional inhibition of prolyl-4-hydroxylase domain enzymes protects the heart from an ischemic insult. *Pflugers Arch*. 2015;467(10):2141-9.
105. Munoz-Chapuli R, Gonzalez-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Macias D, Perez-Pomares JM. Cellular precursors of the coronary arteries. *Tex Heart Inst J*. 2002;29(4):243-9.
106. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(9):573-90.
107. Toledo RA, Jimenez C, Armaiz-Pena G, Arenillas C, Capdevila J, Dahia PLM. Hypoxia-Inducible Factor 2 Alpha (HIF2alpha) Inhibitors: Targeting Genetically Driven Tumor Hypoxia. *Endocr Rev*. 2023;44(2):312-22.
108. Choi WSW, Boland J, Lin J. Hypoxia-Inducible Factor-2alpha as a Novel Target in Renal Cell Carcinoma. *J Kidney Cancer VHL*. 2021;8(2):1-7.
109. Smith KA, Waypa GB, Dudley VJ, Budinger GRS, Abdala-Valencia H, Bartom E, et al. Role of Hypoxia-Inducible Factors in Regulating Right Ventricular Function and Remodeling during Chronic Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020;63(5):652-64.
110. Macias D, Fernandez-Aguera MC, Bonilla-Henao V, Lopez-Barneo J. Deletion of the von Hippel-Lindau gene causes sympathoadrenal cell death and impairs chemoreceptor-mediated adaptation to hypoxia. *EMBO Mol Med*. 2014;6(12):1577-92.
111. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.
112. Semenza GL. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med*. 2003;54:17-28.
113. Tsiftoglou AS. Erythropoietin (EPO) as a Key Regulator of Erythropoiesis, Bone Remodeling and Endothelial Transdifferentiation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Implications in Regenerative Medicine. *Cells*. 2021;10(8).
114. Wang Q, He Z, Huang M, Liu T, Wang Y, Xu H, et al. Vascular niche IL-6 induces alternative macrophage activation in glioblastoma through HIF-2alpha. *Nat Commun*. 2018;9(1):559.

A horizontal, textured red brushstroke that serves as a background for the text. The stroke is slightly irregular and has a soft, painterly quality.

ANEXOS

Durante estos 5 años de doctorado en los que he realizado mi trabajo en el grupo de la Dra. Silvia Martín Puig, he podido desarrollar mi trabajo de tesis doctoral cuyos resultados cardiopulmonares están descritos en el siguiente artículo:

- **Teresa Albendea-Gomez**, Susana Mendoza-Tamajon, Rosana Castro-Mecinas, Beatriz Escobar, Susana Ferreira Rocha, Sonia Urra-Balduz, Jose Angel Nicolas-Avila, Eduardo Oliver, Maria Villalba-Orero and Silvia Martin-Puig. "**Vascular HIF2 signaling prevents cardiomegaly, alveolar congestion and capillary remodeling during chronic hypoxia**". ATVB. 2025 Jan 23. doi: [10.1161/ATVBAHA.124.321780](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.124.321780)

Asimismo, a lo largo de este periodo de formación, he participado activamente en los siguientes trabajos:

- Ivan Menendez-Montes, Beatriz Escobar, Manuel J. Gomez, **Teresa Albendea-Gomez**, Beatriz Palacios, Elena Bonzon-Kulichenko, Jose Luis Izquierdo-Garcia, Ana Vanessa Alonso, Alessia Ferrarini, Luis Jesus Jimenez-Borreguero, Jesus Ruiz-Cabello, Jesus Vázquez, Silvia Martin-Puig. "**Activation of amino acid metabolic program in cardiac HIF1-alpha-deficient mice**". iScience. 2021 Feb 3;24(2):102124.
- Escobar B*, Menendez-Montes I*, **Albendea-Gomez T***, Mendoza-Tamajón S, Diaz-Diaz-C, Palacios B, Ruiz-Cabello J, Jimenez-Borreguero LJ, Cid MC, Takahashi K and Martin-Puig S. "**Activation of HIF2 in the Wt1 lineage leads to cardiac inflammation, intracoronary thrombosis, vascular remodeling and arterial dilation, recapitulating Kawasaki disease**". Circulation (CIRCULATIONAHA/2023/065548) (en segunda revisión). Publicado en el repositorio bioRxiv: doi: <https://doi.org/10.1101/2024.01.22.576642>

* Primera posición de autoría compartida.

Además, de estos trabajos, también he participado en otros trabajos del grupo que están aún en vías de desarrollo y esperamos publicar pronto.

A continuación, se adjuntan los 2 trabajos que ya están publicados oficialmente en ATVB e iScience en los que he participado como autora principal y autora.

BASIC SCIENCES

Vascular HIF2 Signaling Prevents Cardiomegaly, Alveolar Congestion, and Capillary Remodeling During Chronic Hypoxia

Teresa Albendea-Gomez¹, Susana Mendoza-Tamajon¹, Rosana Castro-Mecinas¹, Beatriz Escobar¹, Susana Ferreira Rocha¹, Sonia Urra-Balduz¹, Jose Angel Nicolas-Avila¹, Eduardo Oliver¹, Maria Villalba-Otero¹, Silvia Martin-Puig¹

BACKGROUND: Hypoxia is associated with the onset of cardiovascular diseases including cardiac hypertrophy and pulmonary hypertension. HIF2 (hypoxia inducible factor 2) signaling in the endothelium mediates pulmonary arterial remodeling and subsequent elevation of the right ventricular systolic pressure during chronic hypoxia. Thus, novel therapeutic opportunities for pulmonary hypertension based on specific HIF2 inhibitors have been proposed. Nevertheless, HIF2 relevance beyond the pulmonary endothelium or in the cardiac adaptation to hypoxia remains elusive. Wt1 (Wilms tumor 1) lineage contributes to the heart and lung vascular compartments, including pericytes, endothelial cells, and smooth muscle cells.

METHODS: Here, we describe the response to chronic hypoxia of a novel HIF2 mutant mouse model in the Wt1 lineage (*Hif2/Wt1* cKO [conditional knockout]), characterizing structural and functional aspects of the heart and lungs by means of classical histology, immunohistochemistry, flow cytometry, echocardiography, and lung ultrasound analysis.

RESULTS: *Hif2/Wt1* cKO is protected against pulmonary remodeling and increased right ventricular systolic pressure induced by hypoxia, but displays alveolar congestion, inflammation, and hemorrhages associated with microvascular instability. Furthermore, lack of HIF2 in the Wt1 lineage leads to cardiomegaly, capillary remodeling, right and left ventricular hypertrophy, systolic dysfunction, and left ventricular dilation, suggesting pulmonary-independent cardiac direct roles of HIF2 in hypoxia. These structural defects are partially restored upon reoxygenation, while cardiac functional parameters remain altered.

CONCLUSIONS: Our results indicate that cardiopulmonary HIF2 signaling prevents excessive vascular proliferation during chronic hypoxia and define novel protective roles of HIF2 to warrant stable microvasculature and organ function.

GRAPHIC ABSTRACT: A [graphic abstract](#) is available for this article.

Key Words: diagnostic imaging ■ heart failure ■ hypoxia ■ microvessels ■ oxygen ■ pulmonary hypertension ■ Wilms tumor 1

Low oxygen tensions induce the activation of HIFs (hypoxia inducible factors) that are heterodimeric transcription factors composed by an oxygen-regulated α -subunit and a constitutively expressed oxygen-independent β -subunit, also known as ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator).¹ In normal oxygen conditions or normoxia, the proline residues of HIF α subunits are hydroxylated by oxygen-dependent PHDs (prolyl-4-hydroxylases). The VHL (von Hippel-Lindau) protein binds to hydroxylated HIF α and acts as

a substrate recognition component of the E3 ubiquitin ligase complex, which leads to proteasomal degradation of the HIF α protein. Under hypoxia, the activity of PHDs is suppressed, and HIF α subunits translocate into the nucleus to bind HIF1 β . Then, the heterodimer HIF α /HIF β binds to the hypoxia response elements in its target genes, resulting in their transcriptional activation.²⁻⁴ There are 2 main HIF α isoforms with transcriptional capacity. HIF1 is known to be associated with the upregulation of glycolytic genes such as GLUT1

Correspondence to: Silvia Martin-Puig, PhD, Instituto de Investigaciones Biomedicas Sols-Morreale (IIBM), CSIC-UAM, C/Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Email smpuig@iib.uam.es

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.124.321780>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page e96.

© 2025 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at www.ahajournals.org/journal/atvb

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AT/ET	acceleration time to ejection time pulmonary
CSPG	chondroitin sulfate proteoglycan 4
cKO	conditional knockout
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EC	endothelial cell
EPO	erythropoietin
ERG	ETS-related gene
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FB	fibroblast
GPRC5A	G-protein-coupled receptor class C group 5 member A
GLUT1	glucose transporter 1
HE	hematoxylin and eosin
HIF	hypoxia inducible factor
IB4	isolectin B4
KO	knockout
LV	left ventricle
LDHA	lactate dehydrogenase
LVEF	LV ejection fraction
LVED	LV end-diastolic
LVES	LV end-systolic
MoLUS	Mouse Lung UltraSound
NG2	neuron-glia antigen 2
O₂	oxygen
PDPN	podoplanin
PC	pericyte
PGK	phosphoglycerate kinase
PH	pulmonary hypertension
PH3	phospho histone H3
PHD	prolyl-4-hydroxylase
Rai3	retinoic acid inducible protein 3
RV	right ventricle
RVSP	right ventricular systolic pressure
RVWT	RV wall thickness
SMA	smooth muscle actin
SMC	smooth muscle cell
SPC	surfactant protein C
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
VSMC	vascular smooth muscle cell
WGA	wheat germ agglutinin
Wt1	Wilms tumor 1

(glucose transporter 1), PGK (phosphoglycerate kinase), or LDHA (lactate dehydrogenase a), which function to metabolically adapt the tissue to oxygen deprivation and

Highlights

- Vascular HIF2 (hypoxia inducible factor 2) promotes pulmonary vascular remodeling in response to chronic hypoxia, leading to elevated right ventricular systolic pressure.
- HIF2 is required for pulmonary microvascular stability upon low oxygen exposure and prevents alveolar swelling and lung congestion.
- Vascular HIF2 signaling protects from cardiomegaly, heart failure, excessive capillary proliferation, and remodeling during sustained hypoxia.
- The protective role of HIF2 preserving cardiac and pulmonary microvasculature is modulated by oxygen levels, and the cardiopulmonary defects induced by HIF2 deletion are rescued upon reoxygenation.

anaerobic ATP synthesis. HIF2 induces EPO (erythropoietin) and VEGF (vascular endothelial growth factor), which are important to improve oxygen supply to the hypoxic region.^{5,6} Although HIF1 and HIF2 bind to an identical core-binding motif within the hypoxia response elements 5'-RCGTG-3', they have unique targets not compensated by the complementary isoform. HIF1 contributes more to the acute hypoxia-driven transcriptional responses, like cellular glycolysis or adenosine release after injury, while HIF2 has been mostly related to chronic adaptation to hypoxia.⁷ Both isoforms have been associated with several pathologies.

It is well established that HIFs play an important role in the heart homeostasis and along the progression of cardiovascular diseases.⁸ During development, HIF1 α is expressed in the embryonic heart,⁹⁻¹² where it governs a glycolytic metabolism of the compact myocardium.^{11,12} In contrast, the role of HIF2 during heart development remains poorly understood. Global HIF2 deletion affects catecholamine production in the organ of Zuckerlandl, leading to prominent bradycardia and cardiac dysfunction.¹³ Nevertheless, the phenotype of full HIF2 knockout mice varies depending on the genetic background.¹³⁻¹⁵ In the lungs, HIF signaling has also been reported to execute important functions. HIF1 α is implicated in bronchial epithelial formation, while HIF2 is mostly expressed in the vascular endothelium and alveolar type II cells, playing a crucial role in vascular morphogenesis and surfactant production during lung development.¹⁶ In contrast to the limited knowledge about HIF2 function in the heart, the role of HIF2 signaling has been extensively studied during the development and progression of pulmonary hypertension (PH). PH is a cardiovascular disorder that can appear in patients with chronic obstructive pulmonary disease, after prolonged exposure to hypoxia or because of living at high altitude (World Health Organization class 3).¹⁶ PH is characterized by significant vascular remodeling of the distal pulmonary arteries, resulting in reduced vascular lumen and increased resistance,

which leads to elevation of the right ventricular systolic pressure (RVSP) that eventually could lead to heart failure.¹⁶ In this context, the role of HIF1 and HIF2 in endothelial cells (ECs) during the onset of PH has been extensively studied.^{16–20} Several lines of evidences using *VE-CadherinCre (Cdh5)*,¹⁷ *Tie2Cre*,¹⁸ or *L1Cre*¹⁹ models to mediate endothelial-specific deletion of HIFs have uncovered the essential role of HIF2 in mediating pulmonary arterial remodeling associated to vasoconstriction, proliferation of ECs and vascular smooth muscle cells (VSMCs), as well as fibrosis, causing the occlusion of the pulmonary arteries and increasing the RVSP.²⁰ Recent publications have investigated the importance of HIF signaling during muscularization in mural cells, either VSMC^{21,22} or pericytes (PCs),²³ reporting that they are not involved in the remodeling process as the ECs are. However, the role of HIF2 in non-ECs within the vascular compartment during the response to chronic hypoxia, especially in the heart, remains elusive. In that regard, the use of alternative genetic strategies able to simultaneously delete *Hif2α* in several vascular cells might be of interest to better understand the general function of HIF2 in PH, where the interaction between several cell types is necessary for disease progression. Furthermore, a broader inhibition within vascular cells may help to evaluate the potential impact of systemic administration of HIF2 inhibitors for disease treatment,^{24,25} as HIF2, or any of its target genes, may have special or even opposite functions in different PH-involved cell types.

Despite the notion that PH is more prevalent in females than in males, with an estimated ratio of 4.3:1 for all forms of PH,²⁶ males with PH usually have a worse prognosis, which seems to be dependent on estrogen-associated cardiac and vascular protection or either to a better response of females to current treatments (revised in the study by Mair et al²⁷). In addition, numerous studies performed in rats, either with monocrotaline or chronic hypoxia, also reported some sex effects on the appearance and progression of PH.²⁸ Nevertheless, our knowledge of the sex effect on the setting of mouse models of PH is still limited. Indeed, several investigations in mice proposed that estrogens might in fact enhance vascular remodeling by impacting on the proliferative capacity of pulmonary arterial smooth muscle cells (SMCs).²⁹ However, estrogens seem to play a cardioprotective role, as estrogen therapy can reverse advanced defects of PH like right ventricular (RV) maladaptive hypertrophy and RV dysfunction.^{30,31}

Wt1 (Wilms tumor 1) is a transcription factor with a critical role in organogenesis and adult homeostasis. During embryogenesis, *Wt1* contributes to the mesothelium of most organs of the coelomic cavity, including the heart, lungs, spleen, liver, stomach, and the intestine, being also essential for proper development and homeostasis of the kidneys and the urogenital system.³² During cardiogenesis, *Wt1* contributes to epicardial progenitors that give rise to coronary vasculature and interstitial

fibroblasts (FBs) through a process of epithelial-to-mesenchymal transition.^{33–35} Furthermore, *Wt1* is expressed in a small fraction of cardiomyocytes,^{36,37} and it has been reported that *Wt1* is also expressed in postnatal noncoronary ECs of the microvasculature.³⁸ In the lungs, *Wt1* contributes to the pulmonary mesenchyme forming the vascular and bronchial SMCs, tracheal cartilage, and part of the arterial endothelium, as well as to fibroblast-like cells from the airways.³⁹ Nevertheless, the adult lineage tracing of *Wt1* in the lungs has not been evaluated to the best of our knowledge.

The goal of our research was to evaluate the importance of HIF2 signaling in the development of coronary vasculature derived from *Wt1* epicardial progenitors and to determine the role of HIF2 beyond the endothelium during the cardiac and pulmonary adaptation to low oxygen tensions. Our genetic strategy aims to evaluate possible side-effects of novel therapeutic approaches based on HIF2 inhibition,^{24,25} as HIF2 plays important roles in several cell types contributed by the *Wt1* lineage. For that purpose, here, we generated and characterized a novel mouse model of simultaneous HIF2 deletion in cardiopulmonary vascular and interstitial populations in homeostasis and in response to chronic hypoxia using the *Wt1Cre* line.⁴⁰ In contrast to former tools, this model allows us to evaluate the impact of concurrent elimination of HIF2 in ECs, PCs, SMCs, and FBs of the heart and lungs and hence, is a valuable genetic strategy to anticipate potential effects of systemic HIF2 abrogation. Our data reveal that HIF2 is not required for proper coronary vasculature development during cardiogenesis. Moreover, the lack of HIF2 signaling in the *Wt1* lineage protects against the elevation of the RVSP during chronic hypoxia by preventing arteriolar muscularization, while it results in lung capillary leakage, alveolar hemorrhages, inflammation, and pulmonary congestion. Furthermore, elimination of HIF2 in the *Wt1* compartment has detrimental effects on the cardiac adaptation to sustained low oxygen, leading to cardiomegaly, ventricular hypertrophy, dilatation, and systolic dysfunction, together with microvascular instability. Interestingly, most of these cardiopulmonary structural abnormalities are rescued after 1 week of reoxygenation, while cardiac function remains affected. Remarkably, we do not observe significant differences between male and female *Hif2/Wt1* cKO mice, suggesting that HIF2-mediated responses to low oxygen are sex independent. Our data uncover novel protective roles of HIF2 in the heart and lungs in response to chronic hypoxia beyond its negative effect on the arterial endothelium and suggest that cardiopulmonary HIF2 signaling exerts a positive function preventing excessive capillary remodeling in response to low oxygen. Our work expands our limited knowledge on the role of HIF2 in the cardiovascular system during sustained hypoxia and might be relevant in the setting of novel pharmacological strategies based on HIF2 inhibition for PH.^{24,25}

MATERIALS AND METHODS

Data Availability

The authors declare that all the data supporting the *in vivo* characterization are available within the main text of the article or within the [Supplemental Material](#). Detailed experimental procedures or data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Material transfer agreements are required for the donation of mice.

Animal Models and Study Approval

The *Hif2^{flox/flox}* (*Epas1^{tm1Mcs/J}*),⁴¹ *Rosa-tdTomato* (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm1.4(CAG-tdTomato)Hze/J}), and *Ng2-DsRed* (*Tg(Cspg4-DsRed.T1)1Akik/J*)⁴² mouse lines were obtained from The Jackson Laboratory and maintained in homozygosity. The *Wt1Cre* mouse line was kindly provided by Dr De La Pompa⁴⁰ and maintained in heterozygosity. All mouse lines were grown on a C57BL/6 background. Strain details are listed in the Major Resources Tables in the [Supplemental Material](#). To generate the *Hif2* floxed/*Wt1Cre* mouse line (*Hif2/Wt1* cKO [conditional knockout]), homozygous *Hif2^{flox/flox}* females were crossed with heterozygous *Wt1-Cre^{+/-}* to obtain *Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/-}* (*Hif2/Wt1* cKO) and control *Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/+}* littermates. *Hif2^{flox/flox}/Wt1-Cre^{+/-}* mice were crossed with the *Rosa-tdTomato* mouse line to generate the conditional *Hif2/Wt1* reporter line. We did not find any difference on the phenotypic manifestations between *Hif2/Wt1* cKO males and females. Hence, both sexes were indistinctly used for all the experiments. Mice were housed in SPF (specific-pathogen-free) conditions at the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) Animal Facility. Welfare of animals used for experimental and other scientific purposes conformed to European Union (EU) Directive 2010/63EU and Recommendation 2007/526/EC, enforced in the Spanish law under Real Decreto 53/2013. Experiments with mice were allowed by the authorized Environmental Department of Comunidad de Madrid, Spain, and the CNIC Animal Experimentation Ethics Committee with reference number PROEX 267/19.

Genotyping

All mice were genotyped by polymerase chain reaction. Primer sequences and further genotyping details can be found in Methods in the [Supplemental Material](#).

Hypoxia Exposure and Reoxygenation Protocol

Twelve-week-old mice (male and female) were placed for 2 or 3 weeks inside a hypoxia chamber from CoyLab (O_2 Control Glove Box 1 Person Polymer, 220v). The hypoxia chamber was equipped with an oxygen (O_2)

control system (programed at 10% O_2), a nitrogen gas regulator, and an animal filtration system. After hypoxia exposure, mice were immediately analyzed by cardiac or lung echography and later on euthanized following the accepted protocols to proceed with organ extraction for tissue analysis. For reoxygenation experiments, the cages with animals exposed to 2 or 3 weeks of hypoxia at 10% O_2 were placed in normal ambient condition for an additional week before echography analysis and organ collection.

Cardiopulmonary-Echography and Analysis

Transthoracic echocardiography was blindly performed by an expert operator with a 30-MHz probe (Vevo 2100; VisualSonics, Canada). Mice were slightly anesthetized with 1% to 2% isoflurane in 100% oxygen, adjusted to maintain podal reflex (\approx 400–500 bpm). To assess the RV, tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), pulmonary artery acceleration time/ejection time ratio (AT/ET), and RV wall thickness (RVWT) were measured. An apical 4-chamber view was selected to obtain TAPSE, by M mode. Pulmonary flow was acquired from a parasternal short-axis view at the level of the great vessels, using pulsed-wave Doppler. An angle short-axis view to optimized RV wall visualization was obtained to measure the wall thickness by M mode. Additionally, standard short-axis view and parasternal long-axis view in B and M modes were recorded and left ventricular (LV) dimensions and function were analyzed. LV end-diastolic (LVED) and end-systolic (LVES) areas were traced for automatic calculation of the LV end-diastolic and end-systolic volumes, as well as the LV ejection fraction (LVEF). In addition, both sides of the lungs were longitudinally scanned. With these lateral views, we analyzed the pleural pattern, the line profile, and the predominant color indicative of edema to calculate the mouse lung ultrasound score (MoLUS). To assess the MoLUS, we assigned a value for each type of parameter (lung sliding [horizontal movement of the pleural], line profile [A or B], color profile [black or white], Z lines and pleural thickness, defects, and effusion), according to its severity as previously described.⁴³ The final score is the sum of all values for an individual. Images were analyzed offline by a second blind operator.

RVSP Measurement

Mice were anesthetized with medetomidine (1 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg). RVSP was measured by closed-chest insertion of the Venofix A catheter (27G), coupled to a pressure transducer (Transpac IV), directly into the RV. Hemodynamic data were recorded using the Biopac MP36R System and the Biopac Acknowledge 4.1.0 software. For each mouse, at least 30 seconds of continuous and stable heartbeat cycles without noise were selected to obtain the average RVSP.

Heart and Lung Extraction and Processing

Mice were euthanized by CO₂ inhalation following the approved protocol. Whole-mount analysis to determine organ and body weight changes was performed at dissection. Samples were fixed for 1 hour (for endothelial markers) or overnight (for histological staining and non-endothelial markers) at 4 °C in 4% PFA (paraformaldehyde) or formalin 10%. After fixation, samples were embedded in 30% sucrose and frozen in OCT (optimal cutting temperature) medium for later cryosection (8 μm) preparation in a cryostat (CM1950; Leica) or were dehydrated and embedded in paraffin for sectioning at 4 μm in a microtome (RM2155; Leica). Reagent references are detailed in the Major Resources Tables in the [Supplemental Material](#).

Histological and Immunohistochemical Analysis

Histological analysis of the heart and lungs was performed using 4-μm-thick paraffin sections. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) for structural characterization. For arterial remodeling evaluation, lung sections were stained with an antibody against SMA (smooth muscle actin) following standard histological analysis at the CNIC Histopathology Facility. HE- and SMA-stained slides were scanned using the Hamamatsu NanoZoomer 2.0RS device, and the image analysis and measurements were performed using NDP view (Hamamatsu, Japan) and ZEN 31 Blue Edition Lite. For immunostaining of paraffin sections, the samples were rehydrated and antigens were retrieved by incubation in citrate buffer pH 6 (10 mmol/L sodium citrate) for 20 minutes in a microwave. Sections were permeabilized with PBST (phosphate-buffered saline with triton) 0.4% (PBS [phosphate-buffered saline] 1X+Triton TX100) for 15 minutes shaking and blocked with blocking solution (PBST 0.1% with 5% goat serum) during 1 hour in a dark humid chamber. For OCT sections, samples were placed at room temperature for 1 hour and washed with distilled water for another hour. Upon complete removal of OCT, the sections were permeabilized and blocked as for paraffin sections. After blocking, sections were incubated with primary antibodies in blocking solution overnight at 4 °C. After washing 3× with PBST 0.1%, sections were incubated with secondary antibodies and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) in PBS 1X for 1 hour at room temperature in darkness and mounted in fluorescent mounting medium. Images were acquired with Leica SP8 Navigator, Leica gated STED-3X-WLL SP8, or Stellaris confocal microscopes. The references of primary and secondary antibodies and reagents used in this study are listed in the Major Resources Table in the [Supplemental Material](#).

Quantification of Immunostaining

Immunofluorescence staining was quantified using ImageJ.⁴⁴

Cell Lineage Labeling Strategy for Heart and Lung Populations by Flow Cytometry Analysis

Mice were euthanized and subsequently, the heart and all the lung lobes were perfused with HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) to clean the blood inside the tissues. On the one hand, the atria, valves, and the large vessels of the heart were removed with surgical scissors, leaving only the ventricles for further analysis. On the other hand, the bronchi and trachea of the lungs were removed, leaving only the lobes. Once the tissues had been processed, cardiac ventricles and lobes of the lungs were minced separately on iced PBS. Minced heart was digested with collagenase A (2.5 mg/mL), liberase (0.25 mg/mL), and DNase I (100 U/mL). Minced lungs were digested only with liberase (0.25 mg/mL) and DNase I (100 U/mL). Both tissues were digested during 30 minutes in a water bath at 37 °C with shaking every 5 minutes. Next, the digestion reaction was stopped by adding HBSS and the final single-cell suspensions were obtained by mechanical dissociation and filtering in 70 μm and subsequently in 40 μm Cell Strainer.

Before starting the cell lineage labeling, an erythrocyte lysis with red blood cells lysis buffer 1X (prepared from a 10× solution: 82.9 g/L ammonium chloride NH₄Cl, 10 g/L potassium bicarbonate KHCO₃, 2 mL/L EDTA [ethylenediamine tetra-acetic acid] 0.5 M, fill up to 1 L of distilled water pH 7.2–7.4) was performed for 15 minutes on ice. Red blood cells lysis reaction was stopped by adding Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) buffer (PBS 1X; 2.5% inactive FBS [fetal bovine serum] and 0.5 M EDTA). Single-cell suspensions were incubated for 45 minutes in rotation at 4 °C with conjugated antibodies against CD (cluster of differentiation) CD45, CD90.2, CD31, PDPN (podoplanin)-Gp38 (Glycoprotein 38), and CD39 to define gates for nonmyocyte populations in the heart and lungs as previously described by others.^{45–48} References, working dilutions, and vendors for flow cytometry studies are detailed in the Major Resources Table in the [Supplemental Material](#). SYTOX Green was used as a viability marker. Samples were acquired in BD LSRFortessa SORP and BD FACSAria Fusion Cell Sorter (BSL-2 [Biosafety level 2]) equipped with the DIVA software. FlowJo was used to analyze the data.

Quantification of Nonmyocyte Cell Percentage or Total Number per Gram of Tissue

To calculate the percentage of nonmyocyte cells in the heart and lungs contributed by the Wt1 lineage, we used Wt1-Cre/Rosa-tdTomato and followed the digestion and

labeling strategy described above. To determine the contribution to each cardiac and lung lineage, we calculated the number of each cell population within the CD45⁻/Wt1-Tomato⁺ gate relative to the total Tomato⁺ cells following the formula

$$\frac{n \text{ cells of each population within Tomato}^+}{\text{total Tomato}^+} \times 100$$

To determine the absolute number of each cell lineage contributed by Wt1 in different mice, we used beads to normalize the value per gram of tissue. In particular, we used Truecount beads (663028; BD Biosciences) that were prepared at 10 000 beads/mL of FACS buffer with SYTOX Green, viability marker. Of this beads buffer, 500 μ L was added to the cell suspension (already labeled) described above. Approximately 1000 beads were acquired per sample. The quantification of the number of cells per gram of tissue was calculated with this formula:

$$\frac{\text{cells}}{\text{beads}} \times \frac{\text{total Beads}}{\text{ml Beads buffer}} \times \frac{\text{ml Beads buffer used}}{\text{fraction of single - cell solution used}} \times \frac{n \text{ samples}}{\text{weight of tissue (mg)}} = \frac{\text{cell}}{\text{mg}}$$

In this equation, cells/beads are the exact number of cells/beads after FlowJo analysis. Total beads/mL beads buffer are 10 000 beads/1 mL beads buffer. Of the beads buffer, 0.5 mL was used per 0.1 mL of single-cell suspension of digestion tissue, and per tube, there was only 1 sample.

Statistical Analysis and Study Design

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 10 software. All results are presented as mean \pm SEM. Normal distribution of the data was tested by using the Shapiro-Wilk test (α [significance level] =0.05) for small samples and Kolmogorov-Smirnov test (α =0.05) for large samples. In case of normal distribution, the unpaired 2-tailed Student *t* test was used (α =0.05; CI [confidence interval] of 95%). For comparison of multiple groups (>2 groups), a 1-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test was used. P <0.05 was considered to be statistically significant. Nonsignificant results (P >0.05) were not shown in the graphs.

Samples were analyzed blinded by different researchers, and groups (control and *Hif2/Wt1 cKO* mutant mice) were randomly assigned to each condition (normoxia, 2 weeks of hypoxia, 3 weeks of hypoxia, and reoxygenation). No prior statistical group size determination was performed. Instead, group size was determined according to previous experience and reproducibility of the results across the independent experiments. No animals were excluded from the study unless due to ethic end points criteria associated with the treatment or genotype. Images were chosen according to the most representative examples reflecting the typical phenotype.

RESULTS

Wt1 Lineage Contributes to the Macrovascular and Microvascular Compartments of the Heart and Lungs

To further investigate Wt1 lineage in the adult heart, we performed lineage tracing analysis using a Rosa-tdTomato reporter mouse. We confirmed the previously reported contribution of Wt1 lineage to coronary arteries^{35,49} including ECs (ERG [ETS-related gene]⁺) and VSMCs (SMA⁺; Figure 1A). Additionally, we identified that Wt1 lineage also contributes to PCs (CSPG [chondroitin sulfate proteoglycan 4] or NG2 [neuroglial antigen 2])⁺ and interstitial FBs (PDPN [or GP38]⁺) surrounding and connecting the capillaries of the microvasculature (Figure 1B). We further investigated Wt1 lineage contribution to major cardiac cell populations by flow cytometry using the Rosa-tdTomato/Wt1Cre mice. FACS analysis showed that Wt1 lineage contributed to 31.4% of CD45⁻ nonmyocyte cells in the adult heart (Figure 1C). Within the Tomato⁺-Wt1-derived cells, around 6.4% corresponds to CD39⁺/CD90⁺ VSMCs (Figure 1D), 24% to CD90⁺/GP38⁻ PCs (Figure 1E), 50.1% to CD31⁺ ECs (Figure 1F), and 8.4% to CD31⁻/CD90⁻/GP38⁺ FBs (Figure 1F; Table S1). Furthermore, we calculated the relative contribution of Wt1 lineage within each nonmyocyte population and determined that there is a significant percentage of cardiac vascular cells contributed by the Wt1 lineage, especially PCs, SMCs, and FBs that are contributed 81.3%, 73.3%, and 56.4%, respectively, by the Wt1 lineage in the heart (Table S2). Therefore, despite the fact that the endothelium is the main cell type within the Wt1 lineage, ECs derived from the Wt1 lineage only represent around 23% of cardiac ECs (Table S2).

Regarding the adult lungs, using the same reporter model of Rosa-tdTomato/Wt1Cre, we found that Wt1 lineage contributes to ECs of the alveolar capillary network, small and large arteries, as well as to SMCs in the medial layer of pulmonary arteries and in the bronchial submucosa (Figure 1G). Wt1 lineage also contributes to parenchymal PCs (Figure 1H). In contrast, there is no contribution to alveolar type I or type II cells identified by Rai3 (retinoic acid inducible protein 3), also known as GPRC5A (G-protein-coupled receptor class C group 5 member A)⁵⁰ or SPC (surfactant protein C^{48,51}; Figure S1A), or to alveolar macrophages labeled by IB4 (isolectin B4⁵²; Figure 1I). As in the heart, we further investigated Wt1 lineage contribution to major lung cell populations by flow cytometry using Rosa-tdTomato/Wt1Cre mice. FACS analysis showed that over 18.3% of the CD45⁻ fraction of adult lungs expresses or is Wt1-derived (Figure 1J). Of these Tomato⁺ cells, around 37.3% corresponds to CD31⁺/CD39⁺ endothelium (Figure 1K), 20.6% to CD31⁻/CD39⁺ SMCs (Figure 1K), 22.8% to

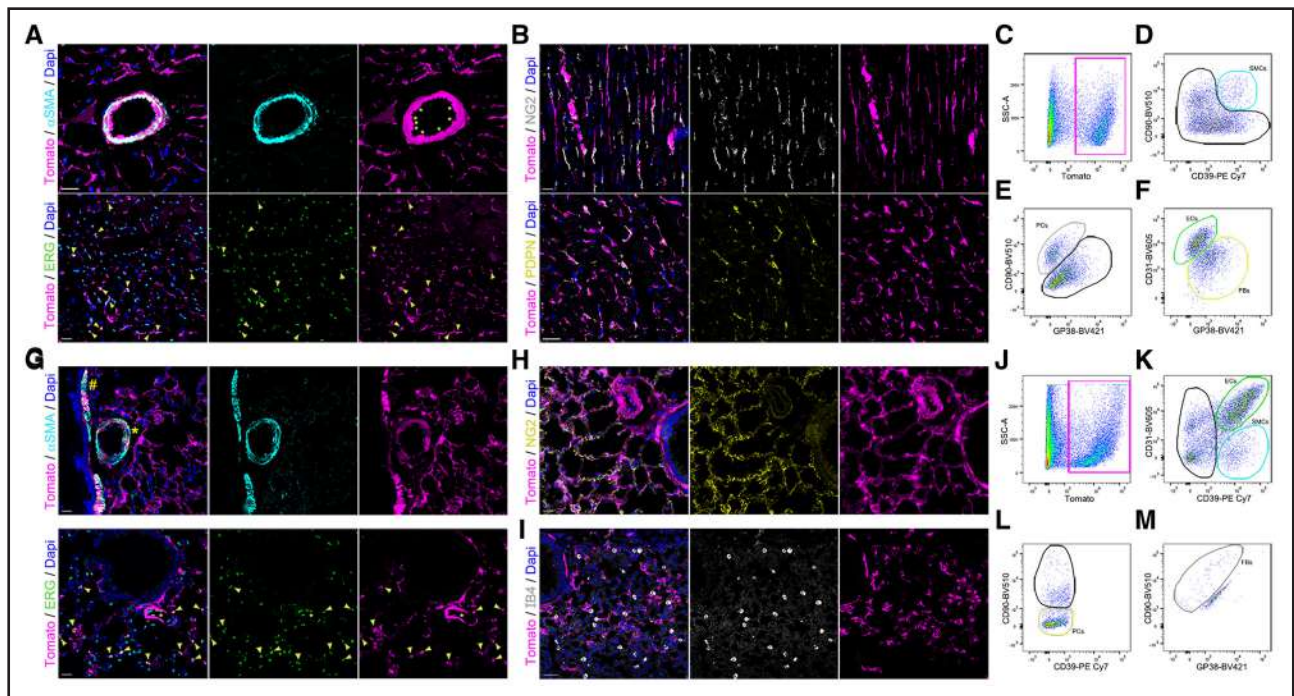


Figure 1. Wt1 (Wilms tumor 1) lineage contribution to the heart and lungs.

A and B. Immunofluorescence of cardiac sections from Rosa-tdTomato/Wt1Cre reporter mice with cell lineage markers. **A**, α SMA (α -smooth muscle actin; vascular smooth muscle cells [VSMCs], cyan), ERG (ETS-related gene; endothelial cells [ECs], green), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; nucleus, blue), and Tomato (Wt1 lineage, magenta). **Top**, Complete colocalization of α SMA⁺/Tomato⁺ signal and some ECs (yellow asterisks) in a coronary artery. **Bottom**, ERG⁺/Tomato⁺ ECs of capillaries (yellow arrowheads). Scale bars=20 μ m. **B**, **Top**, Colocalization between NG2 (neuron-glia antigen 2; pericytes [PCs], white) and Tomato (Wt1 lineage, magenta). **Bottom** portions are stained with PDPN (podoplanin; fibroblasts [FBs], yellow) and Tomato (Wt1 lineage, magenta). Nuclei are costained with DAPI (blue). Scale bars=20 μ m. **C through F**, Representative flow cytometry plots for identification of nonmyocyte cardiac populations within the Wt1 lineage. **C**, Magenta rectangle contains Tomato⁺ cells within all CD (cluster of differentiation) 45⁻ cells. **D**, Within Tomato⁺ cells in **C**, the cyan gate contains CD90⁺/CD39⁺ SMCs. **E**, From the black gate on **D**, the gray gate corresponds to CD90⁺/GP (glycoprotein) 38⁻ PCs. **F**, From PC⁻ in **E**, the green gate represents CD31⁺/GP38⁻ ECs and the yellow gate represents CD31⁻/GP38⁺ FBs. **G through I**, Immunofluorescence of lung sections of Rosa-tdTomato/Wt1Cre reporter mice with cell lineage markers. **G**, α SMA (VSMCs, cyan), ERG (ECs, green), DAPI (nucleus, blue), and Tomato (Wt1 lineage, magenta). **Top**, Colocalization of α SMA⁺/Tomato⁺ in the bronchial submucosa (yellow hash) and in the medial layer of a pulmonary artery (yellow asterisk). **Bottom**, Alveolar ERG⁺/Tomato⁺ ECs (yellow arrowheads). Scale bars=20 μ m. **H and I**, Colocalization of Tomato (Wt1 lineage, magenta) with NG2 (**H**, PCs, yellow) but not with IB4 (isolectin B4; **I**, alveolar macrophages, white). Nuclei are costained with DAPI (blue). Scale bars=20 μ m (**H**) and 40 μ m (**I**). **J through M**, Representative plots of the flow cytometry strategy to characterize Wt1 pulmonary lineage. **J**, Magenta rectangle contains positive selection of Tomato⁺ cells within all CD45⁻ cells. **K**, Within Tomato⁺ cells, the cyan gate represents CD90⁺/CD31⁻ SMCs and the green gate, CD31⁺/CD39⁺ ECs. **L**, From the SMC/EC black gate in **K**, PCs were identified as CD39⁻/CD90⁻. **M**, Finally, we excluded cell autofluorescence detected with the single markers (data not shown) and kept the CD90⁺/GP38⁻ as the FB gate (gray). BV421 indicates brilliant violet 421; BV510, brilliant violet 510; PE-Cy7, phycoerythrin cyanine 7; and SSC-A, side scatter-area.

CD90⁻/GP38⁻ PCs (Figure 1L), as further confirmed by NG2-DsRed reporter mice (Figure S1B), and 1.7% to CD90⁺ FBs (Figure 1L and 1M; Table S3). As in the heart, despite the higher proportion of ECs contributed by the pulmonary Wt1 lineage (37.3%) compared with other cell types, these ECs just represent 20.65% of the lung endothelium (Table S4). The relative contribution of Wt1-derived cells to other pulmonary lineages was also determined (Table S4).

In summary, these lineage tracing analyses demonstrated that Wt1 lineage contributes to macrovasculature and microvasculature of the heart and lungs, offering an important tool for genetic manipulation and molecular analysis of the different cell components involved in vascular function.

Elimination of HIF2 in the Wt1 Lineage Prevents Pulmonary Arteriole Muscularization and Protects Against Elevation of the RVSP Upon Chronic Hypoxia

To understand the role of HIF2 in the cardiovascular and pulmonary compartments contributed by Wt1 (Figure 1), we generated a new conditional HIF2 knockout model by crossing the *Hif2*-floxed⁴¹ line with the *Wt1*Cre mouse line,⁴⁰ from now on *Hif2*/Wt1 cKO. First, we confirmed efficient deletion of *Hif2*-floxed exon 2 by polymerase chain reaction (data not shown). Next, we determined that elimination of *Hif2* in the Wt1 lineage does not cause embryonic lethality or any obvious cardiovascular structural defect, including the proper formation of the

ventricular chambers or the coronary tree (Figure S2A). Furthermore, we confirmed that *Hif2/Wt1* cKO mice display normal survival curve from weaning to adulthood (Figure S2B), suggesting that *Wt1/HIF2* signaling is not required for the correct formation and homeostasis of the heart. Afterward, we evaluated lung tissue integrity under normoxic conditions on whole-mount analysis (data not shown) and by HE staining of the lung parenchyma (Figure 2A), finding no obvious differences between the structure of control and *Hif2/Wt1* cKO mice in basal conditions. Thereafter, we investigated the impact of *Hif2* deletion in the *Wt1* lineage in response to chronic hypoxia. To that aim, we exposed 12-week-old control and *Hif2/Wt1* cKO mice to 10% oxygen (O_2) during 2 or 3 weeks and evaluated the functional and structural parameters by echography and classical histology (Figure S3). Because it has been previously reported that hypoxia induces vascular remodeling by muscularization of distal pulmonary arterioles,^{21,53} first we performed an

SMA staining in lung sections in normoxia or after exposure to hypoxia (Figure 2B). Tissue analysis revealed that after 2 and 3 weeks of hypoxia, there were no significant differences between control and mutant mice on the number of large (30–20 μm ; Figure 2C) or on medium (19–10 μm) caliber arterioles (Figure 2D), although there was an upward tendency in the number of medium arterioles of control mice with respect to *Hif2/Wt1* cKO mice. In contrast, this difference became highly significant for the number of small arteries (9–1 μm) found in control mice after 2 and 3 weeks of hypoxia compared with normoxic conditions, while *Hif2/Wt1* cKO mice exhibited a similar number of small arteries in both conditions (Figure 2E). Then, we determined the effect of the vascular remodeling differences after hypoxia exposure in the measurement of the RVSP. As expected, control mice displayed a significant elevation of the RVSP after 2 and 3 weeks of chronic hypoxia. In contrast, the *Hif2/Wt1* cKO mice were protected against the elevation of

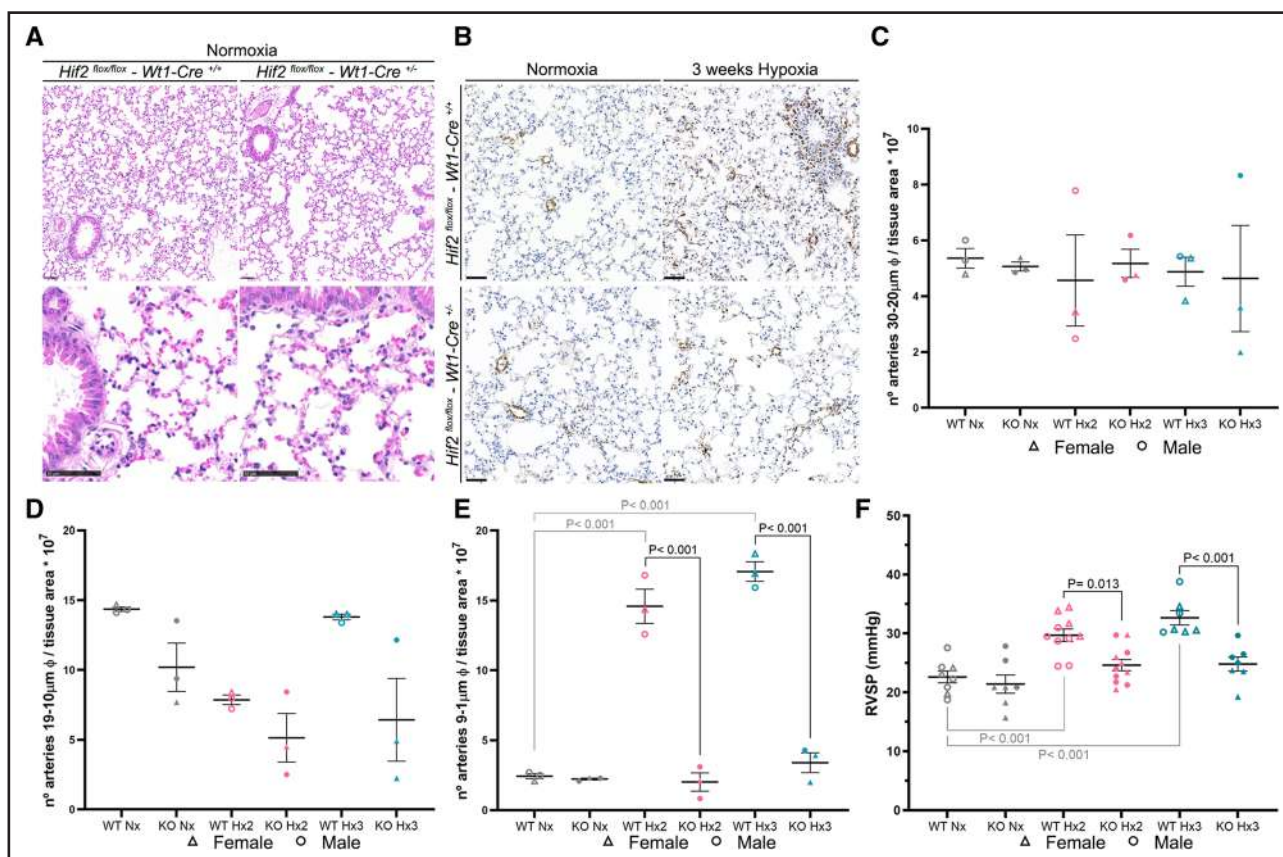


Figure 2. Muscularization of pulmonary arteries under chronic hypoxia.

A, Histological analysis by hematoxylin and eosin (HE) staining of lung sections from control (*Hif2*^{flox/flox}-*Wt1*-*Cre*^{+/+}, left) and *Hif2/Wt1* cKO (conditional knockout) mice (*Hif2*^{flox/flox}-*Wt1*-*Cre*^{+/-}, right) in normoxic conditions. Scale bars=50 μm . **B**, Representative images of α SMA (α -smooth muscle actin) immunohistochemistry in control (*Hif2*^{flox/flox}-*Wt1*-*Cre*^{+/+}, top) and *Hif2/Wt1* cKO mice (*Hif2*^{flox/flox}-*Wt1*-*Cre*^{+/-}, bottom) in normoxia (Nx) or chronic (3 weeks) hypoxia. Scale bar, 50 μm . **C** through **E**, Quantification of the number of lung arterioles ranging from 30 to 20 μm (**C**), 19 to 10 μm (**D**), or 9 to 1 μm (**E**) per tissue area in control (WT [wild-type]) and *Hif2/Wt1* cKO (KO [knockout]) mice in Nx (gray), after 2 weeks of sustained hypoxia (Hx2; pink), and after 3 weeks of sustained hypoxia (Hx3; blue). **F**, Scatter dot plot of the right ventricular systolic pressure (RVSP). All graph bars show individual values for females (triangles) and males (circles), and the black line represents the mean \pm SEM. The total distribution of sex was as follows: n=8 females and n=9 males (**C** through **E**) and n=23 females and n=27 males (**F**). Statistical significance was determined using a 1-way ANOVA multiple comparisons test with Tukey correction. Significant *P* values >0.001 are explicitly indicated, while *P* values <0.001 state as *P*<0.001. Nonsignificant (*P*>0.05) *P* values are not shown.

RVSP at both time points, showing similar pressures in normoxia or hypoxia conditions (Figure 2F). These results are in agreement with former works describing the role of endothelial HIF2 in arterial remodeling upon chronic hypoxia.^{17–19}

Altogether, these data indicate that elimination of HIF2 in the *Wt1* lineage prevents vascular remodeling and subsequent RVSP elevation after chronic hypoxia, protecting against hallmarks of PH in response to low oxygen.

Functional HIF2 in the Microvascular Compartment Is Necessary for Alveolar Parenchyma Stability and Pulmonary Performance During Sustained Hypoxia

To further investigate the importance of HIF2 signaling in the pulmonary *Wt1* lineage, we performed lung and right-sided cardiac echography analysis in control and *Hif2/Wt1* cKO mice in normoxia and after 2 or 3 weeks of chronic hypoxia at 10% O₂. First, we determined the value of the pulmonary artery acceleration time/ejection time ratio (AT/ET) indicative of the pulmonary artery pressure, finding no significant differences between control and *Hif2/Wt1* cKO mice, neither in normoxia nor after 2 or 3 weeks of hypoxia (Figure 3A). Next, we calculated the mouse lung ultrasound score (MoLUS) that predicts the level of pulmonary congestion integrating several functional and structural parameters of the lungs (pleural effusion; alveolar edema/hemorrhages; and the presence or absence of A, B, and Z lines among others), and that has been previously reported to correlate with cardiac function.⁴³ Echographic analysis confirmed similar mouse lung ultrasound values between control and *Hif2/Wt1* cKO mice in normoxia and after 2 weeks of hypoxia exposure, but a notable increase on this parameter in HIF2 mutants after 3 weeks of sustained hypoxia (Figure 3B and 3C). These results indicated that, despite their protection against vascular remodeling (Figure 2C) and RVSP elevation (Figure 2G), *Hif2/Wt1* cKO mice displayed worse pulmonary performance and profound structural abnormalities during sustained hypoxia. To further investigate the extent of lung congestion in *Hif2/Wt1* cKO mice upon hypoxia, we analyzed the structure of the pulmonary parenchyma by HE staining, observing an important thickening of the alveolar wall in the *Hif2/Wt1* cKO mice relative to controls by 2 weeks of hypoxia (Figure 3D). Moreover, by 3 weeks of hypoxia, the *Hif2/Wt1* cKO mice lungs displayed severe erythrocyte congestion in the alveolar parenchyma, arterioles, and arteries (Figure 3D). This increased alveolar wall thickening and hemorrhages resulted in a significant reduction of the alveolar space in *Hif2/Wt1* cKO mice compared with controls after both 2 and 3 weeks of hypoxia exposure (Figure 3E). In addition, after 3 weeks of chronic hypoxia, there was an increased number of alveolar macrophages,

many of them loaded with erythrocytes as evidenced by positive hemosiderin signal on HE staining (Figure 3F). We further confirmed the increase in the number of alveolar macrophages in the *Hif2/Wt1* cKO mouse lungs by 3 weeks of hypoxia by immunofluorescence with IB4 (Figure 3G and 3H), and its expansion with the proliferation marker Ki67 (Figure 3G and 3I). Since *Wt1* lineage contributes neither to alveolar macrophages (Figure 1I) nor to alveolar type I or alveolar type II cells (Figure S1A), our results suggest that these alveolar alterations in the *Hif2/Wt1* cKO mice might be indirect and secondary to the abnormal vascular remodeling occurring in HIF2 mutants in response to sustained hypoxia. To evaluate this hypothesis, we analyzed whether the endothelium of the alveolar parenchyma was affected in the *Hif2/Wt1* cKO mice. Immunostaining with markers for ECs (ERG) and proliferation (Ki67) after exposure to chronic hypoxia (Figure 3G) showed a significant increase in the number of proliferating ECs in the *Hif2/Wt1* cKO mice compared with controls (Figure 3J).

Finally, FACS analysis from the lung tissue of Rosa-tdTomato/*Wt1*Cre reporter control or HIF2-floxed Rosa-tdTomato/*Wt1*Cre (*Hif2/Wt1* reporter cKO) mice revealed a significant elevation in total cells contributed by the *Wt1* lineage (Tomato⁺) in *Hif2/Wt1* reporter cKO compared with reporter control mice after 2 weeks of 10% O₂ exposure or with *Hif2/Wt1* reporter cKO mice in normoxia (Figure 4A). These quantitative changes by FACS analysis were further confirmed qualitatively by immunofluorescence (Figure 4B). The increase in total Tomato⁺ cells could be explained by the elevation on Tomato⁺ ECs in the *Hif2/Wt1* reporter cKO mice in hypoxia relative to normoxia and compared with reporter control mice after 2 weeks of hypoxia (Figure 4C and 4E). No significant changes were observed between control or *Hif2/Wt1* reporter cKO Tomato⁻ ECs (Figure 4C and 4D). We observed no significant changes in the total Tomato⁺ PCs in the lungs between normoxia or hypoxia in reporter control or in *Hif2/Wt1* reporter cKO mice, although there is a trend of induction in Tomato⁺ PCs in the *Hif2/Wt1* reporter cKO compared with control mice after 2 weeks of chronic hypoxia (Figure 4F and 4H). In contrast, there is a reduction of Tomato⁻ PCs from normoxia to hypoxia in the reporter control but not in the *Hif2/Wt1* reporter cKO mice (Figure 4G).

In summary, these results reveal that despite the protective effect on preventing pulmonary arteriole remodeling and elevation of RVSP, defective HIF2 signaling in the *Wt1* compartment is deleterious for lung adaptation to chronic hypoxia. Indeed, HIF2 deletion in the *Wt1* lineage results in unstable and proliferative microvasculature that favors erythrocyte extravasation and macrophage proliferation, leading to alveolar wall thickening, severe lung congestion, and pulmonary damage in response to chronic hypoxia.

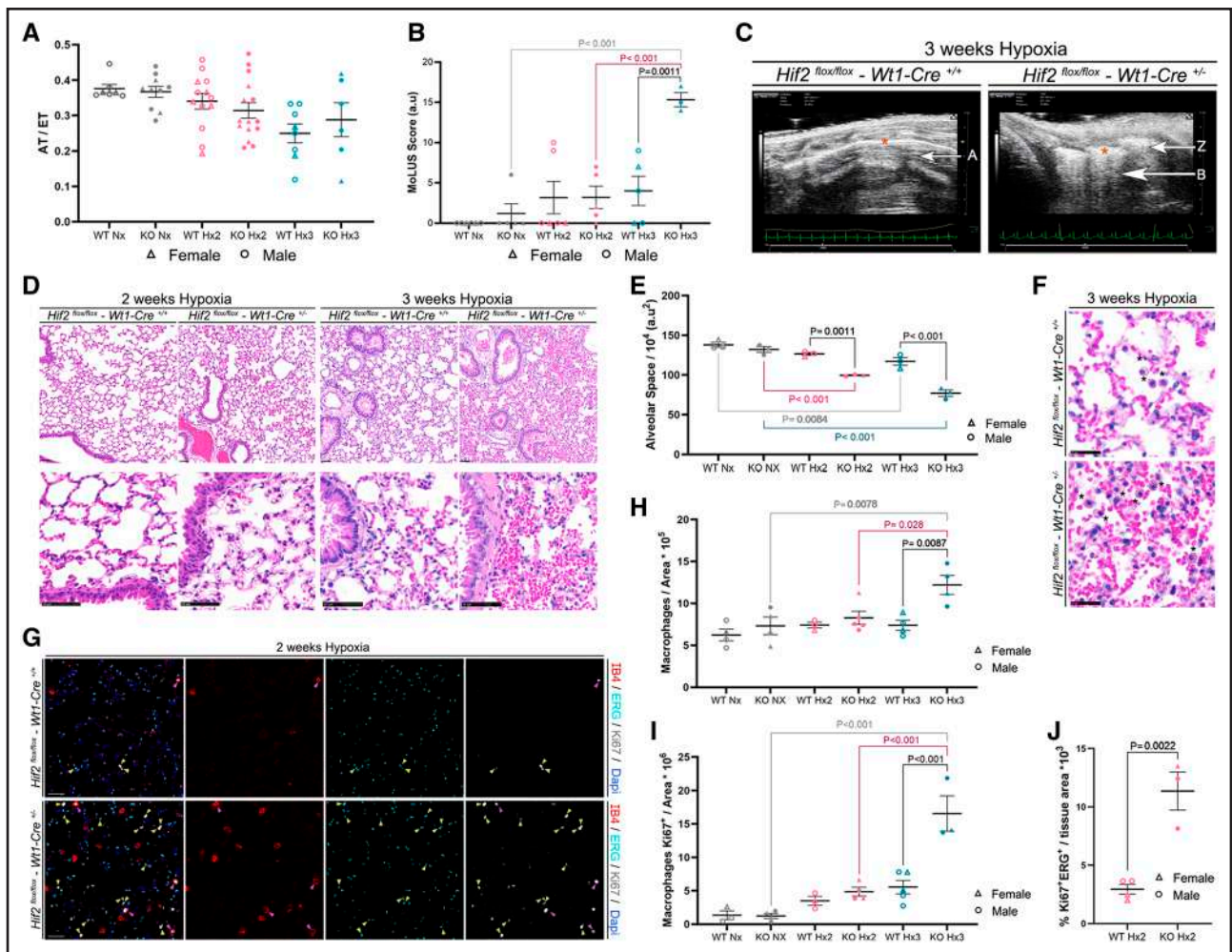


Figure 3. Pulmonary architecture and function during sustained low oxygen conditions.

A, Scatter dot plot of pulmonary artery acceleration time/ejection time ratio (AT/ET) measured by Doppler echography in control (WT [wildtype]) and *Hif2/Wt1* cKO (conditional knockout) (KO [knockout]) mice in normoxia (Nx; gray), 2 weeks of hypoxia (Hx2; pink), or 3 weeks of hypoxia (Hx3; blue). **B**, Scatter dot plot of mouse lung ultrasound score (MoLUS) of control (WT) and *Hif2/Wt1* cKO (KO) mice in Nx (gray) and hypoxia conditions (Hx2 [pink] or Hx3 [blue]). **C**, Representative lung echography images of control (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/+}*, **left**) and *Hif2/Wt1* cKO (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, **right**) mice after Hx3 exposure. B lines (white large tracks from top to bottom) and Z lines (white short lines under the pleura) reflecting pulmonary edema are obvious in the *Hif2/Wt1* cKO mice compared with controls with only A lines (fine lines parallel to the pleural line). Pleural thickening and fragmentation are evident in *Hif2/Wt1* cKO mice (white intense line, orange asterisk on **right**) compared with normal pleura indicative of well-aerated lungs (white thin line, orange asterisk on **left**). **D**, Histopathologic characterization by hematoxylin and eosin (HE) staining of lung sections of control (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/+}*, **left**) and *Hif2/Wt1* cKO mice (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, **right**) of each condition of hypoxia. Scale bars=50 μ m. **E**, Scatter dot plot showing the quantification of the alveolar space in control (WT) and *Hif2/Wt1* cKO (KO) mice in Nx (gray) and hypoxic conditions (Hx2 [pink] or Hx3 [blue]). **F**, Representative HE images of pulmonary inflammation showing alveolar macrophages (black asterisks) in control (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/+}*, **top**) and *Hif2/Wt1* cKO mice (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, **bottom**) after Hx3. Scale bars=25 μ m. **G**, Representative immunofluorescence of pulmonary sections from control (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/+}*, **top**) and *Hif2/Wt1* cKO mice (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, **bottom**) stained for ERG (ETS-related gene; endothelial cells [ECs], cyan), Ki67 (mitosis, white), IB4 (isolectin B4; alveolar macrophages, red), and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; nucleus, blue) showing proliferation of ECs (ERG⁺/Ki67⁺, yellow arrowheads) and alveolar macrophages (IB4⁺/Ki67⁺, pink arrowheads) after Hx2. Scale bars=20 μ m. **H**, Scatter dot plot showing the quantification of macrophages per tissue area in controls (WT) and *Hif2/Wt1* cKO (KO) mice in Nx (gray) and hypoxic conditions (Hx2 [pink] or Hx3 [blue]). **I**, Number of proliferating macrophages per tissue area in lung sections from control (WT) and *Hif2/Wt1* cKO (KO) mice in Nx (gray) and hypoxia conditions (Hx2 [pink] or Hx3 [blue]). **J**, Percentage of EC proliferation (ERG⁺/Ki67⁺) per tissue area in control (WT) and *Hif2/Wt1* cKO (KO) mice after Hx2 exposure. All graph bars show individual values for females (triangles) and males (circles), and the black line represents the mean \pm SEM. The total distribution of mice sex was as follows: (**A**) n=20 females and n=37 males, (**B**) n=12 females and n=18 males, (**E**) n=7 females and n=11 males, (**H**) n=9 females and n=15 males, (**I**) n=9 females and n=13 males, and (**J**) n=3 females and n=4 males. Statistical significance was determined using a 1-way ANOVA multiple comparisons test with Tukey correction for **A**, **B**, **E**, **H**, and **I** and 2-tailed Student *t* test for **J**. Significant *P* values >0.001 are explicitly indicated, while *P* values <0.001 state as *P*<0.001. Nonsignificant (*P*>0.05) *P* values are not shown.

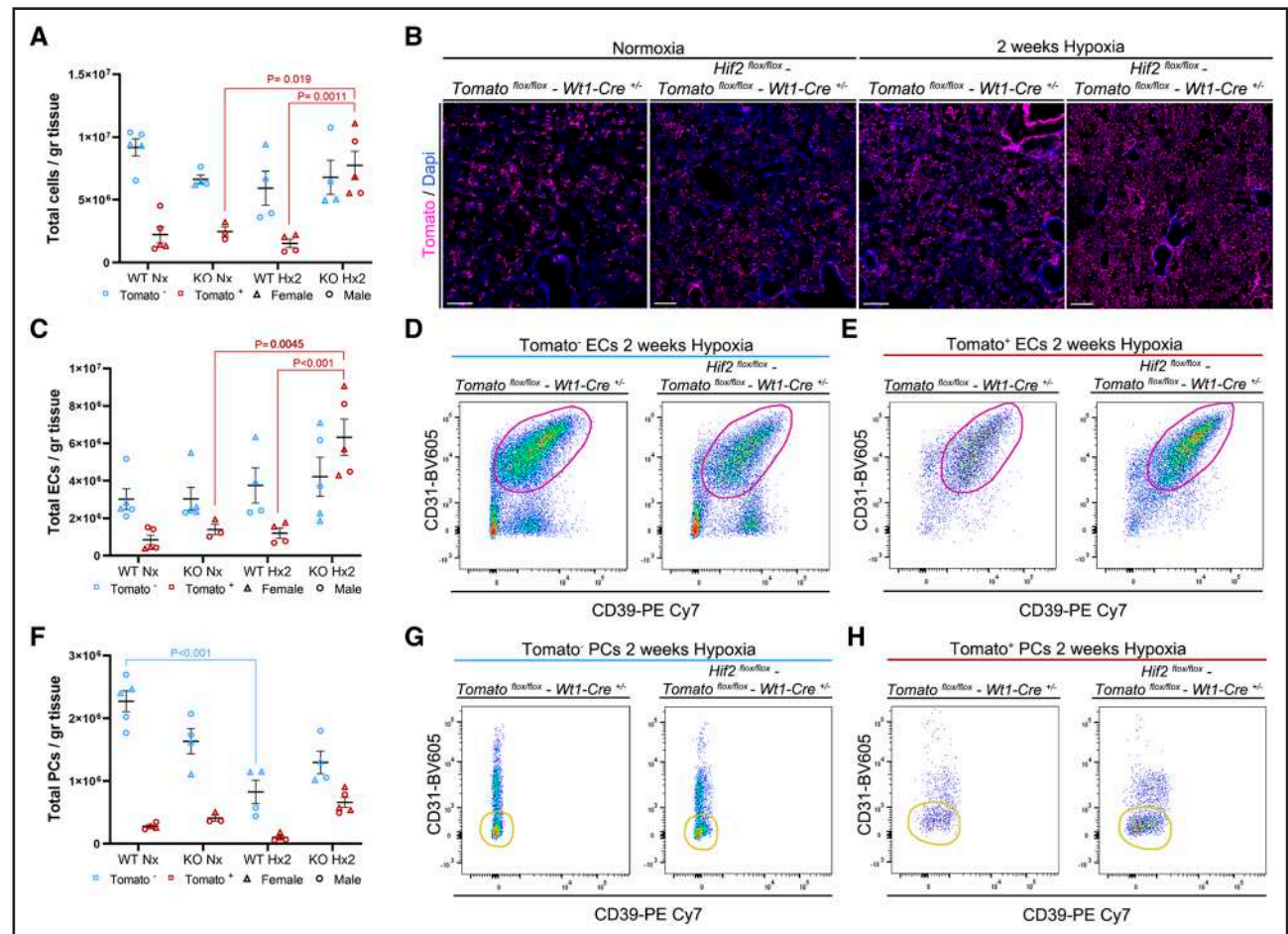


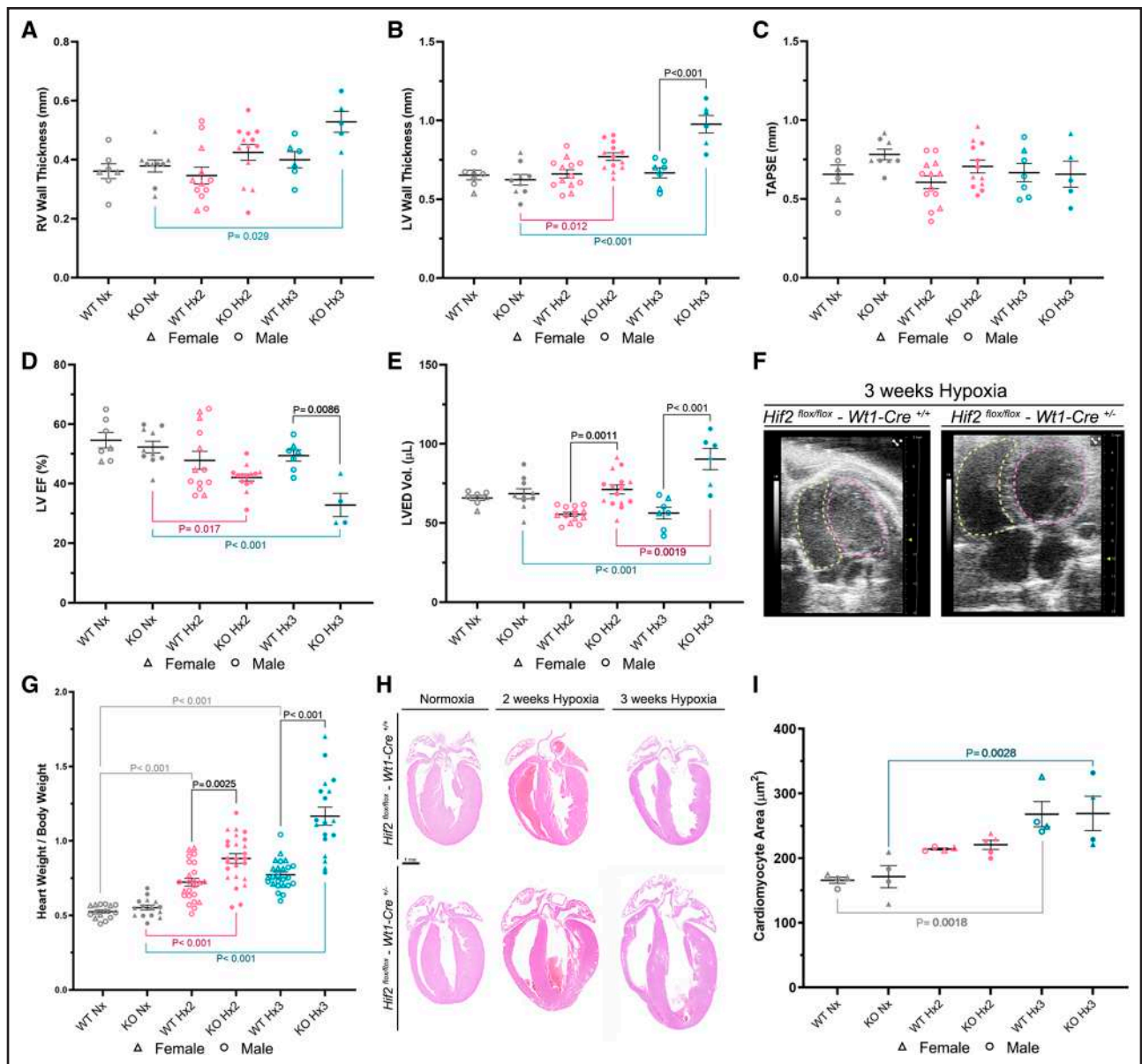
Figure 4. Quantitative analysis of Wt1 (Wilms tumor 1)-derived pulmonary cells during chronic hypoxia.

A, Quantification of total cells per gram of tissue of Tomato⁻ (blue) and Tomato⁺ (red) cells in Rosa-tdTomato/Wt1 reporter control (WT [wild type]) and Rosa-tdTomato/Hif2 reporter cKO (conditional knockout) (KO [knockout]) mice in normoxia (Nx) and after 2 weeks of hypoxia (Hx2) analyzed by FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting). **B**, Immunofluorescence of Tomato (Wt1 lineage, magenta) and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; nucleus, blue) in lung sections from Rosa-tdTomato/Wt1 reporter control (Tomato^{flax/flax}-Wt1^{+/-}, left panel of each experimental condition) and Rosa-tdTomato/Hif2 reporter cKO mice (Tomato^{flax/flax}/Hif2^{flax/flax}-Wt1^{+/-}, right panel of each experimental condition) in Nx (left columns) and after Hx2 (right columns). Scale bars=200 μm. **C** and **F**, Scatter dot plots representing changes in the total cells per gram of tissue of Tomato⁻ (blue) and Tomato⁺ (red) endothelial cells (ECs; **C**) or pericytes (PCs; **F**) in control (WT) and mutant (KO) mice in Nx and after Hx2. **D**, **E**, **G**, and **H**, Representative FACS pseudocolor image showing Tomato⁻ ECs (purple gates, **D**) and Tomato⁺ ECs (purple gates, **E**) or Tomato⁻-PCs (yellow gates, **G**) and Tomato⁺-PCs (yellow gates, **H**) from control (Tomato^{flax/flax}-Wt1^{+/-}) and HIF2 mutant (Tomato^{flax/flax}-Hif2^{flax/flax}-Wt1^{+/-}) lung tissue. All portions show the EC and PC content from a fixed number of 24 000 CD (cluster of differentiation) 45⁻ cells. For all scatter plots, individual values for females (triangles) and males (circles) are shown, and the black line represents the mean±SEM. The total distribution of mice sex was as follows: **A**, **C**, and **F** n=16 females and n=18 males. Statistical significance was determined using a 1-way ANOVA multiple comparisons test with Tukey correction. Significant *P* values >0.001 are explicitly indicated, while *P* values <0.001 state as *P*<0.001. Nonsignificant (*P*>0.05) *P* values are not shown. BV605 indicates brilliant violet 605; and PE Cy7, phycoerythrin cyanine 7.

Hif2/Wt1 cKO Mutants Display Cardiac Hypertrophy and Ventricular Dilatation in Response to Low Oxygen Exposure

Because the Wt1 lineage has a broad contribution to several vascular compartments of the heart (Figure 1A and 1B), and considering that the direct role of HIF2 in cardiac function and tissue structure in response to chronic hypoxia remains elusive, we decided to explore the impact of *Hif2* abrogation in the Wt1 cardiac lineage upon sustained low oxygen exposure. To this aim, we exposed 12-week-old control and *Hif2*/*Wt1* mutant mice

to 10% O₂ during 2 and 3 weeks (Figure S3) and performed cardiac functional and structural analysis before and after hypoxia treatment. Echocardiography characterization revealed that the lack of HIF2 in the Wt1 lineage favors cardiac hypertrophy of both the RV, and specially the LV, in response to low oxygen tensions, while controls remained unaltered (Figure 5A and 5B). Whereas RV systolic function (TAPSE [tricuspid annular plane systolic excursion]) was unaffected in mutant mice relative to controls after exposure to chronic hypoxia (Figure 5C), *Hif2*/*Wt1* cKO mice displayed common hallmarks of LV systolic heart failure, with a significant reduced LV ejection



fraction (LVEF; Figure 5D) and increased LV end-diastolic volume (LVED Vol; Figure 5E), indicative of cardiac dilatation (Figure 5F). To connect functional parameters with structural adaptations, next, we performed whole-mount organ analysis, finding a progressive increase of the heart weight/body weight ratio in *Hif2/Wt1* cKO mutant mice

fraction (LVEF; Figure 5D) and increased LV end-diastolic volume (LVED Vol; Figure 5E), indicative of cardiac dilatation (Figure 5F). To connect functional parameters with

structural adaptations, next, we performed whole-mount organ analysis, finding a progressive increase of the heart weight/body weight ratio in *Hif2/Wt1* cKO mutant mice

relative to controls (Figure 5G). This gradual cardiomegaly in response to chronic hypoxia was further validated by HE staining (Figure 5H).

Considering that *Wt1* lineage contributes to some scattered cardiomyocytes,³⁷ as we further confirmed by lineage tracing (data not shown), we decided to explore whether the absence of *Hif2* could influence cardiomyocyte size upon hypoxia. To this aim, we performed WGA (wheat germ agglutinin) staining in 14- to 15-week-old heart sections from control and *Hif2/Wt1* cKO mice and compared the size of cardiomyocytes in normoxia and after 2 and 3 weeks of exposure to 10% O₂ in both groups (Figure S4). The analysis indicated an ongoing increase in the cardiomyocyte cell area from normoxia to 2 and 3 weeks of hypoxia in both control and *Hif2/Wt1* mutants (Figure 5I). Nevertheless, we did not find significant differences between control and *Hif2/Wt1* cKO mice at any time point, excluding cardiomyocyte cell hypertrophy as the mechanism responsible for the increased cardiomegaly and elevated heart weight/body weight ratio developed by *Hif2/Wt1* mutants after hypoxia.

Overall, these results indicate that deletion of *Hif2* in the *Wt1* lineage compromises cardiac adaptation to chronic hypoxia, causing LV systolic dysfunction and enhanced cardiomegaly not due to cardiomyocyte hypertrophy, pointing to a protective role of vascular HIF2 signaling in the heart during adaptation to low oxygen conditions.

HIF2 Signaling Represses Cardiac EC Proliferation and Prevents Microvascular Remodeling During Chronic Hypoxia

Next, we decided to assess whether the increased cardiomegaly of the *Hif2/Wt1* cKO mice during chronic hypoxia could be due to enhanced cardiac hyperplasia. To explore this possibility, we determined the proliferation rate by immunostaining of cardiac sections of control and *Hif2/Wt1* mutants in normoxia or after exposure to 2 and 3 weeks of hypoxia using mitosis markers (PH3 [phospho histone H3] and Ki67) together with WGA to label cardiomyocyte contour and IB4 and ERG for ECs. Image analysis revealed that hypoxia exposure did not influence cardiomyocyte proliferation, but rather promoted mitosis of the microvasculature compartment (Figure 6A). We further confirmed that IB4⁺ proliferating cells were indeed ERG⁺ ECs (Figure S5A). Interestingly, EC proliferation followed a dynamic pattern, with a peak after 2 weeks of hypoxia exposure, followed by a drop close to normoxic values after 3 weeks of hypoxia (Figure 6B), suggesting that HIF2 regulates an inhibitory feedback loop to compensate cardiac endothelial proliferation induced by hypoxia. To explore the impact of proliferation in response to hypoxia, we evaluated the integrity of the cardiac capillary network using IB4 to mark the outline of ECs. Our analysis revealed an increase in the capillary area in the *Hif2/Wt1* cKO mice after 2 and 3 weeks of

hypoxia that was not observed in the controls or in normoxia conditions (Figure 6C and 6D). This enlargement in the capillary area suggested a higher capillary diameter that was accompanied by a reduction in the capillary density assessed as the number of capillaries per tissue area (Figure 6E).

Surprisingly, and in contrast to our observations in the lungs, FACS analysis using the Rosa-tdTomato/*Wt1*Cre reporter mice revealed no changes in the total number of Tomato⁺ cells, but a significant increase in Tomato⁻ cells in the heart of *Hif2/Wt1* reporter cKO mice after exposure to 2 weeks of hypoxia (Figure 6F and 6G). Furthermore, despite the endothelial proliferation observed at 2 weeks of hypoxia (Figure 6A) in the mutant mice, FACS analyses showed no significant changes in the total number of ECs between *Hif2/Wt1* reporter cKO and the reporter control mice in hypoxia (Figure 6H through 6J). Nevertheless, there is a trend to increase on the total Tomato⁻ ECs of the *Hif2/Wt1* reporter cKO mice in hypoxia (Figure 6H). In addition, immunofluorescence combining endothelial (ERG and IB4) and mitosis (Ki67) markers together with endogenous Tomato signal of the reporter revealed that the ECs proliferating in the *Hif2/Wt1* reporter cKO mice are indeed Tomato⁻ (Figure S5B). Similarly, the total PCs from *Hif2/Wt1* reporter cKO mice did not change significantly in hypoxia, whereas the control Tomato⁺ PCs were reduced. The Tomato⁻ PCs population did not change in cKO or control mice (Figure 6K through 6M).

In sum, these results indicate that proliferation of cardiac microvascular ECs is increased after 2 weeks of hypoxia and that HIF2 signaling prevents excessive proliferation in sustained low oxygen conditions. Furthermore, lack of HIF2 leads to cardiac capillary dilation, suggesting a protective role of HIF2 against microvascular remodeling and instability in the heart during chronic hypoxia.

Cardiopulmonary Structural Defects of the *Hif2/Wt1* cKO Mice Are Partially Restored Upon 1-Week Reoxygenation

Because the *Hif2/Wt1* cKO mice did not display alterations in basal conditions, next, we wondered whether the cardiac and pulmonary functional and structural defects developed after chronic hypoxia were reversible. First, we analyzed the impact of 1-week reoxygenation on 2- and 3-weeks hypoxia-induced cardiomegaly (Figure 7A), finding that both control and *Hif2/Wt1* cKO mice were able to restore normoxic values of heart weight/body weight ratio (Figure 7B). Moreover, reoxygenation after chronic hypoxia could also correct capillary density (Figure 7C) while capillary caliber remains slightly increased in the *Hif2/Wt1* cKO mice (Figure 7D). Next, we performed echocardiography analysis and determined that hypoxia-induced RV (Figure 7E) and especially LV

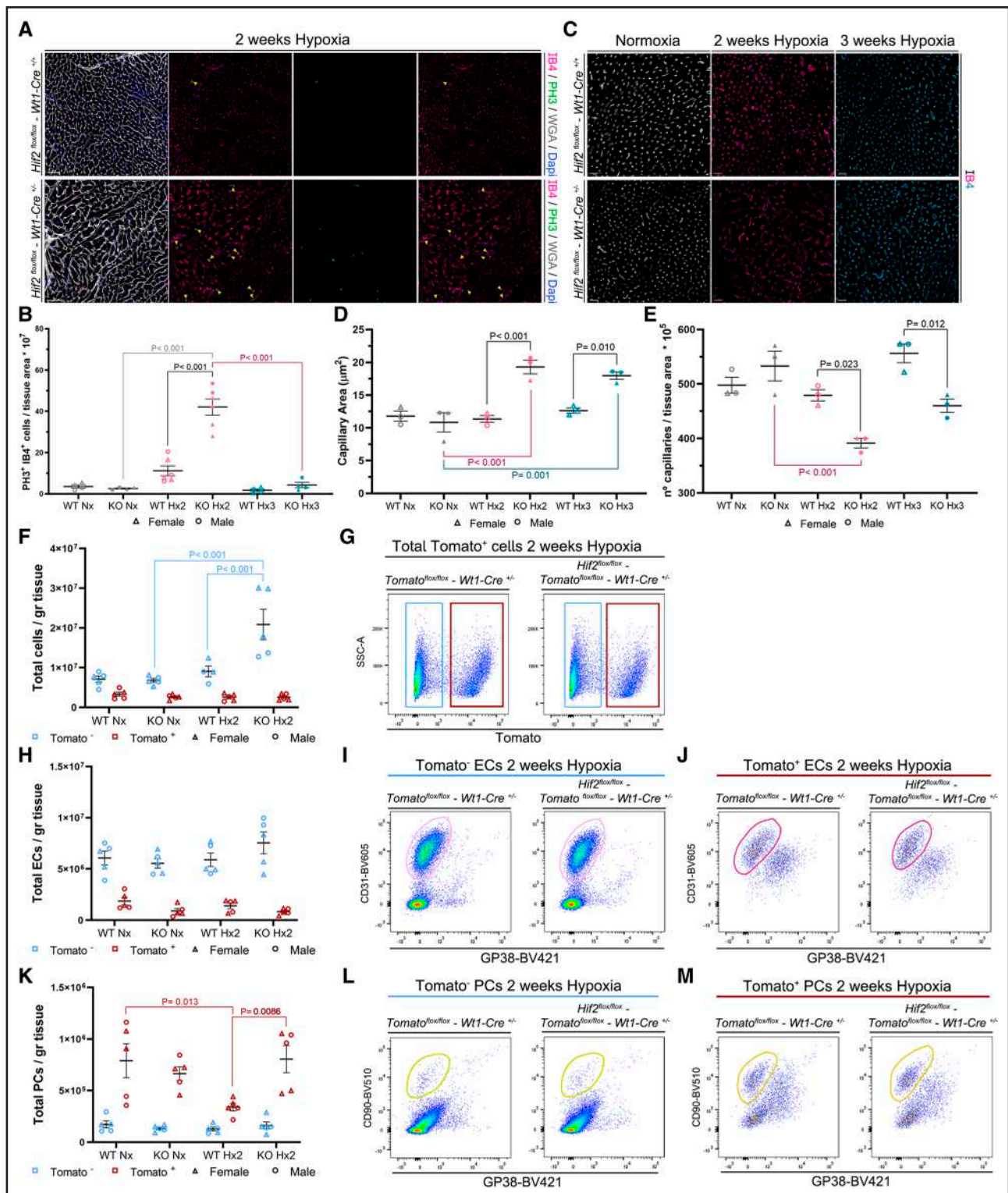


Figure 6. Cardiac microvascular remodeling in response to low oxygen.

A, Immunofluorescence of representative cardiac sections after 2 weeks of hypoxia (Hx2) of control ($Hif2^{flx/flx}-Wt1-Cre^{+/+}$, top) and $Hif2/Wt1$ cKO (conditional knockout) mice ($Hif2^{flx/flx}-Wt1-Cre^{+/-}$, bottom) with IB4 (isolectin B4; outline of endothelial cells [ECs], magenta), WGA (wheat germ agglutinin; outline of all cells, white), PH3 (phospho histone H3; mitosis, green), and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; nucleus, blue). Yellow arrowheads indicate IB4⁺/PH3⁺ cells. Scale bars=40 μ m. **B**, Quantification of the EC proliferation rate per tissue area in controls (WT [wild type]) and $Hif2$ mutants (KO [knockout]) in normoxia (Nx; gray) and Hx2 (pink) or 3 weeks of hypoxia (Hx3; blue). **C**, Representative images of IB4 immunofluorescence of control ($Hif2^{flx/flx}-Wt1-Cre^{+/+}$, top) and $Hif2/Wt1$ cKO mice ($Hif2^{flx/flx}-Wt1-Cre^{+/-}$, bottom) in Nx (left), Hx2 (middle), and Hx3 (right). Scale bars=20 μ m. **D** and **E**, Scatter dot plots for the quantification of the capillary area (**D**) and density (**E**, number of capillaries per tissue area $\times 10^5$) of controls (WT) and $Hif2$ mutants (KO) in Nx (gray), Hx2 (pink), or Hx3 (blue). (Continued)

(Figure 7F) hypertrophy returned to normoxia values in the *Hif2/Wt1* cKO mutant mice after 1-week reoxygenation. Furthermore, lung ultrasound revealed restoration of the pulmonary structure on *Hif2/Wt1* cKO mutants after reoxygenation (Figure 7G), with normalization of the pleural thickness and abnormal B/Z band pattern observed after 3 weeks of chronic hypoxia (Figure 3C). The lung ultrasound analysis was further validated by classical histology showing almost complete rescue (Figure 7H) of the pulmonary congestion developed by *Hif2/Wt1* cKO mice after 3 weeks of sustained hypoxia (Figure 3D through 3F).

Nevertheless, despite of these structural improvements on the heart of *Hif2/Wt1* cKO mice upon 1-week reoxygenation after 2 and 3 weeks of hypoxia, the functional parameters were not fully recovered and the *Hif2/Wt1* mutants still displayed reduced LV ejection fraction (Figure 7I), as well as elevated LV end-diastolic volume (Figure 7J), reflecting compromised systolic function and increased cardiac dilatation, respectively.

Altogether, these results demonstrate that HIF2 signaling in the *Wt1* lineage is important to maintain the correct cardiopulmonary function and structure of the microvasculature after chronic hypoxia, and that the pathological changes of mice deficient for HIF2 in *Wt1*-contributed vascular compartments are hypoxia-dependent and reversible in contact with normal oxygen tensions.

DISCUSSION

Sustained hypoxia occurring in patients with cardiorespiratory diseases and at high altitude is associated with profound vascular remodeling due to muscularization of the small arteries of the alveolar wall and proliferation of cells expressing SMA, followed by thickening of the precapillary pulmonary arteries, inflammation, and fibrosis of the large proximal pulmonary arteries, leading to arterial occlusion and elevation of the RVSP.⁵⁴ It has been demonstrated that this vascular remodeling and cardiac overload also occurs in rodents, allowing the use of experimental animals exposed to low oxygen as a reliable model to study PH and cardiovascular alterations during chronic hypoxia. Endothelial HIF2 signaling has been extensively implicated in the progression of arterial remodeling, leading to elevated RVSP during sustained

hypoxia,^{17–19,22} while deletion of HIF2 in SMCs or PCs does not prevent vascular muscularization.^{22,23}

In this study, we characterized a novel mouse model, *Hif2/Wt1* cKO mice, to evaluate the impact of lacking HIF2 signaling during chronic hypoxia in several vascular cell types of the cardiopulmonary system, including ECs, PCs, VSMCs, and FBs (Figure 1G through 1M). This lineage contribution allows us to investigate the consequences of simultaneously deleting HIF2 in pulmonary and cardiac vascular cell populations, which could serve as an indicator of the potential effects of systemic HIF2 abrogation with small molecules recently proposed as alternative therapeutic approaches for PH.^{24,25} Furthermore, we performed detailed functional and structural characterizations of this new mouse model to better understand the relevance of vascular HIF2 signaling during the cardiovascular response to chronic hypoxia, which to the date remained elusive. We demonstrated that HIF2 signaling in the *Wt1* lineage is not necessary for proper development of the heart or lungs, or for organ homeostasis of adult mice (Figure S2). Furthermore, in agreement with former works, we also observed that elimination of HIF2 in the pulmonary vasculature prevents arterial muscularization and elevation of RV overload (Figure 2). However, the lack of HIF2 in the *Wt1* lineage compromises the proper adaptation of the heart and lungs to chronic hypoxia, resulting in microvascular remodeling and dysfunction of both organs. In the lungs, we observed severe hemorrhages, inflammation, and congestion that might be caused by an increased venous return associated with reduced LV ejection fraction and increased LV dilatation (Figure 5), as well as by local microvascular instability (Figures 3 and 4). In the heart, despite the absence of a hemorrhagic phenotype, mutant mice display cardiomegaly, ventricular hypertrophy without significant changes in the cardiomyocyte area, and cardiac failure (Figure 4), most likely due to EC dysfunction associated with capillary dilation (Figure 5). Interestingly, most of these structural defects are restored upon reoxygenation of hypoxia-exposed *Hif2/Wt1* cKO mice, suggesting the existence of inhibitory protective roles mediated by HIF2 signaling in the cardiopulmonary vasculature that only operates in hypoxia (Figure 7). Based on these results, we proposed a working model highlighting the importance of vascular HIF2 signaling for proper

Figure 6 Continued. **F** through **M**, FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) analysis with Rosa-tdTomato/*Wt1* reporter control (WT) and Rosa-tdTomato/*Hif2* reporter cKO (KO) mice in Nx and after Hx2. **F**, **H**, and **K**, Scatter dot plots showing Tomato⁻ (blue) and Tomato⁺ (red) total cardiac cells (**F**), ECs (**H**), and PCs (pericytes; **K**) per gram (gr) of tissue. **G**, **I**, **J**, **L**, and **M**, Representative FACS pseudocolor plots of control (Tomato^{fllox/fllox}/*Wt1*^{+/-}) and mutant (Tomato^{fllox/fllox}/*Hif2*^{fllox/fllox}/*Wt1*^{+/-}) mice. All gates were generated from a fixed number of 34 000 CD (cluster of differentiation) 45⁻ cells. **G**, Total CD45⁻ cells separating Tomato⁻ cells (blue gate) and Tomato⁺ cells (red gate). Tomato⁻ ECs (purple gates, **I**) and Tomato⁺ ECs (purple gates, **J**) or Tomato⁻ PCs (yellow gates, **L**) and Tomato⁺ PCs (yellow gates, **M**). For all scatter plots, individual values for females (triangles) and males (circles) are shown, and the black line represents the mean±SEM. The total distribution of mice sex was as follows: (**B**) n=14 females and n=14 males, (**D** and **E**) n=8 females and n=10 males, and (**F**, **H**, and **K**) n=21 females and n=18 males. Statistical significance was determined using a 1-way ANOVA multiple comparisons test with Tukey correction. Significant *P* values >0.001 are explicitly indicated, while *P* values <0.001 state as *P*<0.001. Nonsignificant (*P*>0.05) *P* values are not shown. BV421 indicates brilliant violet 421; BV510, brilliant violet 510; BV605, brilliant violet 605; and SSC-A, side scatter-area.

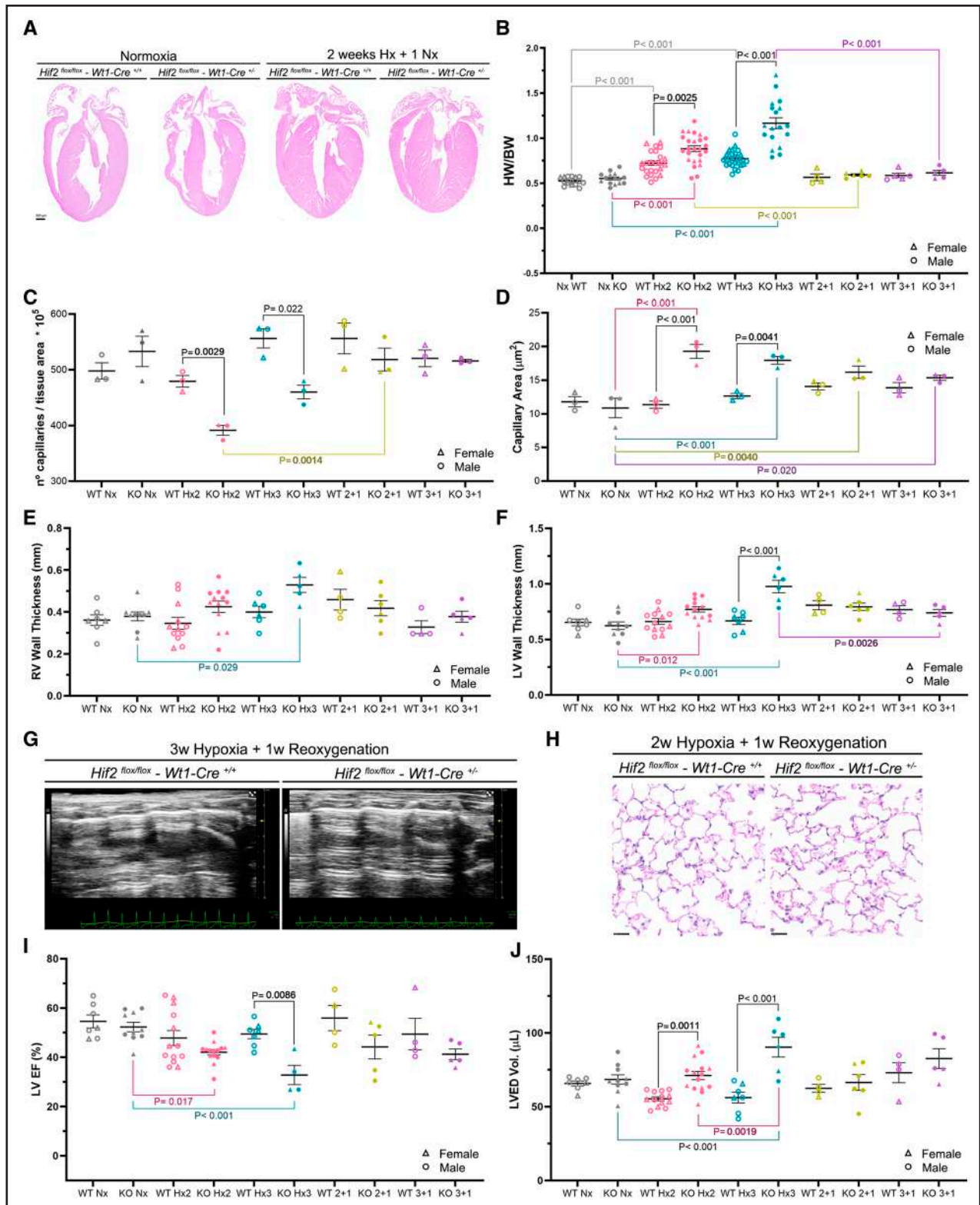


Figure 7. Partial rescue of chronic hypoxia-induced cardiac and pulmonary defects upon reoxygenation.

A, Histological analysis by hematoxylin and eosin (HE) staining of representative heart sections of control (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/+}*, left panel of each experimental condition) and *Hif2/Wt1* cKO, (conditional knockout) mice (*Hif2^{flox/flox}-Wt1-Cre^{+/-}*, right panel of each experimental condition) in normoxia (Nx; left columns) and 2 weeks of hypoxia followed by 1-week reoxygenation (2 weeks of Hx [Hx2]+1 week of Nx, right columns). Scale bar=500 µm. **B**, Quantification of the heart size estimation represented as heart weight/body weight ratio (HW/BW) in control (WT [wild-type]) and *Hif2/Wt1* cKO (conditional knockout) (KO [knockout]) mice in Nx (gray), Hx2 (pink) or 3 weeks of hypoxia (Hx3; blue), and Hx2 or Hx3 followed by 1-week reoxygenation (2+1 [yellow] and 3+1 [purple], respectively). **C** and **D**, Scatter dot plot of density (**C**) and capillary area (**D**) in control (WT) and *Hif2/Wt1* cKO (KO) mice in Nx (gray), Hx2 (pink), or Hx3 (blue), and Hx2 or Hx3 followed by 1-week (Continued)

capillary stability and organ performance during cardiac and pulmonary adaptation to chronic hypoxia (Figure 8).

HIF2 global deletion protects against RVSP elevation in response to low oxygen,⁵⁵ and later works demonstrated the critical role of EC-HIF2 signaling mediating the vascular remodeling that leads to elevation of RVSP during chronic hypoxia and in PH.^{17–19} However, little is known about the role of HIF2 in other cell types within the vascular compartment beyond the endothelium. It has been reported that elimination of HIF2 in SMCs does not prevent RVSP elevation during chronic hypoxia.²² A recent publication by Kim et al²³ has reported novel mouse models of HIF2 overexpression and deletion in PCs using NG2-CreERT2. Interestingly, while overexpression of HIF2 in PCs leads to elevation of arterial muscularization and increased RVSP after 3 weeks of hypoxia exposure, pointing to an important role of HIF2 signaling from PC mural cells in arterial vascularization, elimination of HIF2 in PCs does not prevent the elevation of RVSP during chronic hypoxia.²³ These results contrast with our findings, showing that the novel *Hif2/Wt1* cKO mice generated in our laboratory are protected against arterial remodeling and elevation of RVSP after hypoxia (Figure 2). Since *Wt1* contributes to ECs, PCs, as well as SMCs and fibroblast-like cells of the lung vasculature (Figure 1), one explanation to these contrasting results could be that the protection of *Hif2/Wt1* cKO mice against vascular remodeling in hypoxia was only due to the ablation of HIF2 signaling in the endothelium, which would fully agree with former works.^{17–19} Another possibility could be that HIF2 signaling in fibroblast-like cells of the alveolar parenchyma contributed by *Wt1* also participates in the arterIALIZATION upon hypoxia. Nevertheless, *Wt1* contributes to <4% of the total pulmonary FBs (Table S2), and clarifying the precise function of HIF2 in this cell type using alternative mouse models is out of the scope of this article.

Despite the protection against arteriolar remodeling, the *Hif2/Wt1* cKO mice characterized here displayed profound damage of the lung parenchyma after 3 weeks of hypoxia, with reduced alveolar space, inflammation, and hemorrhages, likely due to unstable capillaries and increased remodeling of alveolar microvasculature

(Figure 3). These pulmonary tissue alterations have not been reported to the best of our knowledge in the EC-specific models of HIF2 deletion. However, Kim et al²³ have recently reported that the overexpression of HIF2 in PCs induces vascular leakage and disruption of capillary integrity, while the PC-HIF2 KO shows no difference in permeability compared with controls. Taking these results into account, and considering that *Hif2/Wt1* cKO mice developed significant vascular leakage, alveolar hemorrhages, and pulmonary congestion (Figure 3), together with increased EC proliferation, our results suggest that only simultaneous deletion of HIF2 in SMCs/PCs and ECs lead to alveolar vascular defects and lung edema. Alternatively, we cannot rule out that HIF2 deletion in a fibroblast-like interstitial cell type within the alveoli contributed by *Wt1* could be responsible for the EC barrier dysfunction observed in our mutants.

While significant works have evaluated the relevance of HIF2 during the adaptation to sustained hypoxia in the lungs, little is known about HIF2 signaling in the heart in response to chronic low oxygen. In the setting of PH, Smith et al⁵⁶ explored the possibility that RV hypertrophy after chronic hypoxia might be due not only to the increased load of the right side of the heart upon pulmonary arterial remodeling, but also to pulmonary-independent factors acting directly on the heart that could lead to the activation of HIFs. Indeed, Smith et al⁵⁶ demonstrated that both HIF1 and HIF2 signaling on cardiomyocytes is involved in RV hypertrophy during chronic hypoxia. In the *Hif2/Wt1* cKO mutants described here, we also demonstrated direct cardiac alterations most likely independent of the pulmonary defects occurring during chronic hypoxia. This statement is supported by the fact that *Hif2/Wt1* cKO mice developed not only RV but also LV hypertrophy, LV systolic dysfunction based on the reduced LV ejection fraction, and LV dilation (Figure 4). Moreover, considering that *Wt1* contributes to capillaries of both RV and LV (Figure 1) and that we did not observe significant differences between *Hif2/Wt1* cKO and control cardiomyocyte area in hypoxia (Figure 4), we hypothesize that the increased RV and LV wall thickness and cardiomegaly observed in the absence of HIF2 might be due to the profound microvascular remodeling and capillary dilation

Figure 7 Continued. reoxygenation (2+1 [yellow] and 3+1 [purple], respectively). **E** and **F**, Quantification of echocardiography analysis to assess cardiac hypertrophy by RV (right ventricular; **E**) and LV (left ventricular; **F**) wall thickness of control (WT) and *Hif2/Wt1* cKO (KO) mice in Nx (gray), Hx2 (pink), or Hx3 (blue), and Hx2 or Hx3 followed by 1-week reoxygenation (2+1 [yellow] and 3+1 [purple], respectively). **G**, Representative images of pulmonary ultrasound in control (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/+}*, **left**) and *Hif2/Wt1* cKO mice (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, **right**) after Hx3 followed by 1-week reoxygenation. **H**, Histological analysis by HE of representative lung sections in control (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/+}*, **left**) and *Hif2/Wt1* cKO mice (*Hif2^{fllox/fllox}-Wt1-Cre^{+/-}*, **right**) after Hx2 and 1-week reoxygenation. Scale bars=25 μ m. **I** and **J**, Functional and structural cardiac parameters assessed by echocardiography of control (WT) and *Hif2/Wt1* cKO (KO) mice in Nx (gray), Hx2 (pink), or Hx3 (blue), and Hx2 or Hx3 followed by 1-week reoxygenation (2+1 [yellow] and 3+1 [purple], respectively). Left ventricular ejection fraction (LVEF; **I**) and left ventricular end-diastolic volume (LVED vol; **J**). For all scatter plots, individual values for females (triangles) and males (circles) are shown, and the black line represents the mean \pm SEM. The total distribution of mice sex was as follows: (**B**) n=58 females and n=83 males, (**C** and **D**) n=13 females and n=17 males, (**E**) n=27 females and n=44 males, (**F**) n=26 females and n=48 males, (**I**) n=27 females and n=46 males, and (**J**) n=26 females and n=48 males. Statistical significance was determined using a 1-way ANOVA multiple comparisons test with Tukey correction. Significant *P* values >0.001 are explicitly indicated, while *P* values <0.001 state as *P*<0.001. Nonsignificant (*P*>0.05) *P* values are not shown.

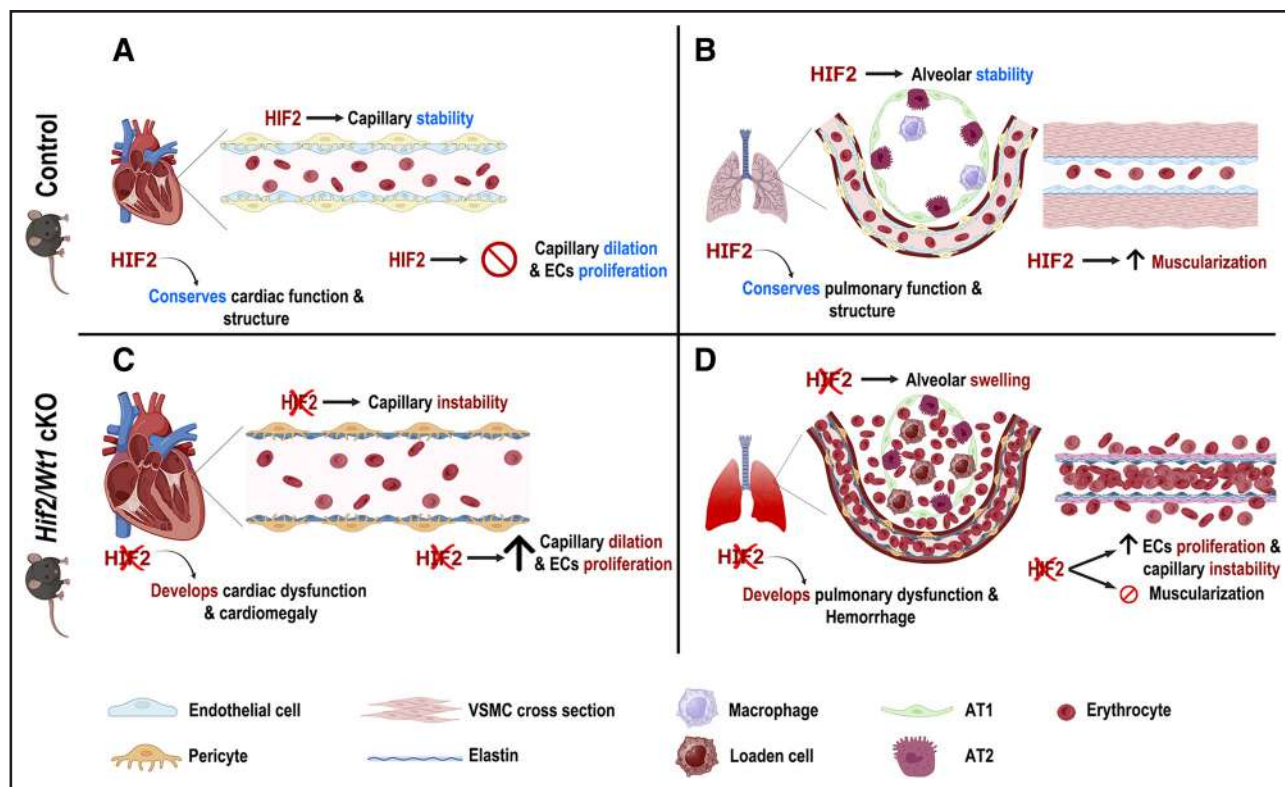


Figure 8. Working model.

Proposed model of cardiopulmonary defects in control and *Hif2/Wt1* cKO (conditional knockout) mice after 3 weeks of chronic hypoxia. Control mice after 3 weeks of hypoxia exposure are protected against cardiomegaly, dilation of capillaries, and increased proliferation of endothelial cells (ECs; **A**), while *Hif2/Wt1* cKO mice develop cardiomegaly associated with capillary dilation and EC proliferation (**C**). Control mice lungs display normal alveolar parenchyma as wild-type HIF2 (hypoxia inducible factor 2) prevents microvascular proliferation, but show HIF2-mediated muscularization of the distal arterioles and increased right ventricular systolic pressure (RVSP; **B**). In contrast, *Hif2/Wt1* cKO mice are protected against arterial muscularization but present several structural lung defects, including erythrocytes and macrophages congestion, hemorrhages, and alveolar wall thickening, probably associated to alveolar capillary remodeling and proliferation (**D**). Altogether, these results suggest that HIF2 plays an inhibitory role upon cardiac and pulmonary ECs, pericytes (PCs), and vascular smooth muscle cells (VSMCs) that prevents excessive microvascular remodeling and organ dysfunction in response to chronic hypoxia. AT1 indicates alveolar type I; and AT2, alveolar type II.

observed in these mutants (Figure 4). Interestingly, the recently reported HIF2/NG2 KO model does not exhibit ventricular hypertrophy, fibrosis, or cardiac dysfunction in response to chronic hypoxia,²³ suggesting that the vascular alterations developed by the *Hif2/Wt1* cKO mice might be due to the lack of functional HIF2 signaling in microvascular endothelium rather than in cardiac PCs during low oxygen exposure. It is important to mention that in contrast with the cardiomyocyte-specific HIF2 mutant,⁵⁶ the *Hif2/Wt1* cKO mice described here developed systolic dysfunction (Figure 4), while both mutants undergo ventricular dilation. These results highlight the importance of functional HIF2 signaling in the vascular compartment of the heart to ensure proper functional adaptation to sustained hypoxia. Hence, our data further contribute to increase our limited understanding on the cardiac intrinsic response to hypoxia independently of pulmonary remodeling.

Several studies have demonstrated the role of endothelial HIF2 in the vascular remodeling of pulmonary arteries within the pathogenesis of PH,^{17–19} and recent therapeutic targeting of HIF2 with small molecule

inhibitors, such as PT-2567, has shown a beneficial effect preventing the initiation of PH in rat models.^{24,25} Nevertheless, the detailed consequences of prolonged systemic inhibition of HIF2 signaling in other organs essential for physiological homeostasis, like the heart, remain elusive and have not been reported in detail in previous works. In this study, the use of a genetic approach that allows the simultaneous deletion of HIF2 in several cell types of the vasculature, like ECs and SMCs, as well as PCs and FBs, offered us the advantage of evaluating a plethora of cells involved in PH progression and exploring potential effects associated with the systemic abrogation of HIF2 in the heart and lungs. Even though the relative inhibition of HIF2 signaling using PT-2567 in rat models of PH could prevent pulmonary vascular remodeling, as well as circulating proinflammatory factors and plasma nitrite levels,^{24,25} it is important to mention that our mouse model also displayed a decrease on RVSP and reduced pulmonary remodeling. Despite these clear beneficial effects of lacking HIF2 to prevent the initiation of PH, the whole impact of losing HIF2 signaling during the adaptation to chronic hypoxia has not been previously

addressed in mouse models. In fact, our results show that concomitant elimination of HIF2 in several vascular cell types involved in PH disease leads to structural and functional abnormalities in both heart and lungs, including pulmonary inflammation, hemorrhages, erythroid extravasation, and alveolar congestion, as well as cardiomegaly, ventricular hypertrophy, and systolic dysfunction associated with capillary remodeling and dilation under low oxygen conditions.

Therefore, our data describe novel cardiac and pulmonary phenotypic characteristics of HIF2 abrogation and uncover unknown protective roles of HIF2 signaling in the microvasculature of the heart and lungs, suggesting that HIF2 is essential to avoid excessive EC proliferation, ensuring stable microvascular networks in both organs during sustained exposure to hypoxia. These observations were not anticipated based on the protection of the *Hif2/Wt1* cKO mice against pulmonary arterial remodeling and elevation of RVSP, but are in line with former studies reporting that despite the reduced vascular remodeling, global genetic deletion of HIF2 α or systemic inhibition using antisense oligos impairs survival upon 4 weeks of hypoxia exposure,²⁴ leading to weight loss and reduced catecholamine levels, heart rate, and cardiac output, probably reflecting the critical importance of HIF2 in organs like the carotid body to ensure proper hypoxia adaptation.

Hence, based on the heterogeneous and diverse relevance of HIF2 depending on the cellular/organ context, further studies will be required to better characterize the global consequences of systemic inhibition of HIF2 to define novel alternative therapeutic strategies able to blunt HIF2 detrimental effects without precluding its beneficial role in other cell types or tissues. In that regard, the design of endothelial-specific delivery vectors to limit the action of HIF2 inhibitors to this cell type, which is clearly involved in the initiation of PH,^{17–19,24,25} would contribute to minimize deleterious effects in nonendothelial compartments. Our work contributes to expand our limited knowledge on the role of vascular HIF2 signaling in the cardiovascular system and might be relevant to evaluate potential long-term effects in the setting of HIF2-specific inhibitory therapies recently approved for renal clear cell carcinoma⁵⁷ and proposed for PH,^{24,25} especially in patients with lung conditions who might experience chronic hypoxia.

ARTICLE INFORMATION

Received August 29, 2024; accepted January 2, 2025.

Affiliations

Metabolic and Immune Diseases Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas Sols-Morreale (IIBM), CSIC-UAM, Madrid, Spain (T.A.-G., S.M.-T., R.C.-M., S.U.-B., S.M.-P.). Cardiovascular Regeneration Program, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Carlos III (CNIC), Madrid, Spain (T.A.-G., S.M.-T., B.E., S.F.R., J.A.N.-A., E.O., M.V.-O., S.M.-P.). School of Medicine, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Spain (T.A.-G., S.M.-P.). Mouse Genome

Editing Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain (B.E.). Cardiovascular Research Institute & Department of Microbiology and Immunology, University of California San Francisco (J.A.N.-A.). Biomedicine Department, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB), Madrid, Spain (E.O.). Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares, Spain (E.O.). Department of Animal Medicine and Surgery, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain (M.V.-O.). Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias, Spain (S.M.-P.).

Acknowledgments

The authors thank Jose Luis de La Pompa for the *Wt1-Cre* mouse line. They acknowledge Virginia García, Eva Garrido, Raquel Álvarez, and Mercedes de la Cueva for animal housing and handling, Antonio de Molina for histopathologic analysis, Elena Prieto for assistance on FACS (Fluorescence-activated cell sorting) analysis and sorting, and CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares) Microscopy and Dynamic Imaging (ICTS-ReDib, Infraestructuras Científico-Tecnológicas Singulares-Red Distribuida de Imagen Biomédica, co-founded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033), CellomicsCore Facility, and Histology Core Facility for technical assistance. They thank Mónica M.-Belinchón and Barbara Acosta Iborra of Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del IIBM (Instituto de Investigaciones Biomédicas Sols-Morreale) for microscopy assistance and Diana Muñoz for technical support. T. Albendea-Gomez performed most of the experiments, analyzed data, made the figures, and helped to write the manuscript. M. Villalba-Orero performed echocardiography and lung ultrasound analysis and discussed the manuscript. J.A. Nicolas-Avila contributed to FACS analysis and gating strategy and discussed the manuscript. S.F. Rocha and E. Oliver performed right ventricular systolic pressure measurements and E. Oliver discussed the manuscript. S. Mendoza-Tamajon, B. Escobar, R. Castro-Mecinas, and S. Urrea-Balduz supported the experiments. S. Martin-Puig defined the concept, planned and supervised experiments, analyzed data, wrote the manuscript, designed the figures together with T. Albendea-Gomez, and obtained funding to support the study. The authors declare that no artificial intelligence (AI) or AI-assisted technologies were applied to generate this article.

Sources of Funding

This project has been supported by grants to S. Martin-Puig (SMP) from Universidad Francisco de Vitoria (UFV), LeDucq Foundation: 17CVD04, the Spanish Ministry of Science and Innovation (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, MICIU): PID2020-117629RB-I00/AEI/10.13039/501100011033, Comunidad de Madrid (CM): S2022/BMD-7245 (CARDIOBOOST-CM), and Fundación Domingo Martínez: "Ayuda de Biomedicina 2023." T. Albendea-Gomez was supported by a predoctoral award granted by CM/EU (European Union) and UFV: PEJD-2018-PRE/SAL-9529 and SMP project PID2020-117629RB-I00/AEI/10.13039/501100011033. S. Mendoza-Tamajon was funded by a predoctoral contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation and European Regional Development Fund: PRE-2021-099445. R. Castro-Mecinas was funded by a contract from CM: PEJ-2021-AI/BMD-21926. B. Escobar was supported by SMP project 17CVD04. S. Urrea-Balduz was funded by SMP project S2022/BMD-7245. J.A. Nicolas-Avila was supported by the University of California San Francisco (UCSF) Cardiovascular Research Institute department, the UCSF Dean's office program, and the Young Investigator Competitive Award from the International Society for Heart Research. M. Villalba-Orero was funded by a Juan de la Cierva Incorporación Grant (JCI-2016-27698). E. Oliver received funding from MICIU PID2021-123167OB-I00. E. Oliver and S. Martin-Puig were supported by the Spanish National Research Council (CSIC).

Disclosures

None.

Supplemental Material

Supplemental Methods
Tables S1–S4
Figures S1–S5
Major Resources Tables

REFERENCES

- Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:285–296. doi: 10.1038/nrm2354
- Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008;30:393–402. doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.009

3. Majmudar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40:294–309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022
4. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49:1–15. doi: 10.3109/10409238.2013.838205
5. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci*. 2012;37:364–372. doi: 10.1016/j.tibs.2012.06.004
6. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23:9361–9374. doi: 10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003
7. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard RJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*. 2009;284:16767–16775. doi: 10.1074/jbc.M901790200
8. Knutson AK, Williams AL, Boisvert WA, Shohet RV. HIF in the heart: development, metabolism, ischemia, and atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2021;131:e137557. doi: 10.1172/JCI137557
9. Krishnan J, Ahuja P, Bodenmann S, Knapik D, Perriard E, Krek W, Perriard J-C. Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function. Research support, non-U.S. gov't. *Circ Res*. 2008;103:1139–1146. doi: 10.1161/01.RES.0000338613.89841.c1
10. Guimaraes-Camboa N, Stowe J, Aneas I, Sakabe N, Cattaneo P, Henderson L, Kilberg MS, Johnson RS, Chen J, McCulloch AD, et al. HIF1alpha represses cell stress pathways to allow proliferation of hypoxic fetal cardiomyocytes. *Dev Cell*. 2015;33:507–521. doi: 10.1016/j.devcel.2015.04.021
11. Menendez-Montes I, Escobar B, Gomez MJ, Albendea-Gomez T, Palacios B, Bonzon-Kulichenko E, Izquierdo-Garcia JL, Alonso AV, Ferrarini A, Jimenez-Borreguero LJ, et al. Activation of amino acid metabolic program in cardiac HIF1-alpha-deficient mice. *iScience*. 2021;24:102124. doi: 10.1016/j.isci.2021.102124
12. Menendez-Montes I, Escobar B, Palacios B, Gómez MJ, Izquierdo-García JL, Flores L, Jiménez-Borreguero LJ, Aragonés J, Ruiz-Cabello J, Torres M, et al. Myocardial VHL-HIF signaling controls an embryonic metabolic switch essential for cardiac maturation. *Dev Cell*. 2016;39:724–739. doi: 10.1016/j.devcel.2016.11.012
13. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev*. 1998;12:3320–3324. doi: 10.1101/gad.12.21.3320
14. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan L-J, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet*. 2003;35:331–340. doi: 10.1038/ng1266
15. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8386–8391. doi: 10.1073/pnas.140087397
16. Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:152–156. doi: 10.1164/rccm.201009-1393PP
17. Kapitsinou PP, Rajendran G, Astleford L, Michael M, Schonfeld MP, Fields T, Shay S, French JL, West J, Haase VH. The endothelial prolyl-4-hydroxylase domain 2/hypoxia-inducible factor 2 axis regulates pulmonary artery pressure in mice. *Mol Cell Biol*. 2016;36:1584–1594. doi: 10.1128/MCB.01055-15
18. Dai Z, Li M, Wharton J, Zhu MM, Zhao YY. Prolyl-4 hydroxylase 2 (PHD2) deficiency in endothelial cells and hematopoietic cells induces obliterative vascular remodeling and severe pulmonary arterial hypertension in mice and humans through hypoxia-inducible factor-2alpha. *Circulation*. 2016;133:2447–2458. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021494
19. Cowburn AS, Crosby A, Macias D, Branco C, Colaco RDDR, Southwood M, Toshner M, Crotty Alexander LE, Morrell NW, Chilvers ER, et al. HIF2alpha-arginase axis is essential for the development of pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:8801–8806. doi: 10.1073/pnas.1602978113
20. Kurakula K, Smolders V, Tura-Ceide O, Jukema JW, Quax PHA, Goumans MJ. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension: cause or consequence? *Biomedicines*. 2021;9:57. doi: 10.3390/biomedicines9010057
21. Sheikh AQ, Saddouk FZ, Ntokou A, Mazurek R, Greif DM. Cell autonomous and non-cell autonomous regulation of SMC progenitors in pulmonary hypertension. *Cell Rep*. 2018;23:1152–1165. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.043
22. Tang H, Babicheva A, McDermott KM, Gu Y, Ayon RJ, Song S, Wang Z, Gupta A, Zhou T, Sun X, et al. Endothelial HIF-2alpha contributes to severe pulmonary hypertension due to endothelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018;314:L256–L275. doi: 10.1152/ajplung.00096.2017
23. Kim H, Liu Y, Kim J, Kim Y, Klouda T, Fisch S, Baek SH, Liu T, Dahlberg S, Hu CJ, et al. Pericytes contribute to pulmonary vascular remodeling via HIF2alpha signaling. *EMBO Rep*. 2024;25:616–645. doi: 10.1038/s44319-023-00054-w
24. Macias D, Moore S, Crosby A, Southwood M, Du X, Tan H, Xie S, Vassallo A, Wood AJT, Wallace EM, et al. Targeting HIF2alpha-ARNT heterodimerisation as a novel therapeutic strategy for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2021;57:1902061. doi: 10.1183/13993003.02061-2019
25. Hu CJ, Poth JM, Zhang H, Flockton A, Laux A, Kumar S, McKeon B, Mouradian G, Li M, Riddle S, et al. Suppression of HIF2 signalling attenuates the initiation of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2019;54:1900378. doi: 10.1183/13993003.00378-2019
26. Walker AM, Langleben D, Korelitz JJ, Rich S, Rubin LJ, Strom BL, Gonin R, Keast S, Badesch D, Barst RJ, et al. Temporal trends and drug exposures in pulmonary hypertension: an American experience. *Am Heart J*. 2006;152:521–526. doi: 10.1016/j.jahj.2006.02.020
27. Mair KM, Johansen AK, Wright AF, Wallace E, MacLean MR. Pulmonary arterial hypertension: basis of sex differences in incidence and treatment response. *Br J Pharmacol*. 2014;171:567–579. doi: 10.1111/bph.12281
28. Rabinovitch M, Gamble WJ, Miettinen OS, Reid L. Age and sex influence on pulmonary hypertension of chronic hypoxia and on recovery. *Am J Physiol*. 1981;240:H62–H72. doi: 10.1152/ajpheart.1981.240.1.H62
29. White K, Johansen AK, Nielsen M, Ciucian L, Wallace E, Paton L, Campbell A, Morecroft I, Loughlin L, McClure JD, et al. Activity of the estrogen-metabolizing enzyme cytochrome P450 1B1 influences the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2012;126:1087–1098. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.062927
30. Lahm T, Albrecht M, Fisher AJ, Selej M, Patel NG, Brown JA, Justice MJ, Brown MB, Van Demark M, Trulock KM, et al. 17β-estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension via estrogen receptor-mediated effects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:965–980. doi: 10.1164/rccm.201107-1293OC
31. Nadadur RD, Umar S, Wong G, Eghbali M, Iorga A, Matori H, Partow-Navid R, Eghbali M. Reverse right ventricular structural and extracellular matrix remodeling by estrogen in severe pulmonary hypertension. *J Appl Physiol (1985)*. 2012;113:149–158. doi: 10.1152/jappphysiol.01349.2011
32. Wilm B, Munoz-Chapuli R. The role of WT1 in embryonic development and normal organ homeostasis. *Methods Mol Biol*. 2016;1467:23–39. doi: 10.1007/978-1-4939-4023-3_3
33. Munoz-Chapuli R, Macias D, Gonzalez-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Perez-Pomares JM. [The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development]. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55:1070–1082. doi: 10.1016/s0300-8932(02)76758-4
34. Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, Hall E, Reichmann J, Devenney PS, Hohenstein P, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet*. 2010;42:89–93. doi: 10.1038/ng.494
35. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D, von Gise A, Ikeda S, Chien KR, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008;454:109–113. doi: 10.1038/nature07060
36. Wagner N, Ninkov M, Vukolic A, Deniz GC, Rassoulzadegan M, Michiels JF, Wagner KD. Implications of the Wilms' tumor suppressor wt1 in cardiomyocyte differentiation. *Int J Mol Sci*. 2021;22:4346. doi: 10.3390/ijms22094346
37. Diaz Del Moral S, Barrena S, Hernandez-Torres F, Aránega A, Villaescusa JM, GómezDoblas JJ, Franco D, Jiménez-Navarro M, Muñoz-Chápuli R, Carmona R. Deletion of the Wilms' tumor suppressor gene in the cardiac troponin-t lineage reveals novel functions of WT1 in heart development. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:683861. doi: 10.3389/fcell.2021.683861
38. Duim SN, Goumans MJ, Kruijthof BPT. WT1 in cardiac development and disease. In: van den Heuvel-Eibrink MM, ed. *Wilms Tumor*. 2016.
39. Cano E, Carmona R, Munoz-Chapuli R. Wt1-expressing progenitors contribute to multiple tissues in the developing lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305:L322–L332. doi: 10.1152/ajplung.00424.2012
40. del Monte G, Casanova JC, Guadix JA, MacGrogan D, Burch JBE, Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res*. 2011;108:824–836. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.229062

41. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute post-natal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:2301–2306. doi: 10.1073/pnas.0608382104
42. Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development*. 2008;135:145–157. doi: 10.1242/dev.004895
43. Villalba-Orero M, Lopez-Olaneta MM, Gonzalez-Lopez E, Padrón-Barthe L, Gómez-Salineró JM, García-Prieto J, Wai T, García-Pavía P, Ibáñez B, Jiménez-Borreguero LJ, et al. Lung ultrasound as a translational approach for non-invasive assessment of heart failure with reduced or preserved ejection fraction in mice. *Cardiovasc Res*. 2017;113:1113–1123. doi: 10.1093/cvr/cvx090
44. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
45. Skelly DA, Squiers GT, McLellan MA, Bolisetty MT, Robson P, Rosenthal NA, Pinto AR. Single-cell transcriptional profiling reveals cellular diversity and intercommunication in the mouse heart. *Cell Rep*. 2018;22:600–610. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.072
46. Stellato M, Czepiel M, Distler O, Blyszczuk P, Kania G. Identification and isolation of cardiac fibroblasts from the adult mouse heart using two-color flow cytometry. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:105. doi: 10.3389/fcvm.2019.00105
47. Ugorski M, Dziegiel P, Suchanski J. Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. *Am J Cancer Res*. 2016;6:370–386.
48. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, Chang S, Conley SD, Mori Y, Seita J, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature*. 2020;587:619–625. doi: 10.1038/s41586-020-2922-4
49. Zhou B, Pu WT. Genetic Cre-loxP assessment of epicardial cell fate using Wt1-driven Cre alleles. *Circ Res*. 2012;111:e276–e280. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.275784
50. Horie M, Castaldi A, Sunohara M, Wang H, Ji Y, Liu Y, Li F, Wilkinson TA, Hung L, Shen H, et al. Integrated single-cell RNA-sequencing analysis of aquaporin 5-expressing mouse lung epithelial cells identifies GPRC5A as a novel validated type I cell surface marker. *Cells*. 2020;9:2460. doi: 10.3390/cells9112460
51. Lin C, Song H, Huang C, Yao E, Gacayan R, Xu SM, Chuang PT. Alveolar type II cells possess the capability of initiating lung tumor development. *PLoS One*. 2012;7:e53817. doi: 10.1371/journal.pone.0053817
52. Sorokin SP, Hoyt RF, Jr. Macrophage development: I. Rationale for using *Griffonia simplicifolia* isolectin B4 as a marker for the line. *Anat Rec*. 1992;232:520–526. doi: 10.1002/ar.1092320409
53. Sheikh AQ, Misra A, Rosas IO, Adams RH, Greif DM. Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*. 2015;7:308ra–30159. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa9712
54. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297:L1013–L1032. doi: 10.1152/ajplung.00217.2009
55. Brusselmans K, Compennolle V, Tjwa M, Wiesener MS, Maxwell PH, Collen D, Carmeliet P. Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest*. 2003;111:1519–1527. doi: 10.1172/JCI15496
56. Smith KA, Waypa GB, Dudley VJ, Budinger GRS, Abdala-Valencia H, Bartom E, Schumacker PT. Role of hypoxia-inducible factors in regulating right ventricular function and remodeling during chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020;63:652–664. doi: 10.1165/rcmb.2020-00230C
57. Choi WSW, Boland J, Lin J. Hypoxia-inducible factor-2alpha as a novel target in renal cell carcinoma. *J Kidney Cancer VHL*. 2021;8:1–7. doi: 10.15586/jkcvhl.v8i1.170

Article

Activation of amino acid metabolic program in cardiac HIF1- α -deficient mice

Ivan Menendez-Montes,^{1,2} Beatriz Escobar,¹ Manuel J. Gomez,³ Teresa Albendea-Gomez,^{1,4} Beatriz Palacios,¹ Elena Bonzon-Kulichenko,⁵ Jose Luis Izquierdo-Garcia,^{6,7,8} Ana Vanessa Alonso,⁹ Alessia Ferrarini,⁵ Luis Jesus Jimenez-Borreguero,^{9,10} Jesus Ruiz-Cabello,^{6,7,8,11} Jesus Vázquez,^{5,12} and Silvia Martin-Puig^{1,4,13,*}

SUMMARY

HIF1- α expression defines metabolic compartments in the developing heart, promoting glycolytic program in the compact myocardium and mitochondrial enrichment in the trabeculae. Nonetheless, its role in cardiogenesis is debated. To assess the importance of HIF1- α during heart development and the influence of glycolysis in ventricular chamber formation, herein we generated conditional knockout models of *Hif1a* in *Nkx2.5* cardiac progenitors and cardiomyocytes. Deletion of *Hif1a* impairs embryonic glycolysis without influencing cardiomyocyte proliferation and results in increased mitochondrial number and transient activation of amino acid catabolism together with HIF2 α and ATF4 up-regulation by E12.5. *Hif1a* mutants display normal fatty acid oxidation program and do not show cardiac dysfunction in the adulthood. Our results demonstrate that cardiac HIF1 signaling and glycolysis are dispensable for mouse heart development and reveal the metabolic flexibility of the embryonic myocardium to consume amino acids, raising the potential use of alternative metabolic substrates as therapeutic interventions during ischemic events.

INTRODUCTION

The heart is the first organ to form *in utero*, and it is essential to deliver oxygen and nutrients to embryonic tissues from early stages of development. Different subsets of cardiac progenitors proliferate, migrate, and differentiate into the diverse cell types that form the mature heart (Martin-Puig et al., 2008; Watanabe and Buckingham, 2010). *Nkx2.5* cardiovascular progenitors give rise to the majority of cardiac cells, contributing to epicardium, myocardium, and endocardium (Moses et al., 2001). Cardiogenesis is a complex process that can result in malformations, and congenital heart defects occur in 1% of live births. Several factors have been involved in developmental cardiac failure, and among them hypoxia has been previously described as an environmental factor associated with cardiac defects during pregnancy (Cerychova and Pavlinkova, 2018; Nanka et al., 2008). Hypoxia-inducible factors (HIFs) are known to mediate a well-characterized transcriptional response to low oxygen tensions. HIF heterodimers are formed by a constitutively expressed β subunit (HIF β or ARNT) and an oxygen-regulated α subunit, with three different isoforms (1 α , 2 α , and 3 α) (Kaelin and Ratcliffe, 2008). Under normoxic conditions, the oxygen sensors prolyl hydroxylases (PHDs) hydroxylate HIF α in specific proline residues (Jiang et al., 1997). These modifications are recognized by the von Hippel-Lindau/E3 ubiquitin ligase complex, which polyubiquitinates and drives α subunits to proteasomal degradation. In hypoxic conditions, α subunits evade degradation due to the inhibited PHD activity, dimerize with β subunits, and mediate the adaptive response to hypoxia by activating the transcription of their target genes (Pouyssegur et al., 2006).

Poorly oxygenated areas appear during heart development (Lee et al., 2001) and physiological hypoxia is involved in outflow tract remodeling (Sugishita et al., 2004). However, chronic exposure of pregnant females to low oxygen causes embryonic myocardial thinning and epicardial detachment (Menendez-Montes et al., 2016; Ream et al., 2008) and excessive embryonic hypoxia also increases the vulnerability to suffer common septation and conotruncal heart defects (Kenchegowda et al., 2014). Genetic-based overactivation of HIF signaling by inactivation of *Vhl* in cardiac progenitors using different drivers (*Mlc2vCre*, *Nkx2.5Cre*) causes morphological, metabolic, and functional cardiac alterations that result in embryonic lethality (Lei et al., 2008; Menendez-Montes et al., 2016). On the other hand, *Hif1a* conditional

¹Myocardial Pathophysiology Area. National Center for Cardiovascular Research, Melchor Fernandez Almagro 3, 28029 Madrid, Spain

²Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

³Bioinformatics Unit. National Center for Cardiovascular Research. Madrid, Spain

⁴Facultad de Medicina. Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Spain

⁵Vascular Pathophysiology Area. National Center for Cardiovascular Research. Madrid, Spain

⁶Center for Cooperative Research in Biomaterials (CIC biomaGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), 20014 Donostia San Sebastián, Spain

⁷CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), 28029 Madrid, Spain

⁸Departamento de Química en Ciencias Farmaceuticas. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

⁹Advanced Imaging Unit. National Center for Cardiovascular Research. Madrid, Spain

¹⁰Cardiology Unit, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain

¹¹IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48013 Bilbao, Spain

¹²CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCIV), Madrid, Spain

¹³Lead contact

*Correspondence: silvia.martin@cnic.es, silvia.martin@ufv.es

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102124>



loss-of-function models in cardiac progenitors and cardiomyocytes also causes several embryonic cardiac alterations (Guimarães-Camboa et al., 2015; Huang et al., 2004; Krishnan et al., 2008), suggesting that a controlled balance in oxygen levels and hypoxia signaling is required for proper cardiac development. However, important phenotypic discrepancies between the different published loss-of-function models exist. On one hand, the use of cardiac-specific Mlc2vCre driver in combination with a *Hif1a* floxed mice does not affect embryonic survival but causes cardiac hypertrophy with reduced cardiac function in the adulthood, together with decreased glycolysis and ATP and lactate levels (Huang et al., 2004). On the other hand, when a null *Hif1a* allele in germline is used in combination with a *Hif1a* floxed allele and the Mlc2vCre driver, mutant embryos show several cardiac alterations and increased cardiomyocyte proliferation, with associated embryonic lethality by E12.0 (Krishnan et al., 2008). The combination of null and floxed *Hif1a* alleles under the control of Nkx2.5Cre driver provides a more homogeneous recombination than Mlc2vCre and results in the activation of cell stress pathways that inhibit cardiomyocyte proliferation and lead to myocardial thinning, resulting in embryonic lethality by E15.5 (Guimarães-Camboa et al., 2015). Considering the importance of hypoxia pathway in early hematopoiesis, placentation, and vascular development (Llurba Olive et al., 2018), the potential secondary effect of using *Hif1a*-null alleles on cardiac development cannot be ruled out when interpreting data from some of these mutants. Therefore, although it is clear that sustained HIF1 signaling in the embryonic heart is detrimental for proper cardiac development, there is still disagreement and open debate about the impact of *Hif1a* loss during cardiogenesis and subsequent effects on cardiac function.

HIF1 signaling is an important regulator of cellular metabolism in physiological and pathological contexts. In addition to glycolytic activation (Majmundar et al., 2010), HIF1 reduces mitochondrial metabolism by repressing pyruvate entry into the mitochondria (Kim et al., 2006) and by promoting COX4 isoform switch from COX4-1 to COX4-2 (Fukuda et al., 2007). Moreover, HIF1 can also limit oxidative metabolism through an inhibitory role on mitochondrial biogenesis (Zhang et al., 2007). Several *in vitro* studies have demonstrated that the embryonic heart relies on glycolysis for energy supply (Chung et al., 2010, 2011), in contrast with the adult heart that sustains most of ATP production through mitochondrial oxidation of fatty acids (FA) (Lopaschuk and Jaswal, 2010). This metabolic switch is coincident with the change in oxygen levels after birth (Puentes et al., 2014). However, a recent report from our group has shown that an earlier metabolic shift toward FA oxidation occurs during development at around E14.5, through a mechanism dependent on a decrease in HIF1 signaling in the embryonic myocardium (Menendez-Montes et al., 2016). Despite the importance of glucose and FAs as cardiac energy sources, amino acids can also be used as bioenergetics fuel. Hence, amino acids have the capacity to enter the Krebs Cycle at different levels, a phenomenon known as anaplerosis, and to replenish metabolic intermediates that warrant both NADH/FADH₂ and building blocks production that enable the cells to continue growing under amino acid metabolism. The importance of amino acids as catabolic substrates has been described in tumor growth (Yue et al., 2017), pulmonary hypertension (Piao et al., 2013), or limited oxygen supply conditions (Bing et al., 1954; Julia et al., 1990). However, the ability of the embryonic heart to catabolize amino acids remains unexplored.

Herein, we describe that *Hif1a* loss in Nkx2.5 cardiovascular progenitors or cardiomyocytes during heart development blunts glycolysis and drives a compensatory metabolic adaptation based on transient activation of amino acid transport and catabolism associated with increased ATF4 and HIF2 α to maintain energy production and growth. Our results demonstrate that HIF1 signaling in Nkx2.5 progenitors and cardiomyocytes is dispensable for cardiogenesis and show the relevance of amino acid metabolism during cardiac development in the absence of glycolysis, opening future research horizons toward studying the ability of the heart to use amino acids as an alternative energy fuel and biosynthetic precursor source in different pathophysiological contexts like cardiac ischemia and regeneration.

RESULTS

HIF1 signaling in Nkx2.5 progenitors is dispensable for cardiac development

HIF1 α is expressed in the developing myocardium, with a temporal dynamics along midgestation (Guimarães-Camboa et al., 2015; Krishnan et al., 2008; Menendez-Montes et al., 2016). We and others have described the heterogeneous regional distribution of HIF1 signaling with high HIF1 α levels in the compact myocardium in contrast with low expression in the trabeculae (Guimarães-Camboa et al., 2015; Menendez-Montes et al., 2016). To investigate the role of HIF1 in heart development we generated a cardiac-specific loss-of-function model using two floxed alleles of *Hif1a* gene in combination with the cardiac

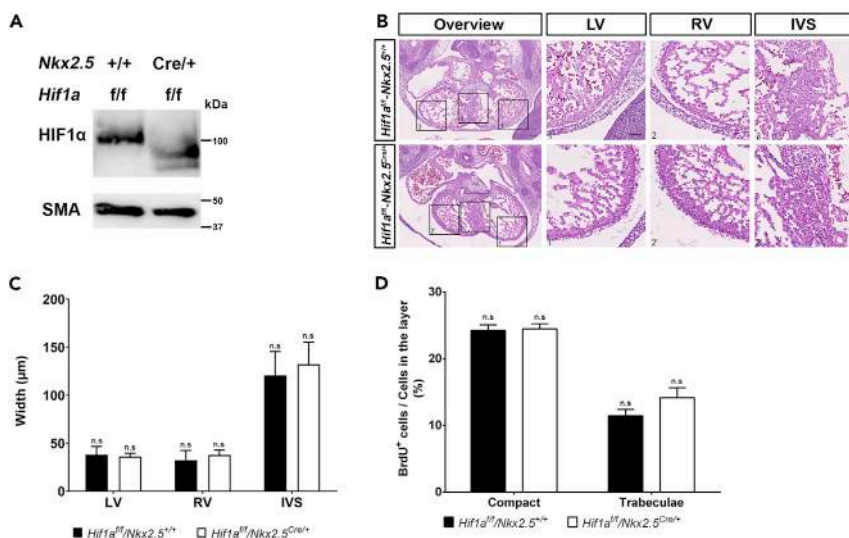


Figure 1. Embryonic phenotype of *Hif1a*-deficient embryos at E12.5

(A) Representative immunoblot against HIF1 α (upper panel) and smooth muscle actin (SMA, lower panel) in heart lysates of control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) and *Hif1a/Nkx2.5* (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) mutant embryos at E12.5. (B) E12.5 control (upper panels) and mutant (lower panels) heart sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). Scale bars, 100 μ m (overview) and 20 μ m (insets). (C) H&E quantification of ventricular walls and interventricular septum width in E12.5 control (black bars, n = 4) and mutant (white bars, n = 3) embryos. (D) Quantification of BrdU immunostaining, represented as percentage of BrdU⁺ cells in the compact myocardium and trabeculae of E12.5 control (black) and *Hif1a/Nkx2.5* mutant (white) embryos (n = 3). In all graphs, bars represent mean \pm SEM, Student's t test, n.s.: non-significant. LV: left ventricle; RV: right ventricle; IVS: interventricular septum. Similar amount of male and female embryos has been used in these analyses.

progenitor-specific Cre recombinase driver *Nkx2.5Cre* (*Hif1a^{fllox/fllox}/Nkx2.5^{Cre/+}*, from here on *Hif1a/Nkx2.5*). Cre-mediated recombination was analyzed by agarose gel electrophoresis of cardiac and non-cardiac tissue at E12.5 (Figure S1A). A 400-bp product, corresponding to the processed *Hif1a* allele was only obtained in cardiac tissue in the presence of Cre recombinase activity, indicating that the deletion is specific of cardiac tissue and there is no ectopic recombination. To confirm deletion efficiency, we analyzed the expression of the floxed *Hif1a* exon by qPCR at E14.5, confirming its correct elimination despite a signal increase outside of the floxed region, probably caused by compensatory mechanisms (Figure S1B). Furthermore, *Phd3*, whose expression is dependent on HIF1, showed decreased expression in the *Hif1a/Nkx2.5* mutants (Figure S1B). We also determined HIF1 α protein distribution and abundance within cardiac tissue by immunostaining in mutant and control littermates by E12.5 (Figure S1C). *Hif1a* deletion in the mutant embryos resulted in reduced HIF1 α staining, with a displacement of the HIF1 α channel intensity curve to lower fluorescence intensity (Figure S1D). It is noteworthy that deletion efficiency, as measured by qPCR, was higher than that estimated by immunostaining. This is probably because the mutant *Hif1a* mRNA produced after Cre recombination is sufficiently stable to be translated, although the resulting protein is not functional as it lacks the DNA-binding domain located in the N-terminal region of HIF1 α . Efficient deletion was further confirmed by western blot of *Hif1a*-deficient heart lysates at E12.5 (Figure 1A). The lower molecular weight of the HIF1 α protein band confirms the presence of a truncated protein in mutant embryos, which is recognized by HIF1 antibodies raised against the C-terminal domain.

Hif1a/Nkx2.5 mutants were viable and recovered in the expected Mendelian proportions from E14.5 to weaning (Table 1). Histological analysis of control and *Hif1a/Nkx2.5* mutant hearts at E12.5 (Figure 1B) did not reveal differences between genotypes in terms of ventricular wall thickness (Figure 1C) or chamber sphericity (data not shown). Proliferation analysis by bromodeoxyuridine (BrdU) staining at E12.5 proved comparable proliferation index between control and *Hif1a*-deficient hearts (Figure 1D). Similar results were obtained at E14.5, when *Hif1a*-deficient embryos showed neither morphological alterations nor differences between genotypes in terms of cell size and proliferation by means of BrdU staining (data not shown). These results indicate that the lack of *Hif1a* in *Nkx2.5* cardiac progenitors does not influence

Table 1. Analysis of *Hif1a/Nkx2.5* mutant embryo recovery

Stage	<i>Hif1a</i> ^{fl/fl} / <i>Nkx2.5</i> ^{Cre/+}	Total	Litters	Observed %	Expected %	p value
E14.5	20	90	13	24.4 ± 4.9	25	0.905
Weaning	10	38	6	28.6 ± 5.8	25	0.787

For each stage, table shows the number of mutant embryos recovered, the total number of embryos/pups collected, and the number of litters analyzed. The percentage of recovered mutants and the expected recovery percentage (25% in all cases) were compared by the Wilcoxon signed rank test. Equivalent proportion of male and female embryos and mice has been considered in the analysis.

cardiomyocyte proliferation and suggest that HIF1 signaling in this cell population is dispensable for proper cardiac development.

Embryonic loss of *Hif1a* in *Nkx2.5* progenitors does not influence adult cardiac function or morphology

Albeit deletion of *Hif1a* in *Nkx2.5* cardiovascular progenitors did not hamper embryonic ventricular chamber formation, we wondered whether mutant mice might develop heart alterations in the adulthood. Histology analysis by hematoxylin-eosin staining at five months of age did not indicate evident changes in cardiac morphology of *Hif1a*-deficient hearts relative to control animals (Figure 2A). Moreover, Masson's trichrome staining analysis excluded the presence of fibrotic areas in any of the genotypes (Figure 2B). Nevertheless, the lack of macroscopic malformations does not rule out that cardiac performance could be affected. To determine if embryonic deletion of *Hif1a* influences cardiac function during adulthood, we performed echocardiography in 5-month-old control and mutant mice. Both 2D and M mode analysis (Figure 2C) and the quantification of several morphological parameters confirmed the absence of anatomical alterations (Figures 2D and 2E). Furthermore, conserved cardiac function in *Hif1a/Nkx2.5* mutant versus control mice was demonstrated by means of ejection fraction and fractional shortening (Figure 2F). On the other hand, electrocardiographic analysis showed normal PR and QRS segment length in *Hif1a/Nkx2.5* mice (data not shown), ruling out the existence of conduction or coupling defects.

These results indicate that active HIF1 signaling in cardiovascular *Nkx2.5* progenitors during heart development is not required for proper cardiac morphogenesis or normal heart function in the adulthood.

Cardiac deletion of *Hif1a* prevents the expression of glycolytic enzymes in the compact myocardium

To investigate the adaptive mechanisms operating upon *Hif1a* loss in *Nkx2.5* cardiovascular progenitors to allow normal cardiac development, we performed massive expression analysis by RNA sequencing (RNA-seq) of E12.5 ventricular tissue from control and *Hif1a/Nkx2.5* mutant embryos. Subsequent bioinformatics analysis identified 14,406 genes being expressed. Among them, 201 genes showed differential expression: 118 were downregulated in mutant hearts relative to control hearts and 83 were upregulated, representing positively and negatively regulated targets respectively, dependent on functional HIF1 signaling in direct or indirect fashion (Table S1). To obtain a summarized view of their function, the list of 201 genes was subjected to enrichment analyses, which found significant associations with several metabolic processes, such as nucleotide/nucleoside and monocarboxylic acid metabolism, amino acid metabolism, and, especially, carbohydrate metabolism. Complete results are presented in Table S2, and a selection of significantly enriched processes is shown in Figure 3A, connected with the subset of differentially expressed genes that are involved in those processes. We have previously described the existence of metabolic territories in the embryonic myocardium with an enhanced glycolytic signature in the compact myocardium by E12.5 (Mendez-Montes et al., 2016). Here we found that glucose transporter 1 (GLUT1) protein levels were significantly reduced in the compact myocardium of the *Hif1a/Nkx2.5* mutant embryos by E12.5 (Figure 3B). Because *Nkx2.5* cardiac progenitors contribute to different cardiac layers including myocardium, epicardium, and endocardium, to determine if the glycolytic inhibition observed in the *Hif1a/Nkx2.5* mutant embryos was associated with *Hif1a* loss in the myocardial layer, we specifically deleted *Hif1a* in cardiomyocytes using *cTnT-Cre* (Jiao et al., 2003) (*Hif1a*^{fllox/fllox}/*cTnT*^{Cre/+}, hereon *Hif1a/cTnT*). *Hif1a/cTnT* mutants also showed reduced HIF1 α levels by E14.5 without cardiac developmental defects compared with control littermates (data not shown). The inhibition of the glycolytic program in both *Hif1a/Nkx2.5* and *Hif1a/cTnT* mutants was further confirmed by mRNA expression analysis of the critical enzymes *Glut1*, *Pdk1*, and *Ldha* by *in situ* hybridization at E12.5 (Figure 3C) and E14.5 (data not shown) in controls and *Hif1a* mutants. Results

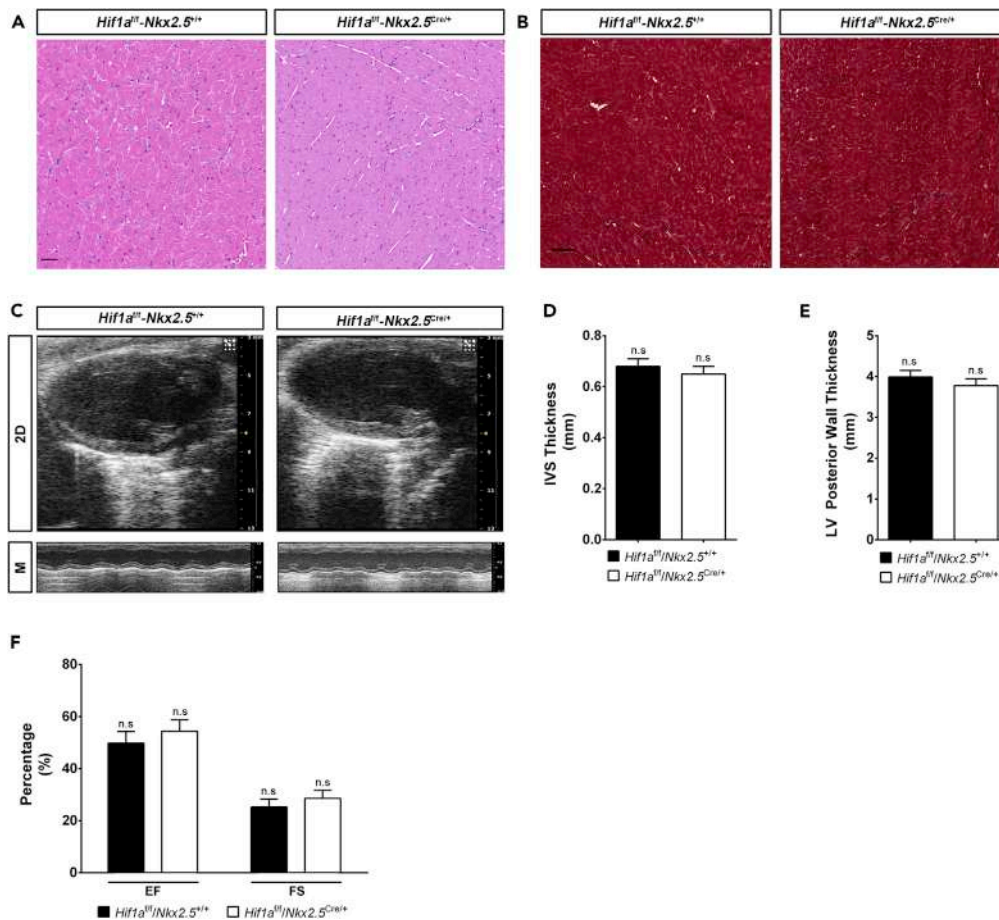


Figure 2. Cardiac morphology and function in adult *Hif1a/Nkx2.5* mutants

(A and B) H&E (A) and Masson's trichrome (B) staining of the left ventricle from a representative 5-month-old control ($Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}$) and *Hif1a/Nkx2.5* mutant ($Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}$) heart. Even distribution of male and female mice was used in each experimental group (n = 6 females and 6 males). No differences associated with sex were observed in cardiac structure or fibrosis.

(C) Representative echocardiography imaging of 5-month-old control and *Hif1a*-deficient mutant mice in 2D mode (upper panels) and M mode (lower panels).

(D and E) Echocardiography-based quantification of interventricular septum (IVS) thickness (D) and left ventricle (LV) posterior wall thickness (E) in controls (black bars, n = 9) and *Hif1a/Nkx2.5* mutants (white bars, n = 11) by 5 months of age. (F) Quantification of ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) in controls (black bars, n = 9) and *Hif1a/Nkx2.5* mutants (white bars, n = 11) by 5 months of age. Uniform distribution of male and female mice was used in each experimental group (n = 10 females and 10 males). No differences associated with sex were observed for cardiac structural or functional parameters. In all graphs bars represent mean \pm SEM, Student's t test, n.s.: non-significant. For all images, scale bars, 50 μ m.

showed strong inhibition of glycolytic gene expression in the compact myocardium of *Hif1a*-deficient hearts at both stages. This sustained glycolytic inhibition at E14.5 was further validated by qPCR in both genetic models (Figures 3D and 3E), including the downregulation of *Slc16a3*, responsible for the transport of monocarboxylic acids, such as lactate, across mitochondrial membrane.

Taken together, these results confirm our previous findings that HIF1 signaling controls the expression of glycolytic genes in the embryonic heart and indicate that an active glycolytic program in the compact myocardium is not essential for proper cardiogenesis.

Lipid metabolism is preserved in cardiac *Hif1a* mutant mice

We have previously reported that sustained HIF1 signaling in the embryonic myocardium results in severe alterations of mitochondrial amount and function (Menendez-Montes et al., 2016). To evaluate the

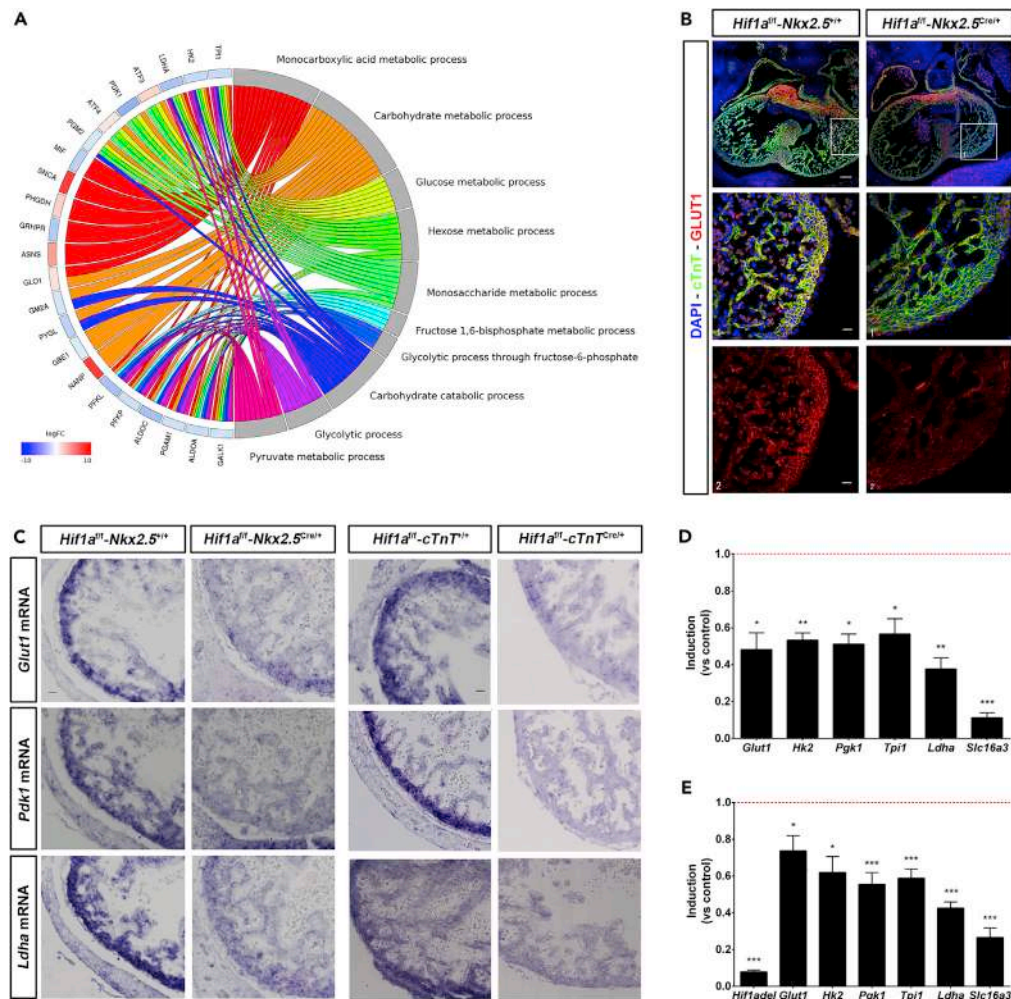


Figure 3. Glycolytic metabolism alterations in cardiac *Hif1a*-deficient embryos

(A) Circular plot representing logFC value for genes detected as differentially expressed in mutant (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) embryos, relative to controls (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*), at E12.5 (left side), associated to Gene Ontology (GO) terms related to carbohydrate metabolism, selected among those detected as enriched with p value < 0.001 with GOrilla (right side). logFC values for genes are color coded: blue color denotes lower expression in mutant samples. Ribbons connecting genes and biological processes are colored by process.

(B) Representative GLUT1 immunofluorescence on E12.5 heart sections of controls (left panels) and *Hif1a/Nkx2.5* mutants (right panels). Nuclei shown in blue, Troponin T in green, and GLUT1 in red. Insets show left ventricle. Scale bars, 100 μ m and 20 μ m in insets.

(C) E12.5 *in situ* hybridization of *Glut1* (top panels), *Pdk1* (middle panels), and *Ldha* (bottom panels) in control and *Hif1a/Nkx2.5* mutant right ventricles (left) and in control and *Hif1a/cTnT* mutant right ventricles (right). Scale bar, 20 μ m

(D and E) RT-qPCR analysis of glycolytic genes from E14.5 *Hif1a/Nkx2.5* (D) and *Hif1a/cTnT* (E) mutant ventricles. Bars (mean \pm SEM, n = 3) represent fold induction relative to baseline expression in littermate controls (red line). Student's t test. *p value < 0.05; **0.005 < p value < 0.01, ***p value < 0.005. Equivalent proportion of male and female embryos have been included in all experiments.

bioenergetics adaptations in response to the lack of cardiac HIF1 activation we investigated mitochondrial network and activity in *Hif1a/Nkx2.5* mutants. Analysis and quantification of ventricular ultrastructure by transmission electron microscopy at E12.5 indicated a moderate increase in mitochondrial content in *Hif1a*-deficient embryos compared with control littermates. Images also confirmed our previously reported observation that mitochondrial number is higher in the trabecular layer than in the compact myocardial layer (Menendez-Montes et al., 2016), both in control and *Hif1a/Nkx2.5* mutant hearts (Figure 4A). Enriched mitochondrial content in *Hif1a/Nkx2.5* mutants correlated with reduced expression levels of HIF1 target

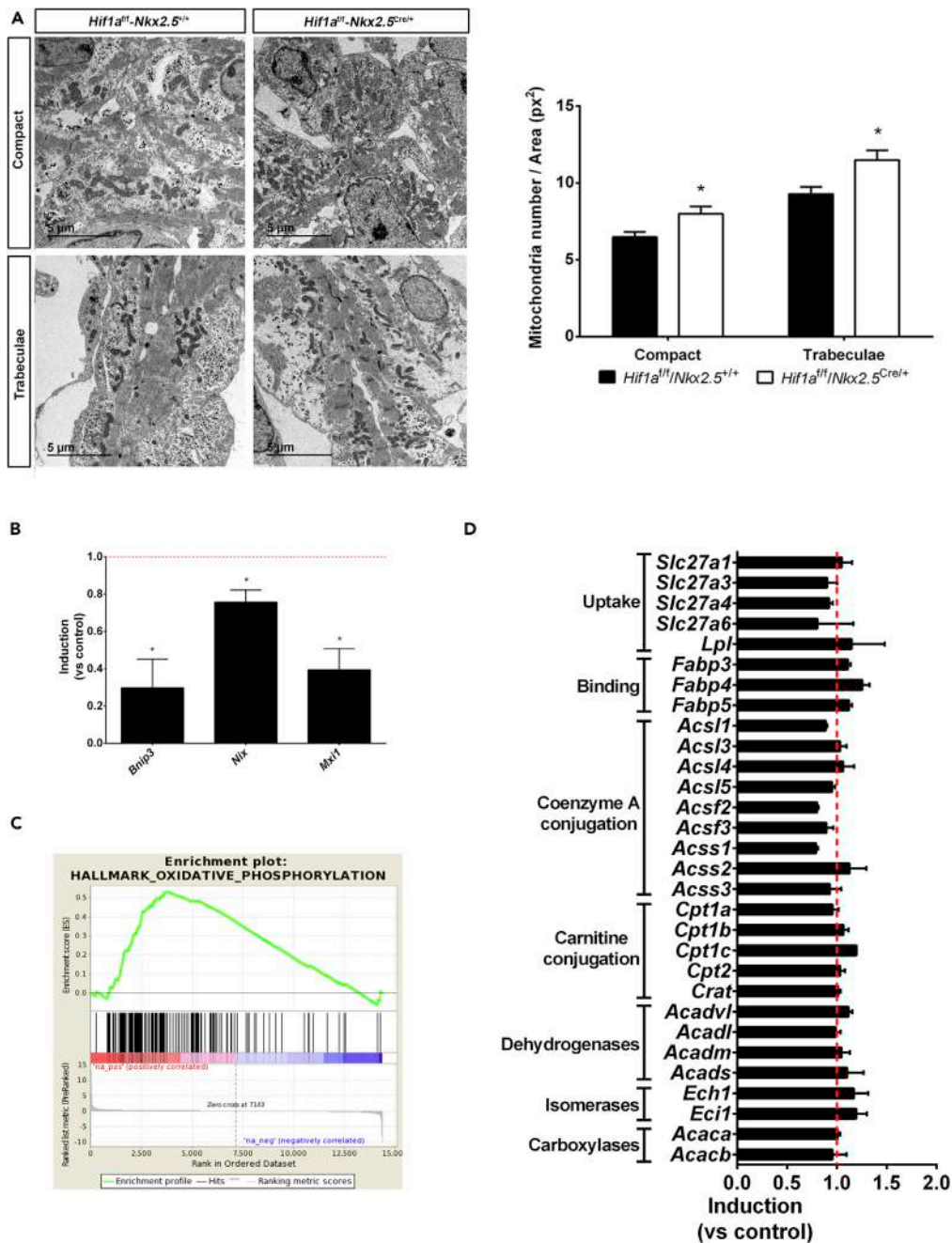


Figure 4. Mitochondrial content and lipid metabolism in *Hif1a/Nkx2.5* mutants at E12.5

(A) Transmission electron micrographs of ventricular tissue from a representative E12.5 control embryo (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*, left) and a mutant littermate (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*, right), showing compact myocardium (top panels) and trabeculae (bottom panels), and quantification of total mitochondria in electron micrographs from E12.5 controls (black bars) and mutants (white bars). Results are expressed as number of mitochondria per tissue area (px²). Scale bars, 5 μ m. Bars represent mean \pm SEM (n = 4). Student's t test, *p value < 0.05

(B) RT-qPCR analysis of mitophagy-related genes in E12.5 *Hif1a/Nkx2.5* mutant ventricles. Bars (mean \pm SEM, n = 3 for *Bnip3* and *Mxi1* and n = 4 for *Nix*) represent fold induction relative to baseline expression in littermate controls (red line). Student's t test, *p value < 0.05.

(C) GSEA enrichment plot for the Hallmark database Oxidative Phosphorylation gene set. The red to blue stripe represents 14,406 genes detected as expressed after differential expression analysis, ranked by logFC. Genes at the left side (colored in red) are more expressed in *Hif1a/Nkx2.5* mutants, and those located at the right side (colored in blue) are

Figure 4. Continued

more expressed in control littermates. Vertical black lines represent the position of members of the Oxidative Phosphorylation gene set along the ranked collection of genes. The green curve represents cumulative enrichment score.

(D) Fold change gene expression determined by RNA-seq of genes involved in fatty acid uptake and catabolism in *Hif1a/Nkx2.5* mutants. Red line represents baseline expression in control littermates. Bars represent mean \pm SEM (n = 2). All experiments were performed using a comparable number of male and female embryos at each stage.

genes involved in mitophagy like *Nix* and *Bnip3* (Zhang et al., 2008) or genes that negatively regulate mitochondrial biogenesis through Myc transcriptional repression like *Mxi1* (max interacting protein 1) (Figure 4B). Furthermore, we observed a significant enriched expression of genes related to oxidative phosphorylation determined by gene set enrichment analysis (Table S3, Figure 4C).

As mature cardiomyocytes rely on FA oxidation (FAO) for ATP production and cardiac performance, one possible metabolic adaptation of *Hif1a*-deficient hearts associated with increased mitochondrial content could be an early utilization of FA to provide sufficient ATP levels in the absence of effective glycolysis. However, RNA-seq (Figure 4D) and proteomic results (data not shown) demonstrated that the expression of genes involved in lipid catabolism was not different in control and *Hif1a/Nkx2.5* genotypes, at E12.5. These results indicate that inhibited glycolysis due to *Hif1a* loss is not associated with a compensatory increase in FAO.

In summary, our observations demonstrate that reduced HIF1 signaling promotes an increment of cardiac mitochondrial network and suggest the activation of metabolic compensatory mechanisms other than FAO activation upon glycolytic inhibition in *Hif1a/Nkx2.5* mutant embryos.

Amino acid metabolic program is transiently enhanced in cardiac *Hif1a*-deficient embryos

As indicated earlier, enrichment analysis identified several metabolic processes that could be altered upon deletion of *Hif1a* in cardiovascular progenitors, some of them related with amino acid metabolism and, specifically, to the “cellular response to amino acid starvation” (Table S2). Complementary functional enrichment analyses allowed to pinpoint more precise functional terms, which suggested alterations in Ala, Leu, Val, Ile, Asn, Asp, Ser, and Gly biosynthesis (Figure 5A, Table S4). These results lead us to hypothesize about the activation of a metabolic reprogramming toward amino acid oxidative catabolism in embryonic cardiomyocytes in the absence of effective glycolysis associated with *Hif1a* deletion.

To validate this hypothesis, we performed global proteomic analysis in *Hif1a/Nkx2.5* embryos and control littermates by E12.5. Quantitative analyses revealed a significant increase in the abundance of proteins related to amino acid metabolism and, specifically, glutamine family metabolism (Figure 5B and Table S5). In addition, the decrease observed for proteins related to glycolysis confirmed the inhibited glycolytic gene expression program upon *Hif1a* deletion (Figure 3). Therefore, quantitative results for both gene expression, by RNA-seq, and protein abundance, by tandem mass spectrometry (MS/MS) proteomics, correlate to a certain extent, showing inhibited glycolysis (Figure 5C, left) and increased amino acid catabolism (Figure 5C, right). Specifically, *Hif1a/Nkx2.5* mutants showed increased expression and protein levels of genes contributing to anaplerosis of amino acids into Krebs cycle. These contributions (Figure S2) included aromatic amino acids (Phe, Tyr), polar amino acids (Asn, Asp, Gln, Glu, Ser, and Cys), Pro, Gly, and branched-chain amino acids (Val, Leu, and Ile). Urea cycle was also upregulated, resulting in increased contribution of Arg to Krebs cycle by the generation of fumarate, which can also act as a Krebs cycle intermediate. To determine differences between the amino acid profiles of *Hif1a/Nkx2.5* mutant and control hearts, we performed proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy. The ventricular chambers of E12.5 *Hif1a/Nkx2.5* mutants showed higher levels of glutamine and total GLU (glutamine + glutamate) (Figures 5D and 5E). This metabolic signature is consistent with the *Hif1a/Nkx2.5* transcriptional and proteomic profiles. Finally, to investigate whether this amino acid signature was maintained over time in *Hif1a*-deficient hearts, we analyzed the expression levels of amino acid transporters by RT-qPCR at E14.5 and E17.5 (Figure 5F). The results showed that gene expression levels of several transporters, such as *Slc7a5* (*Lat1*) (transporter of Trp, Phe, Tyr, and His, and also Met, Val, Leu, and Ile [Yanagida et al., 2001]), *Slc7a11* (transporter of Cys [Lim and Donaldson, 2011]), and *Slc3a2* (transporter of Val, Leu and Ile by association with *Slc7a5* [Kanai et al., 1998]), as well as the leucyl-tRNA synthetase *Lars*, were still upregulated by E14.5 in *Hif1a*-deficient hearts, but returned to control-like expression levels by E17.5.

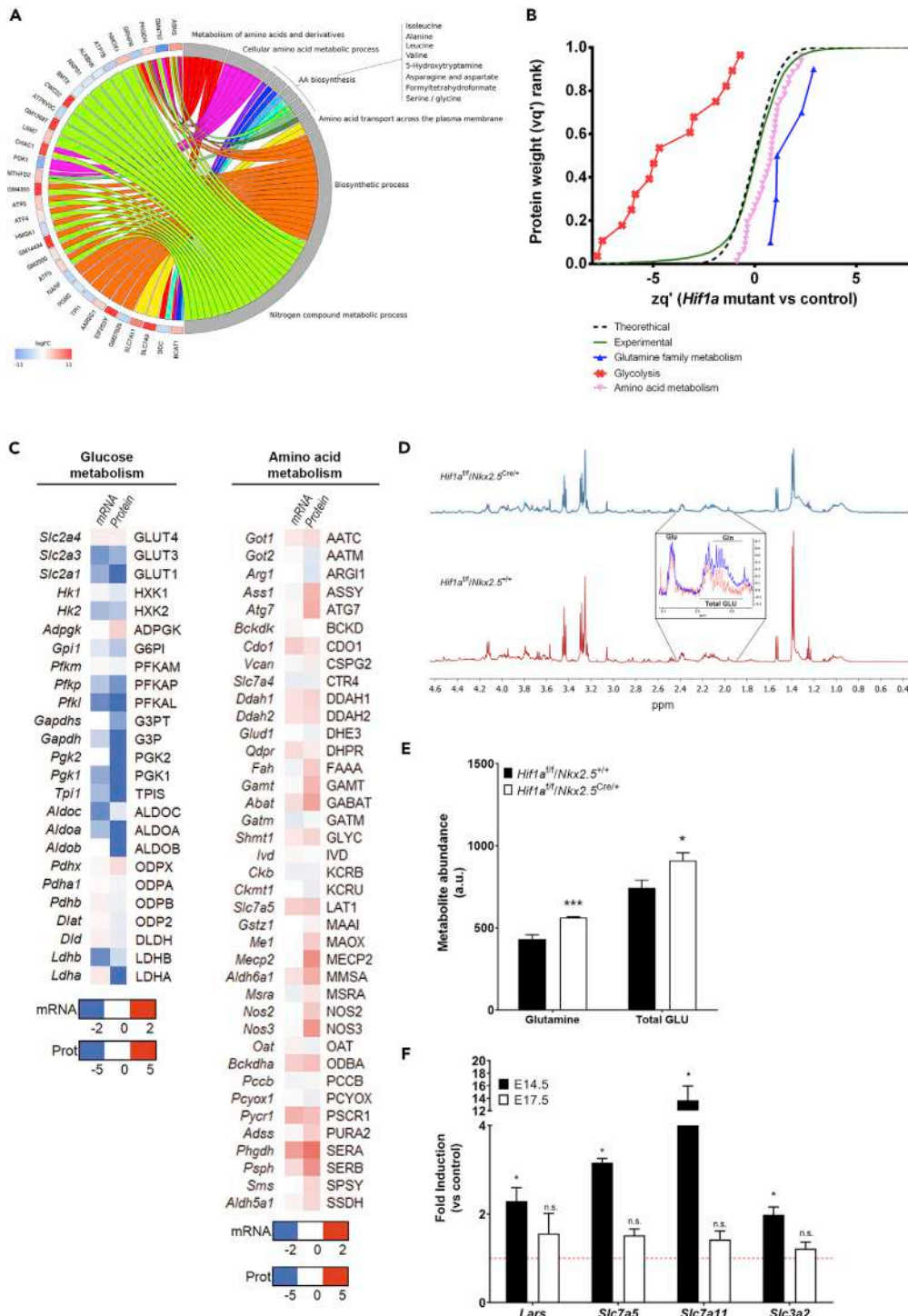


Figure 5. Metabolic adaptations in *Hif1a*-deficient hearts

(A) Circular plot representing logFC values for genes detected as differentially expressed in mutant (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) embryos, relative to controls (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) at E12.5 (left side), associated to a selection of functional terms related to amino acid metabolism (right side). Functions were detected with Panther by comparison against the Biological Process component of the Gene Ontology database, as well as against the Panther Pathway and Reactome databases. All functional terms were enriched with p value < 0.05. logFC values are color coded: red color denotes higher expression in mutant samples. Ribbons connecting genes and functional terms are colored by process.

Figure 5. Continued

(B) Representation of protein statistical weights (wq') grouped by functional categories ($FDR < 1\%$, $n = 6$) versus protein abundance in *Hif1a*-deficient hearts relative to control embryos (zq') at E12.5, as determined by MS/MS proteomics. A displacement right from the experimental curve indicates increased pathway in mutant embryos, whereas a left displacement represents a reduction.

(C) Heatmap representation of mRNA (quantified by RNA-seq) and protein (quantified by MS/MS) of components of glucose (left) and amino acid (right) metabolic pathways. Color code indicated in the legend is calculated as the value found in *Hif1a/Nkx2.5* mutants relative to control littermates.

(D) Representative 1H -NMR spectra in ventricular samples from E12.5 control (bottom) and *Hif1a/Nkx2.5* mutant embryos (top). The inset highlights the differences in glutamine and total GLU [glutamine (Gln) + glutamate (Glu)] NMR signals. (E and F) (E) 1H -NMR spectroscopy quantification of glutamine and total GLU abundance in control (black) and *Hif1a/Nkx2.5* mutant embryos (white). Bars represent mean \pm SEM ($n = 3$). (F) RT-qPCR analysis of amino acid transporter gene expression in *Hif1a* mutant ventricular tissue at E14.5 (black bars) and E17.5 (white bars). Bars (mean \pm SEM, $n = 2-4$ for E14.5 and $n = 3$ for E17.5) represent fold induction relative to baseline expression in littermate controls (red line). For all graphs, Student's t test, * p value < 0.05 , *** p value < 0.005 , n.s. non-significant. Even proportion of male and female embryos has been included to carry out these experiments at each gestational stage.

These data indicate that upregulation of amino acid transport is transient and suggest that temporary increase of amino acid catabolism and anaplerosis could act as a compensatory mechanism to overcome the loss of glycolytic metabolism upon *Hif1a* loss until the FAO is established later in gestation, reflecting the metabolic flexibility of the embryonic heart to adapt to different substrates for energy supply.

ATF4 signaling is upregulated in *Hif1a/Nkx2.5* mutant embryos

The fact that there is a transient upregulation of general amino acid catabolism upon *Hif1a* loss in cardiovascular progenitors suggests the existence of upstream regulators that are temporally induced in the *Hif1a/Nkx2.5* mutants. Amino acid metabolism and its transport is tightly regulated through several pathways, including mTOR (mammalian target of rapamycin), GCN2 (general control non-derepressable 29), and ATF4 (Activating Transcription Factor 4), among others (Bröer and Bröer, 2017). Upstream regulator analysis of our RNA-seq data using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) in fact shows that ATF4 and CHOP could function as main regulators of a gene set implicated in amino acid metabolism in *Hif1a*-deficient hearts (Figure 6A and Table S6). ATF4 is a transcriptional regulator that activates the expression of genes involved in amino acid transport and metabolism (Harding et al., 2003) and also responds to nutrient and metabolic stress in hypoxia (Weidemann and Johnson, 2007). *Atf4* gene expression, and mRNA levels of its target genes, such as *Slc7a11*, *Slc7a3*, *Asns*, *Lars*, or *Trib3*, among others, are upregulated in our *Hif1a/Nkx2.5* deletion model by E12.5 (Figure 6B). Furthermore, ATF4 protein levels were increased at E12.5 and E14.5 in cardiac lysates from *Hif1a/Nkx2.5* mutant hearts compared with control littermates (Figure 6C). Interestingly, transcriptional upregulation of ATF4 is sustained at E14.5, but its expression returned to control levels by E17.5 (Figure 6D), following an expression pattern similar to that of amino acid transporters (Figure 5F). Because glucose deprivation upon glycolytic inhibition conditions is known to promote the activation of unfolded protein response (UPR) (Badiola et al., 2011; Ikesugi et al., 2006; Vavilis et al., 2016), we decided to examine the expression levels of genes involved in UPR in the *Hif1a/Nkx2.5* mutant versus control hearts. The results show a significant upregulation in the expression of genes involved in UPR such as ATF3, ATF4, or CHAC1 among others (Figure 6E).

All together these results led us to suggest that *Hif1a* loss in cardiovascular progenitors induces the temporal activation of ATF4 expression and ATF4-mediated amino acid response probably through UPR activation in response to glycolytic impairment.

Loss of *Hif1a* in *Nkx2.5* progenitors leads to transient induction of HIF2 by midgestation

In the absence of active HIF1 cascade, HIF2 α , an alternative HIF α isoform able to form functional heterodimers with ARNT, could play a compensatory role. To explore this possibility, we analyzed HIF2 α abundance by western blot and found protein expression induction by E12.5 in the *Hif1a/Nkx2.5*-deficient hearts and comparable levels by E14.5 relative to controls (Figures 7A and 7B). A similar induced expression by E12.5 was observed for the HIF2 target gene, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) (Figures 7C and 7D). Interestingly, glucose deprivation has been shown to activate HIF2 signaling in an acetylation-dependent manner (Chen et al., 2015). We hypothesize that this adaptive activation of HIF2 signaling could partially contribute together with ATF4 upregulation to the transcriptional induction of amino acid transporters observed in the cardiac *Hif1a/Nkx2.5*-deficient model. Indeed, HIF2 α has been involved in the

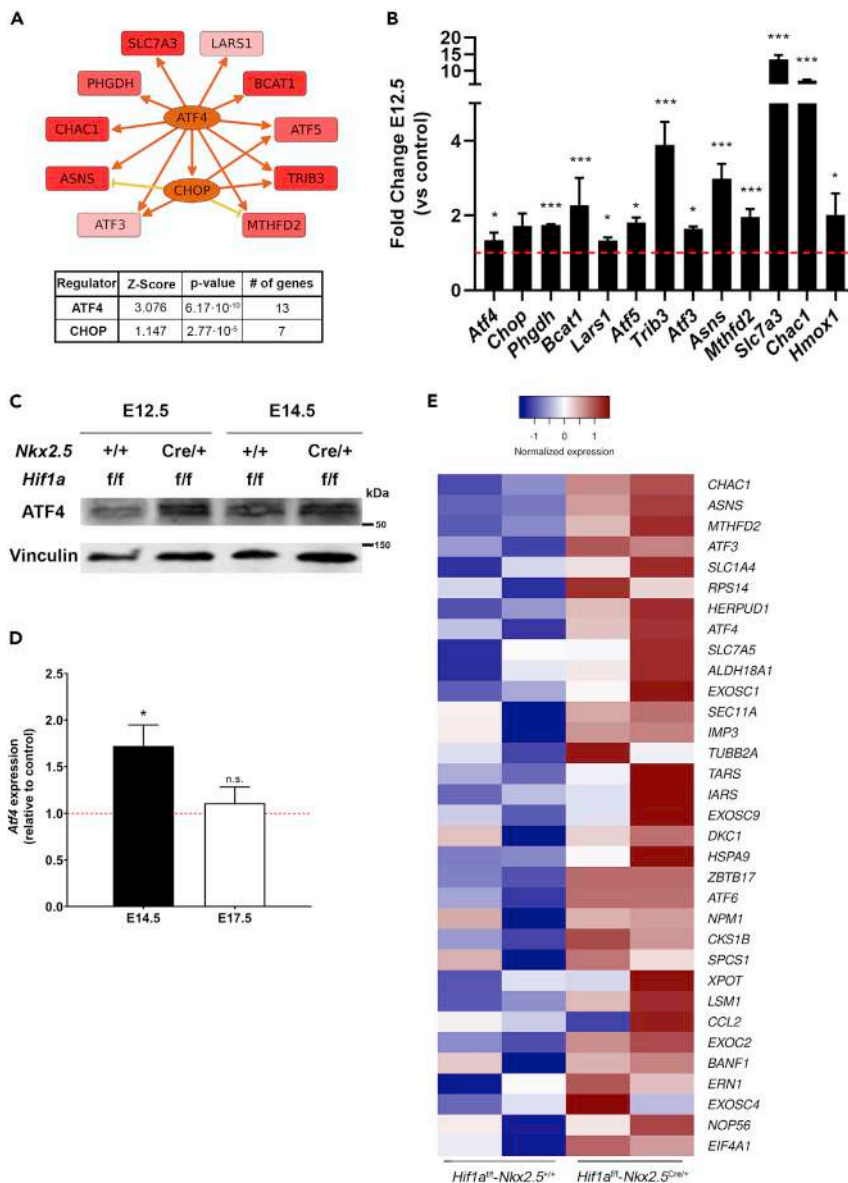


Figure 6. Upstream regulators of amino acid catabolism activation in *Hif1a*-deficient hearts

(A) Regulatory network summarizing the interactions between ATF4 and CHOP with a collection of genes related to amino acid metabolism, detected as differentially expressed at E12.5 in *Hif1a/Nkx2.5*-deficient hearts relative to controls. The graph is a simplified version of a mechanistic network predicted after IPA's upstream regulator analysis on the complete set of 201 differentially expressed genes. Intensity of red color in target genes is proportional to logFC. Intensity of orange color in regulator genes (ATF4 and CHOP) is proportional to the predicted activation Z score. Arrow-pointed and flat-headed lines represent positive and negative regulation interactions, respectively. Orange and yellow lines represent congruent and non-congruent connections, respectively, relative to the predicted activation state of regulators. The inset below summarizes Z score value and enrichment p value for ATF4 and CHOP, as well as the number of differentially expressed genes that are regulated by each of them.

(B) Relative expression of genes related to amino acid metabolism downstream of ATF4 determined by RNA-seq at E12.5 in *Hif1a/Nkx2.5* mutant versus control ventricles (n = 2). Student's t test. *p value<0.05, *** p value<0.005.

(C) Representative immunoblot out of 5 against ATF4 (upper panel) and Vinculin (lower panel) from ventricular heart lysates of control (*Hif1a^{f/f}/Nkx2.5^{+/+}*) and *Hif1a/Nkx2.5* mutant (*Hif1a^{f/f}/Nkx2.5^{Cre/+}*) embryos at E12.5 and E14.5.

(D) RT-qPCR analysis of *Atf4* gene expression at E14.5 (black bar) and E17.5 (white bar) in *Hif1a/Nkx2.5* mutant ventricular tissue. Bars (mean ± SEM, n = 5 for E14.5 and n = 3 for E17.5) represent fold induction relative to baseline expression in littermate controls (red line). Student's t test, * p value<0.05, n.s. non-significant.

Figure 6. Continued

(E) Heatmap representing RNA-seq based, normalized expression levels for genes involved in the unfolded protein response (UPR). The UPR gene set, as defined in the Hallmark database, was detected as enriched in mutant embryos after GSEA, although enrichment was not statistically significant (nominal p value = 0.31). Genes presented in the heatmap correspond to the leading-edge subset, this is, those mostly contributing to the calculated enrichment score. All experiments and analyses were performed using equivalent amount of male and female embryos at each stage.

direct control of *Slc7a5* (Lat1) expression by binding to the proximal promoter of the gene in renal clear cell carcinoma, as well as in lung, liver, and glioblastoma cells (GBCs) (Corbet et al., 2014; Elorza et al., 2012; Zhang et al., 2020). Additionally, HIF2 signaling has been related to the expression of other amino acid metabolism-related genes that are increased in *Hif1a/Nkx2.5* mutants compared with controls, such as *Mthfd2* or *Atf3* (Green et al., 2019; Turchi et al., 2008). Hence, these results suggest that HIF2 could further participate in the metabolic reprogramming toward amino acid catabolic pathways in the absence of effective HIF1 signaling.

In summary, our data demonstrate that HIF1 signaling in *Nkx2.5* cardiac progenitors and cardiomyocytes is dispensable for proper heart formation and that the absence of *Hif1a* triggers a cardiac metabolic reprogramming, enhancing temporal amino acid catabolism to ensure sufficient ATP and biosynthetic precursors to sustain cardiac growth and function even in the absence of glycolysis (Figure 7E). Importantly, these adaptations might be relevant in the adulthood under pathological scenarios associated with oxygen signaling like pulmonary hypertension or cardiomyopathy toward the development of novel drugs against new metabolic targets.

DISCUSSION

Here, we describe that *Hif1a* loss in *Nkx2.5* cardiovascular progenitors or cardiomyocytes causes glycolytic program inhibition in the compact myocardium (CM) by E12.5, without compromising normal cardiac development and embryonic viability. Our results show that upon *Hif1a* deletion, the embryonic myocardium conserves FAO capacity but exhibits the ability to activate metabolic programs oriented to amino acid catabolism, together with an increase in the mitochondrial content by E12.5. Taken together, our findings point out the metabolic versatility of the embryonic heart and conciliate the discrepancies from previous deletion models of *Hif1a* in cardiovascular progenitors.

Integration with previous *Hif1a* deletion model in the embryonic heart

As outlined in the introduction, there is a lack of consensus between previous reports on cardiac embryonic mouse models of *Hif1a* loss (Guimaraes-Camboa et al., 2015; Huang et al., 2004; Krishnan et al., 2008). The *Hif1a* haploinsufficiency of some of these models outside the heart *Nkx2.5* territories might cause extracardiac affections, such as vascular or placental, that could significantly influence the described phenotype. Indeed, the use of a *Hif1a*-null allele has been reported to cause cardiovascular malformations associated with maternal diabetes (Bohuslavova et al., 2013). In this regard, the exhaustive characterization by Guimaraes-Camboa et al. at gene expression level extensively overlaps with our RNA-seq data, except in terms of stress and apoptotic pathways, upregulated only in the null-allele context of their mutant.

Moreover, we have also analyzed a *Hif1a* null/floxed model in *Nkx2.5* progenitors in parallel with the homozygous floxed model described here. We found that although glycolytic inhibition by E14.5 is comparable in both models (data not shown), only the null/floxed mice exhibited embryonic lethality (5% retrieved versus 25% expected, p value 0.0029, n = 7 litters), in contrast with the observed viability for the homozygous floxed mice. This observation, together with other results, supports the notion that cardiac HIF1 is dispensable for heart development, although an extensive comparison, in terms of gene expression in placental and vascular embryonic tissue, between the homozygous floxed and the null/floxed models would be necessary to exclude extracardiac influences of *Hif1a* deficiency affecting heart development as reported by Guimaraes-Camboa and colleagues, and also observed by the lab of Steven Fisher using a global conditional *Hif1a* knockout mice (Kenchegowda et al., 2014).

Amino acid catabolism and metabolic versatility of the embryonic heart

A key finding of our investigation is the fact that the embryonic myocardium is able to upregulate alternative metabolic pathways (amino acids transportation and catabolism), and to promote mitochondrial enrichment that could support the ATP demand upon glycolytic inhibition subsequent to *Hif1a* loss. The

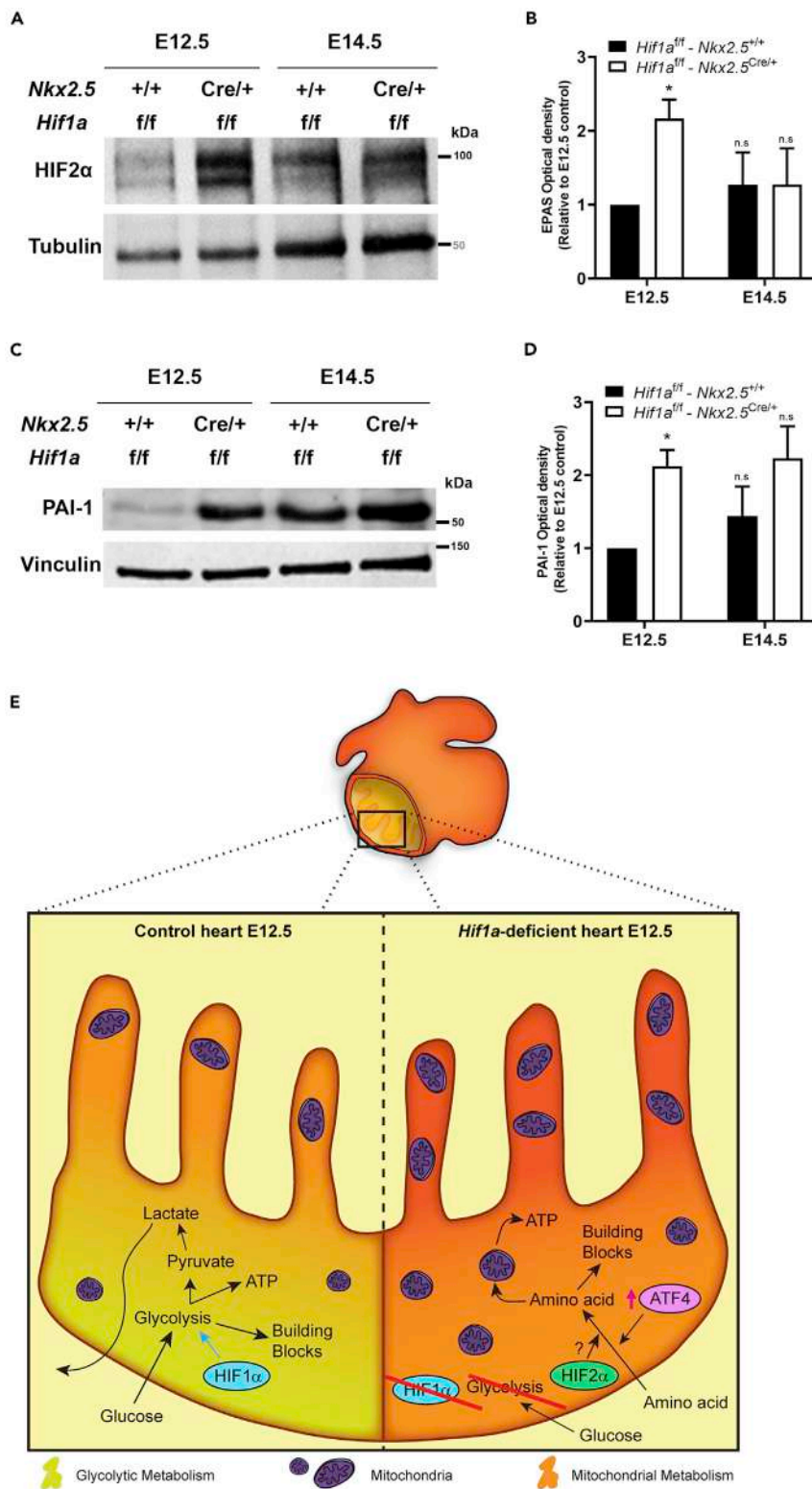


Figure 7. Continued

(C) Representative immunoblot against PAI-1 (upper panel) and Vinculin (lower panel) in heart lysates of control (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{+/+}*) and *Hif1a/Nkx2.5* mutant (*Hif1a^{fl/fl}/Nkx2.5^{Cre/+}*) embryos at E12.5 and E14.5.

(D) Quantification of PAI-1 band intensity normalized by Vinculin as loading control (n = 3). For all graphs, bars (mean ± SEM, n = 3) represent fold induction relative to baseline expression in littermate controls at E12.5 or E14.5. Student's t test. *p value < 0.05, n.s.: non-significant. Comparable proportion of male and female embryos has been included to perform these experiments at each gestational stage.

(E) Model representing the embryonic myocardium by E12.5. Compact myocardium is mainly glycolytic (yellowish) by the action of HIF1 signaling, whereas trabeculae rely more on mitochondrial metabolism (orange) in control embryos (left). In *Hif1a* mutants (right), glycolysis is compromised and the whole myocardium relies on mitochondrial metabolism, displaying higher mitochondrial content, and favoring the use of amino acids as energy source parallel to the activation of ATF4 and HIF2 signaling.

use of amino acids as cardiac metabolic fuel has been proposed mainly in oxygen-deprived scenarios (Bing et al., 1954; Julia et al., 1990). Amino acids provide, by deamination, carbon skeletons that can be converted into pyruvate, alpha-ketoglutarate, succinyl-CoA, fumarate, oxalacetate, acetyl-CoA, and acetoacetyl-CoA, all of them metabolites that can be incorporated into the Krebs cycle (Evans and Heather, 2016; Neubauer, 2007). As detailed earlier, our cardiac *Hif1a*-deficient model upregulates, both at the transcriptional and protein levels, a variety of amino acid transporters and biosynthetic and catabolic enzymes, which can replenish the Krebs cycle upon glucose deprivation. Moreover, the fact that this upregulation is accompanied by an increase in mitochondrial content indicates that the embryonic heart, in the absence of *Hif1a*, readapts its metabolism to maintain enough ATP levels and building blocks, without compromising the normal protein synthesis required for myocardium development and embryo viability.

Interestingly, this adaptation is transient and reversible, as revealed by the control-like levels of amino acid transporters and *Atf4* transcripts found at later stages by E17.5, without precluding the embryonic metabolic switch toward FAO previously described (Menendez-Montes et al., 2016). These observations indicate that the embryonic myocardium has the plasticity to modulate its metabolism to adapt to the energetic demand and nutrient availability. Moreover, in addition to this interesting role of amino acid catabolism activation in the embryonic context, the use of amino acids as an alternative energy source could be an attracting option to achieve cardioprotection and recovery after cardiac injury. In this regard, some of the enzymes upregulated in our massive screenings in *Hif1a*-deficient hearts are involved in Ser biosynthesis and one-carbon cycle, including *Phgdh*, *Psph*, and *Shmt1*. These pathways have been previously described to increase glutathione levels and protect the heart against oxidative stress (Zhou et al., 2017), also in a context of myocardial hypertrophy (Padrón-Barthe et al., 2018).

Origin of catabolized amino acids in *Hif1a*-deficient hearts

An interesting open aspect of the metabolic adaptation exhibited by the *Hif1a*-deficient hearts is the source of amino acid supply during glycolytic inhibition upon *Hif1a* loss. In this regard, two potential sources could be considered. First, protein-forming amino acids could be recycled through autophagy. This hypothesis is reasonable considering the context of the embryonic heart, where protein turnover, especially transcription factors, occurs fast and at a high rate (Merz et al., 1981). Moreover, a positive nitrogen balance has been reported in both adult rat and human hearts, indicative of rapid turnover of tissue proteins (Sprinson and Rittenberg, 1949). Interestingly, our *Hif1a* mutant embryos showed increased transcription of *p62*, a cargo-recognizing protein involved in autophagic degradation of cellular proteins (Lim et al., 2015). Although an extensive characterization analyzing autophagy, pro- and anti-autophagic signaling pathways, and protein labeling and turnover would be needed to further investigate this hypothesis, the fact that autophagy could be involved in this metabolic adaptation suggests an exciting link between cardiac metabolism, hypoxia, and autophagy.

Another possible source of amino acids in *Hif1a*-deficient hearts is fetal circulation. Even though an extensive characterization of fetal blood nutrient content over gestation has not been reported, the transcriptional increase in several membrane amino acid transporters observed in *Hif1a/Nkx2.5* mutants suggests that *Hif1a*-deficient cardiomyocytes could be obtaining amino acids directly from embryonic circulation. Interestingly, cardiac amino acids uptake in human subjects infused intravenously with protein hydrolysate increases by 245% (Bing et al., 1954), showing that the heart can respond to blood amino acids levels. Moreover, the regulation of amino acid transporters' expression in the placenta is essential for maintaining high levels of amino acids in the fetal blood to sustain embryo growth (Diaz et al., 2014). In this regard, an

increased cardiac uptake of amino acids in the *Hif1a*-deficient embryo could result in increased amino acids supply through the placenta that might respond to some secreted cues in the absence of cardiac HIF1 signaling.

Molecular determinants of amino acid catabolism activation

Amino acid metabolism and transport is tightly regulated through several pathways, including mTOR, GCN2, and G-protein-coupled receptors, among others (Bröer and Bröer, 2017). ATF4 is a transcriptional regulator that activates the expression of genes involved in amino acid transport and metabolism (Harding et al., 2003) and also responds to nutrient and metabolic stress in hypoxia (Weidemann and Johnson, 2007). *Atf4* gene expression is positively regulated in the *Hif1a/Nkx2.5* deletion model at both transcriptional and protein levels. In addition, upstream regulators' analysis identified ATF4 and CHOP (*Ddit3*) as putative regulators of amino acid metabolism in *Hif1a*-deficient hearts. ATF4 is an essential factor for amino acid starvation, by activating the gene expression of genes containing amino acid response elements (AARE) (Zhang et al., 2010) and regulates CHOP expression (Averous et al., 2004).

Loss of HIF1 α signaling results in downregulated expression of glycolytic enzymes. Glucose deprivation, in turn, has been shown to cause activation of UPR (Badiola et al., 2011; Ikesugi et al., 2006; Vavilis et al., 2016). In our *Hif1a* deletion model, reduced glycolysis was accompanied by increased expression of UPR genes, suggesting that *Hif1a* deletion could contribute to ATF4 activation through glycolytic inhibition and UPR activation in the embryonic myocardium.

Interestingly, the *Hif1a* deletion model by Guimarães-Camboa et al. (2015) also shows increased ATF4 signaling in *Hif1a*-deficient hearts, supporting ATF4 as one of the main regulators of the described metabolic adaptation upon loss of effective glycolysis in *Hif1a*-deficient hearts. Moreover, as ATF4 is upregulated in both animal models, and considering the lack of lethality of our floxed/floxed mice despite an efficient Cre-mediated recombination of *Hif1a* floxed exon 2, the upregulation of ATF4 does not seem to be responsible for the embryonic lethality reported by Zamboni's/Evan's groups that, in contrast, reported the activation of p53 stress pathway. Further analysis of p53-associated effects in the *Hif1a* null/floxed mice, as well as extracardiac impact of elimination of one *Hif1a* copy in the germ line might contribute to understand the phenotype of null/floxed mice.

Previous work in renal clear cell carcinoma, liver, and lung has identified a novel axis connecting HIF2 with mTOR through the action of the L-type amino acid transporter LAT1 (Elorza et al., 2012). Furthermore, mTORC1 has been reported to activate purine synthesis through the activation of ATF4 via a cellular stress-independent mechanism (Ben-Sahra et al., 2016). Hence, we hypothesized that upregulation of HIF2 α in the *Hif1a/Nkx2.5* mutant hearts might lead to the activation of mTOR pathway that could further connect with ATF4 activation. However, analysis of the phosphorylation state of mTOR targets Factor 4E Binding Protein (4EBP1) and S6 Kinase (S6K) by western blot and immunohistochemistry revealed inhibition of these downstream effectors of mTOR in the *Hif1a/Nkx2.5* mutant hearts (data not shown), demonstrating that HIF2/LAT1/mTOR axis is not conserved in the embryonic myocardium and suggesting that ATF4 upregulation occurs in a HIF1 and mTORC1-independent manner, probably associated to enhanced UPR activation due to impaired glycolysis.

We also show that *Hif1a/Nkx2.5* mutants display higher levels of glutamine and glutamate compared with controls. Both amino acids are important carbon and nitrogen sources that can be used for energy production as well as for nucleotide and protein synthesis in cancer cells. In some tissues like the brain, part of glutamate can arise from branched-chain amino acids like leucine, isoleucine, or valine, which are transported into the cytosol via L-type amino acid transporters (LAT1-4) and converted into branched-chain alpha ketoacids through the action of cytosolic (BCAT1) or mitochondrial (BCAT2) branched-chain aminotransferases (Yudkoff, 1997). A recent article on GBCs describes the regulation of branched-chain amino acid reprogramming by HIFs and shows that the main LAT isoform expressed in GBC is LAT1. The authors show that Lat1 promoter can be transactivated by both HIF1 and HIF2, although BCAT1, associated to GBC proliferation, is only regulated by HIF1 in this cell type (Zhang et al., 2020). In contrast, in the *Hif1a/Nkx2.5* mutant hearts we have observed upregulation of LAT1 and BACT1 independently of HIF1 abrogation, suggesting that in the embryonic heart HIF2 might play an important role in controlling the expression of these key elements of BCAA metabolic reprogramming. Further functional and molecular characterization of HIF1/HIF2 double mutant mice would contribute to confirm this hypothesis. Another important aspect

for future research would be to determine the relative contribution of HIF2 versus ATF4 in the amino acid metabolic reprogramming observed in the *Hif1a/Nkx2.5* mutant mice as both transcription factors share several common target genes related to amino acid transport and catabolism.

In summary, our work demonstrates that HIF1 elimination in cardiac progenitors and cardiomyocytes is dispensable for heart development and function, and that impaired glycolysis during cardiogenesis in *Hif1a*-deficient mice induces a transient reprogramming of amino acid metabolism concomitant with HIF2 and ATF4 activation. These observations uncover the metabolic flexibility of the embryonic heart that might share common adaptive bioenergetics responses to cancer cells under compromised glucose and FAO availability.

Limitations of the study

Performing metabolic flow studies during embryonic development is challenging as metabolites can be utilized by the maternal metabolism before reaching the embryo. Hence, future functional assays on amino acids utilization will contribute to reinforce our transcriptomic and proteomic data on amino acids import and catabolism activation.

The definitive role of ATF4 and HIF2 in metabolic reprogramming to amino acid catabolism in the absence of glycolytic program in the *Hif1a* cKO will require future genetic analysis of single and double knockout models.

Resource availability

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Silvia Martín-Puig (silvia.martin@cnic.es; silvia.martin@ufv.es).

Materials availability

Mouse lines generated in this study are available upon request from the Lead Contact with a completed Materials Transfer Agreement and might require additional payment.

Data and code availability

RNA-seq data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) and are accessible through GEO Series accession number GSE164453.

Proteomic datasets (raw files, protein databases, search parameters, and results) have been deposited in the Peptide Atlas repository (<http://www.peptideatlas.org>) and are available through the accession number PASS01236.

METHODS

All methods can be found in the accompanying [Transparent Methods supplemental file](#).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102124>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Lorena Flores for echocardiography technical assistance, Raquel Baeza and Mercedes de la Cueva for animal housing and handling, and CNIC Microscopy, Genomics and Histology Core Facilities for technical assistance. We thank Miguel Torres Sanchez, Jose Antonio Enriquez, Luke Szveda, and Hesham Sadek for critical discussion of the manuscript. This project has been supported by Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Spain and by grants to S.M.-P. from the European Research Council, European Union, FP7-PEOPLE-2010-RG_276891; Fundación TV3 La Marató, Spain, 201507.30.31; Comunidad de Madrid (CAM); Spain and European Union (EU), B2017/BMD-3875; Instituto de Salud Carlos III, Spain, PI17/01817; Universidad Francisco de Vitoria (UFV), Spain and LeDucq Foundation, France, 17CVD04. I.M.-M. was supported by La Caixa-CNIC and Fundación Alfonso Martín Escudero fellowships, Spain. T.A.-G. was supported by a predoctoral award granted by

CAM/EU and UFV, Spain, PEJD-2018-PRE/SAL-9529 and SM-P by a Contrato de Investigadores Miguel Serret (CPII16/00050) and UFV, Spain.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.M.-P. conceived and supervised the project. I.M.-M. performed most of the *in vitro* and *in vivo* experiments with assistance from B.E., B.P., and T.A.-G., prepared the figures, and together with S.M.-P. analyzed the data and co-wrote the manuscript. M.J.G. performed all bioinformatic analysis and contributed to manuscript editing and discussion. E.B. and J.V. performed proteomic analysis. A.V.A. and L.J.J.-B. carried out echocardiographic studies. J.L.I.-G., A.F., and J.R.-C. performed metabolic analysis. Funding acquisition by S.M.-P.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: July 1, 2020

Revised: December 1, 2020

Accepted: January 26, 2021

Published: February 19, 2021

REFERENCES

- Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., and Fafournoux, P. (2004). Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279, 5288–5297.
- Badiola, N., Penas, C., Miñano-Molina, A., Barneda-Zahonero, B., Fadó, R., Sánchez-Opazo, G., Comella, J.X., Sabriá, J., Zhu, C., Blomgren, K., et al. (2011). Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis.* 2, e149.
- Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S.J.H., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* 351, 728–733.
- Bing, R.J., Siegel, A., Ungar, I., and Gilbert, M. (1954). Metabolism of the human heart: II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am. J. Med.* 16, 504–515.
- Bohuslavova, R., Skvorova, L., Sedmera, D., Semenza, G.L., and Pavlinkova, G. (2013). Increased susceptibility of HIF-1 α heterozygous-null mice to cardiovascular malformations associated with maternal diabetes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 60, 129–141.
- Bröer, S., and Bröer, A. (2017). Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem. J.* 474, 1935–1963.
- Cerychova, R., and Pavlinkova, G. (2018). HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9, 460.
- Chen, R., Xu, M., Nagati, J.S., Hogg, R.T., Das, A., Gerard, R.D., and Garcia, J.A. (2015). The acetate/ACSS2 switch regulates HIF-2 stress signaling in the tumor cell microenvironment. *PLoS One* 10, e0116515.
- Chung, S., Arrell, D.K., Faustino, R.S., Terzic, A., and Dzeja, P.P. (2010). Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 725–734.
- Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-terzic, C., Behfar, A., and Terzic, A. (2011). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Natl. Institutes Heal.* 4, 1–12.
- Corbet, C., Draoui, N., Polet, F., Pinto, A., Drozak, X., Riant, O., and Feron, O. (2014). The SIRT1/HIF2 α axis drives reductive glutamine metabolism under chronic acidosis and alters tumor response to therapy. *Cancer Res.* 74, 5507–5519.
- Díaz, P., Powell, T.L., and Jansson, T. (2014). The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource Allocation1. *Biol. Reprod.* 91, 82.
- Elorza, A., Soro-Arnáiz, I., Meléndez-Rodríguez, F., Rodríguez-Vaello, V., Marsboom, G., de Cárcer, G., Acosta-Iborra, B., Albacete-Albacete, L., Ordóñez, A., Serrano-Oviedo, L., et al. (2012). HIF2 α acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol. Cell* 48, 681–691.
- Evans, R.D., and Heather, L.C. (2016). *Metabolic Pathways and Abnormalities (Surg. (United Kingdom))*.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.W., Shimoda, L., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129, 111–122.
- Green, N.H., Galvan, D.L., Badal, S.S., Chang, B.H., LeBleu, V.S., Long, J., Jonasch, E., and Danesh, F.R. (2019). MTHFD2 links RNA methylation to metabolic reprogramming in renal cell carcinoma. *Oncogene* 38, 6211–6225.
- Guimarães-Camboa, N., Stowe, J., Aneas, I., Sakabe, N., Cattaneo, P., Henderson, L., Kilberg, M.S., Johnson, R.S., Chen, J., McCulloch, A.D., et al. (2015). HIF1 α represses cell stress pathways to allow proliferation of hypoxic fetal cardiomyocytes. *Dev. Cell* 33, 507–521.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell.* 11, 619–633.
- Huang, Y., Hickey, R.P., Yeh, J.L., Liu, D., Dadak, A., Young, L.H., Johnson, R.S., and Giordano, F.J. (2004). Cardiac myocyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J.* 18, 1138–1140.
- Ikesugi, K., Mulhern, M.L., Madson, C.J., Hosoya, K.I., Terasaki, T., Kador, P.F., and Shinohara, T. (2006). Induction of endoplasmic reticulum stress in retinal pericytes by glucose deprivation. *Curr. Eye Res.* 31, 947–953.
- Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R., and Semenza, G.L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 272, 19253–19260.
- Jiao, K., Kulesa, H., Tompkins, K., Zhou, Y., Batts, L., Baldwin, H.S., and Hogan, B.L.M. (2003). An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart system. *Genes Dev.* 17, 2362–2367.
- Julia, P., Young, H., Buckberg, G., Kofsky, E., and Bugyi, H. (1990). Studies of myocardial protection in the immature heart. II. Evidence for importance of amino acid metabolism in tolerance to ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 100, 888–895.
- Kaelin, W.G., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393–402.
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K.I., Uchino, H., Takeda, E., and Endou, H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for

- large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 273, 23629–23632.
- Kenchegowda, D., Liu, H., Thompson, K., Luo, L., Martin, S.S., and Fisher, S.A. (2014). Vulnerability of the developing heart to oxygen deprivation as a cause of congenital heart defects. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e000841.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185.
- Krishnan, J., Ahuja, P., Bodenmann, S., Knapik, D., Perriard, E., Krek, W., and Perriard, J.-C. (2008). Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1 for cardiac morphogenesis and function. *Circ. Res.* 103, 1139–1146.
- Lee, Y.M., Jeong, C.-H., Koo, S.-Y., Son, M.J., Song, H.S., Bae, S.-K., Raleigh, J.A., Chung, H.-Y., Yoo, M., and Kim, K.-W. (2001). Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev. Dyn.* 220, 175–186.
- Lei, L., Mason, S., Liu, D., Huang, Y., Marks, C., Hickey, R., Jovin, I.S., Pypaert, M., Johnson, R.S., and Giordano, F.J. (2008). Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol. Cell Biol.* 28, 3790–3803.
- Lim, J., Lachenmayer, M.L., Wu, S., Liu, W., Kundu, M., Wang, R., Komatsu, M., Oh, Y.J., Zhao, Y., and Yue, Z. (2015). Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates. *PLoS Genet.* 11, e1004987.
- Lim, J.C., and Donaldson, P.J. (2011). Focus on Molecules: the cystine/glutamate exchanger (System xc⁻). *Exp. Eye Res.* 92, 162–163.
- Llurba Olive, E., Xiao, E., Natale, D.R., and Fisher, S.A. (2018). Oxygen and lack of oxygen in fetal and placental development, feto-placental coupling, and congenital heart defects. *Birth Defects Res.* 110, 1517–1530.
- Lopaschuk, G.D., and Jaswal, J.S. (2010). Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 56, 130–140.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-Inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* 40, 294–309.
- Martin-Puig, S., Wang, Z., and Chien, K.R. (2008). Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* 2, 320–331.
- Menendez-Montes, I., Escobar, B., Palacios, B., Gómez, M.J., Izquierdo-García, J.L., Flores, L., Jiménez-Borreguero, L.J., Aragones, J., Ruiz-Cabello, J., Torres, M., and Martin-Puig, S. (2016). Myocardial VHL-HIF signaling controls an embryonic metabolic switch essential for cardiac maturation. *Dev. Cell* 39, 724–739.
- Merz, E.A., Brinster, R.L., Brunner, S., and Chen, H.Y. (1981). Protein degradation during preimplantation development of the mouse. *J. Reprod. Fertil.* 61, 415–418.
- Moses, K.A., DeMayo, F., Braun, R.M., Reecy, J.L., and Schwartz, R.J. (2001). Embryonic expression of an Nkx2-5/Cre gene using ROSA26 reporter mice. *Genesis* 31, 176–180.
- Nanka, O., Krizova, P., Fikrle, M., Tuma, M., Blaha, M., Grim, M., and Sedmera, D. (2008). Abnormal myocardial and coronary vasculature development in experimental hypoxia. *Anat. Rec.* 291, 1187–1199.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart—an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* 356, 1140–1151.
- Padrón-Barthe, L., Villalba-Orero, M., Gómez-Salineró, J.M., Acín-Pérez, R., Cogliati, S., López-Olañeta, M., Ortiz-Sánchez, P., Bonzón-Kulichenko, E., Vázquez, J., García-Pavía, P., et al. (2018). Activation of serine one-carbon metabolism by calcineurin Aβ1 reduces myocardial hypertrophy and improves ventricular function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71, 654–667.
- Piao, L., Fang, Y.H., Parikh, K., Ryan, J.J., Toth, P.T., and Archer, S.L. (2013). Cardiac glutaminolysis: a maladaptive cancer metabolism pathway in the right ventricle in pulmonary hypertension. *J. Mol. Med.* 91, 1185–1197.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443.
- Puente, B.N., Kimura, W., Muralidhar, S.A., Moon, J., Amatruda, J.F., Phelps, K.L., Grinsfelder, D., Rothermel, B.A., Chen, R., Garcia, J.A., et al. (2014). The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 157, 565–579.
- Ream, M., Ray, A.M., Chandra, R., and Chikaraishi, D.M. (2008). Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R583–R595.
- Sprinson, D.B., and Rittenberg, D. (1949). The rate of utilization of ammonia for protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 180, 707–714.
- Sugishita, Y., Watanabe, M., and Fisher, S.A. (2004). Role of myocardial hypoxia in the remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract. *Dev. Biol.* 267, 294–308.
- Turchi, L., Aberdam, E., Mazure, N., Pouyssegur, J., Deckert, M., Kitajima, S., Aberdam, D., and Vrolle, T. (2008). Hif-2alpha mediates UV-induced apoptosis through a novel ATF3-dependent death pathway. *Cell Death Differ.* 15, 1472–1480.
- Vavilis, T., Delivanoglou, N., Aggelidou, E., Stamoula, E., Mellidis, K., Kaidoglou, A., Cheva, A., Pourzitaki, C., Chatzimeletiou, K., Lazou, A., et al. (2016). Oxygen–glucose deprivation (OGD) modulates the unfolded protein response (UPR) and inflicts autophagy in a PC12 hypoxia cell line model. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 701–712.
- Watanabe, Y., and Buckingham, M. (2010). The formation of the embryonic mouse heart: heart fields and myocardial cell lineages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1188, 15–24.
- Weidemann, A., and Johnson, R.S. (2007). A wrinkle in the unfolding of hypoxic response: HIF and ATF4. *Blood* 110, 3492–3493.
- Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., et al. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1514, 291–302.
- Yudkoff, M. (1997). Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia* 21, 92–98.
- Yue, M., Jiang, J., Gao, P., Liu, H., and Qing, G. (2017). Oncogenic MYC activates a feedforward regulatory loop promoting essential amino acid metabolism and tumorigenesis. *Cell Rep.* 21, 3819–3832.
- Zhang, B., Chen, Y., Shi, X., Zhou, M., Bao, L., Hatanpaa, K.J., Patel, T., DeBerardinis, R.J., Wang, Y., and Luo, W. (2020). Regulation of branched-chain amino acid metabolism by hypoxia-inducible factor in glioblastoma. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03483-1>.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283, 10892–10903.
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11, 407–420.
- Zhang, Y., Jin, Y., Williams, T.A., Burtenshaw, S.M., Martyn, A.C., and Lu, R. (2010). Amino acid deprivation induces CREBZF/Zhangfei expression via an AARE-like element in the promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1352–1357.
- Zhou, X., He, L., Wu, C., Zhang, Y., Wu, X., and Yin, Y. (2017). Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and methionine cycle in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 61.

