

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“REGULACION DE LA DINAMICA MITOCONDRIAL
DEL CARDIOMIOCITO POR IGF-1 Y
NOREPINEFRINA”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar
al grado de Doctor en Farmacología por:

CHRISTIAN BURT PENNANEN SAAVEDRA

Director de Tesis

Dr. Sergio Lavandero González

SANTIAGO - CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

CHRISTIAN BURT PENNANEN SAAVEDRA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día

_____.

Director de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela (Presidenta)

Dra. Margarita Vega

Dr. Juan Carlos Sáez

***Dedicada a Grace, por su amor,
apoyo, paciencia e impaciencia.***

Esta tesis de doctorado se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, el cual pertenece al Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula, en las Facultades de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Medicina de la Universidad de Chile.

La realización de este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca para estudios de Doctorado en Chile, CONICYT 2008 – 2010 (C.P)
- Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral, CONICYT 2009 (C.P)
- Beca de Término de Tesis Doctoral, CONICYT 2011 (C.P)
- Proyecto FONDAP 15010006 (SL)
- Proyectos FONDECYT 1080436 y 1120212 (SL)
- Proyecto MECESUP UCH0606 (SL)

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis, así como las metodologías desarrolladas, han sido publicadas y presentadas en congresos y publicaciones de la especialidad.

Publicaciones

Parra V, Verdejo H, Del Campo A, **Pennanen C**, Kuzmicic J, Iglewski M, Hill J, Rothermel B, Lavandero S. The complex interplay between mitochondrial dynamics and cardiac metabolism. *J Bioenerg Biomembr* ; 43: 47–51, 2011.

Kuzmicic J, Del Campo A, Lopez C, Morales P, **Pennanen C**, Bravo R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro P, Verdejo H, Parra V, Chiong M, Lavandero S. Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. *Rev. Esp. Cardiol.* 64: 916-923, 2011.

Zepeda R, Chiong M, **Pennanen C**, Pedrozo Z, Parra V, Kuzmicic J, Troncoso R, Zorzano A, Lavandero S. Protective role of mitochondrial fusion in ischemia reperfusion injury. Manuscrito en preparación, 2012.

Pennanen C, Parra V, del Campo A, Zepeda R, Verdejo H, Gutierrez T, Rivera P, Morales P, Lopez C, Chiong M, Lavandero S. Mitochondrial dynamics plays a critical role in the development of pathological cardiac hypertrophy, in a calcineurin regulated pathway. Manuscrito en preparación, 2012.

Congresos

Pennanen C, Lavadero S. “Dinámica mitocondrial en cultivo primario de cardiomiocitos hipertrofiados con norepinefrina; XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología, Coquimbo, 2008.

González L, **Pennanen C**, Herrera A, Jalil J, Ocaranza M, Lavadero S. “Angiotensina 1-9, un nuevo regulador de la hipertrofia cardiaca”. XXIII reunión anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile, Pucón, 2009.

Pennanen C, Morales C, Parra V, Zepeda R, Verdejo H, Bravo R, Chiong M, Lavadero S. “Asociación entre dinámica mitocondrial y respuesta hipertrofica en el cardiomiocito” XXIII Reunión anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile, Pucón 2009.

Pennanen C, Morales C, Parra V, Morales P, Chiong M, Lavadero S. “Regulación de la dinámica mitocondrial por catecolaminas en la hipertrofia del cardiomiocito” XXXII congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Valdivia 2010.

Pennanen C, Rivera P, Morales P, Parra V, Chiong M, Lavadero S. “Role of mitochondrial dynamics on the pathophysiology of cardiomyocyte hypertrophy” Sociedad Bioquímica y Biología Molecular, Valdivia, 2011.

AGRADECIMIENTOS

Siempre es difícil brindar reconocimiento a las personas que de alguna manera han estado junto a uno en los momentos importantes, sin que alguna de estas inmerecidamente sea marginada. Si esto pasara en las siguientes líneas, sepan todos aquellos que han estado cerca, que este agradecimiento se extiende también a ustedes.

Quisiera partir agradeciendo a mi director de Tesis, el Dr. Sergio Lavandero, por la confianza otorgada al permitirme realizar mi tesis en su laboratorio y por su constante apoyo y enseñanzas.

A los integrantes de mi comisión evaluadora, Dra María Antonieta Valenzuela, Dra. Margarita Vega y Dr. Juan Carlos Sáez , por que sus intervenciones constituyeron un enorme aporte para el desarrollo del presente trabajo.

Con especial cariño quisiera agradecer a mis compañeros y amigos de laboratorio, Rodrigo, Andrea del C, Ariel, Valentina, Hugo, Jovan, Felipe, Clarita, Mario, Fidel, Zully, David, Daniela, Jeka, Andrea R, Pablo A, Natalia, Carolina, Tomás, Cesar, Pablo M, Cristian, Pablo R, Barbra, Roberto, Camila, Damian, Cecilia, Gloria, Ramiro y Marcela, ya que gracias a ellos el trabajo se convirtió en una experiencia tremendamente enriquecedora.

A las personas encargadas del departamento de postgrado, Myriam, Helen y Hector, por estar siempre dispuestos a entregar su ayuda.

A mi compañera de casi media vida Grace, por los momentos llenos de cariño y apoyo, y también por aquellos hechos de agraz, pues todos los instantes a tu lado han sido importantes.

Por último, he decidido terminar agradeciendo a las personas que han estado a mi lado desde siempre, mis padres Victoria y Allan, y mis hermanas Liliette y Victoria, debido a que su amor y apoyo en todos los sentidos, han sido fundamentales para mi desarrollo.

Índice

1. ABREVIATURAS	12
2. RESUMEN	15
3. SUMMARY	18
4. INTRODUCCIÓN	20
4.1. Hipertrofia cardíaca	20
4.1.1. Definición	20
4.1.2. Estímulos hipertróficos y vías de señalización en el cardiomiocito	22
Estrés mecánico	22
Principales estímulos y vías de señalización en hipertrofia cardíaca fisiológica	23
Principales estímulos y vías de señalización en hipertrofia cardíaca patológica	25
4.1.3. Eventos génicos en hipertrofia cardíaca	27
4.1.4. Cambios metabólicos en el cardiomiocito hipertrófico	30
4.2. Mitocondria y patología cardíaca	33
4.2.1. Mitocondria e insuficiencia cardíaca	34
4.2.2. Mitocondria, eventos de isquemia - reperfusión y preacondicionamiento isquémico	35
4.2.3. Mitocondria y cardiopatía diabética	36
4.2.4. Mitocondria y patología vascular	38
4.3. Dinámica mitocondrial	39
4.3.1. Definición	39
4.3.2. Maquinaria molecular de la fusión mitocondrial	40
Proteínas involucradas.	40
Regulación.	41
Función.	43
4.3.3. Maquinaria molecular de la fisión mitocondrial	44
Proteínas involucradas.	44
Regulación.	45
Función.	46
4.4. Dinámica mitocondrial en la fisiopatología cardíaca	48

5. HIPÓTESIS	53
6. OBJETIVOS	53
7. MATERIALES Y MÉTODOS	54
7.1. Reactivos	54
7.2. Modelo experimental	55
7.3. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata	55
7.4. Estímulo hipertrófico	56
7.5. Tratamiento adenoviral y uso de plasmidios	56
7.6. Preparación de extractos celulares totales	57
7.7. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas	57
7.8. Western blot	58
7.9. Inmunofluorescencia indirecta	58
7.10. Citometría de flujo	59
7.11. Determinación de los niveles intracelulares de ATP	60
7.12. Medición de la velocidad del consumo de oxígeno celular	61
7.13. Visualización de la morfología mitocondrial	62
7.14. Análisis digital de las imágenes	62
7.15. Análisis estadístico	63
8. RESULTADOS	64
8.1. Objetivo 1: Determinar si IGF-1 y norepinefrina modifican la morfología y actividad de la red mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos	64
8.1.1. Efecto de los estímulos prohipertróficos sobre la morfología mitocondrial	64
8.1.2. Determinación de parámetros metabólicos mitocondriales	73
8.2. Objetivo 2: Determinar expresión y niveles de proteínas de fusión/fisión mitocondrial en ambos modelos de hipertrofia y posibles mecanismos transduccionales implicados	77
8.2.1. Efecto de los estímulos prohipertróficos sobre los niveles de las proteínas asociadas a dinámica mitocondrial	77
8.2.2. Participación de la fosfatasa calcineurina en la fragmentación de la red mitocondrial mediada por NE	81
8.3. Objetivo 3: Evaluar la participación de proteínas de fusión/fisión mitocondrial en el crecimiento hipertrófico de cardiomiocitos inducido por IGF-1 y norepinefrina	86
8.3.1. Participación de la proteína Mfn2 en el desarrollo de hipertrófia cardíaca	86

Efecto del adenovirus AsMfn2 sobre el área y la sarcomerización del cardiomiocito	87
Reexpresión del programa genético fetal en cardiomiocitos transducidos con adenovirus AsMfn2	89
8.3.2. Participación de la proteína Drp-1 en el desarrollo de hipertrofia cardíaca . .	91
Efecto del adenovirus K38A sobre el área y la sarcomerización del cardiomiocito	91
Reexpresión del programa genético fetal en cardiomiocitos transducidos con adenovirus K38A	93
9. DISCUSION	95
9.1. Cambios en la morfología mitocondrial durante el desarrollo de hipertrofia cardíaca	96
9.2. Diferencias metabólicas en modelos de hipertrofia fisiológica y patológica	102
9.3. Relación entre vías transduccionales asociadas a hipertrofia cardíaca y a dinámica mitocondrial	106
9.4. Participación de las proteínas Mfn2 y Drp-1 en el desarrollo de hipertrofia cardíaca .	110
9.5. Proyecciones	113
10. CONCLUSIONES	117
Referencias	118

Índice de figuras

1.	<i>Tipos de hipertrofia cardíaca y principales vías transduccionales activadas por IGF-1 y NE en el cardiomiocito</i>	28
2.	<i>Acciones y proteínas principales involucradas en la dinámica mitocondrial</i> . . .	49
3.	<i>Efecto de NE sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito</i>	66
4.	<i>Efecto de IGF-1 sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito</i>	67
5.	<i>Efecto de los estímulos prohipertróficos sobre la viabilidad y la inducción de la apoptosis</i>	68
6.	<i>Efecto de NE e IGF-1 sobre el contenido mitocondrial</i>	70
7.	<i>Sarcomerización y morfología mitocondrial en cardiomiocitos estimulados con NE</i>	72
8.	<i>Potencial de membrana mitocondrial en cardiomiocitos estimulados con IGF-1 y NE</i>	74
9.	<i>Generación de ROS en cardiomiocitos tratados con los estímulos prohipertróficos</i>	75
10.	<i>Efecto de los estímulos prohipertróficos sobre el contenido de ATPi</i>	76
11.	<i>Consumo de oxígeno en cardiomiocitos estimulados con NE</i>	76
12.	<i>Niveles de las proteínas moduladoras de la dinámica mitocondrial</i>	78
13.	<i>Determinación de formas largas y cortas de la proteína OPA1</i>	79
14.	<i>Distribución subcelular de Drp-1 en cardiomiocitos tratados con NE</i>	80
15.	<i>Participación del receptor adrenérgico tipo α en la fisión mitocondrial del cardiomiocito mediada por NE</i>	82
16.	<i>Efecto de NE sobre los niveles de RCAN 1.4 y desfosforilación de Drp-1</i>	83
17.	<i>Efecto de los adenovirus CAIN y CN sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito</i>	85
18.	<i>Efecto del adenovirus AsMfn2 sobre la morfología de la red mitocondrial y los niveles de la proteína Mfn2 en el cardiomiocito.</i>	87
19.	<i>Efecto de NE, IGF-1 y AsMfn2 sobre la sarcomerización del cardiomiocito</i>	88
20.	<i>Área celular y sarcomerización en cardiomiocitos tratados con los estímulos prohipertróficos y/o transducidos con AsMfn2</i>	89
21.	<i>Efecto del adenovirus AsMfn2 sobre la reexpresión del programa genético fetal en cardiomiocitos</i>	90
22.	<i>Efecto del adenovirus K38A sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito</i>	91
23.	<i>Efecto de NE, IGF-1 y el adenovirus K38A sobre la sarcomerización del cardiomiocito</i>	92
24.	<i>Área celular y sarcomerización en cardiomiocitos tratados con los estímulos prohipertróficos y/o transducidos con el adenovirus K38A</i>	93
25.	<i>Efecto del adenovirus K38A sobre la reexpresión del programa genético fetal en cardiomiocitos</i>	94
26.	<i>Relación entre proteínas moduladoras de la dinámica mitocondrial y vías transduccionales asociadas a hipertrofia cardíaca</i>	109
27.	<i>Modelo final</i>	116

1. ABREVIATURAS

AC	: Adenilato ciclase
Acetil-CoA	: Acetil coenzima A
AdCN	: Adenovirus que expresa una calcineurina constitutivamente activa
AngII	: Angiotensina II
ANP	: Péptido natriurético auricular
ANT	: Translocador de nucleótidos de adenina
AsMfn2	: Adenovirus antisentido para Mfn2
CAIN	: Adenovirus que expresa un péptido inhibitorio para calcineurina
CaM	: Calmodulina
CCCP	: Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
CK	: creatinaa quinasa
CN	: Calcineurina
CPT	: Carnitina palmitoíl transferasa
DAG	: Diacilglicerol
DHR	: 1,2,3 Dihidrorodamina
Drp-1	: Proteínas relacionada a la familia de las dinaminas tipo 1
ERR	: Receptor relacionado a estrógenos
ET-1	: Endotelina-1
FBS	: Suero fetal bovino
FCS	: Suero fetal de ternera
FGF	: Factor de crecimiento de fibroblastos
Fis-1	: Proteína de la fisión mitocondrial
GSK3	: Proteína quinasa glicógeno sintetasa 3
IGF-1	: Factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1
IP3	: Inositol 1, 4, 5 trifosfato

IR	: Isquemia-reperfusión
K38A	: Adenovirus dominante negativo para Drp-1
MAPK	: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MARCH-V	: Proteína mitocondrial E3 ubiquitin ligasa
MCAD	: Acil-coA deshidrogenasa de cadena media
MFF	: Factor de fisión mitocondrial
Mfn1/2	: Proteína mitofusina 1-2
MHC	: Cadena pesada de la miosina
MIB	: Proteína de unión a mitofusina
MMP	: Metaloproteinasa de la matriz extracelular
mtCK	: creatina quinasa mitocondrial
MTG	: Mitotracker Green
NE	: Norepinefrina
NO	: Oxido nitrico
OMA1	: Metaloproteasa mitocondrial dependiente de zinc
OPA-1	: Proteína de la atrofia óptica tipo 1
PDH	: Piruvato deshidrogenasa
PGC-1 α	: Coactivador de receptores PPAR
PI	: Yoduro de propidio
PI3K	: Proteína fosfatidil-inositol-3-quinasa
PIP2	: Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato
PKA	: Proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC	: Proteína quinasa C
PLC	: Fosfo lipasa C
PPAR	: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PTPM	: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial

RA : Receptor adrenérgico
ROS : Especies reactivas de oxígeno
SKA : α actina esquelética
SORB : Sorbitol
TFAM : Factor transcripcionas mitocondrial A
TGF- β : Factor de crecimiento trasnformante β
TMRM : Tetrametilrodamina metil éster

2. RESUMEN

La hipertrofia cardíaca es una respuesta adaptativa desencadenada por una mayor demanda de trabajo contráctil por parte del cardiomiocito, su desarrollo es el resultado de múltiples factores, existiendo una hipertrofia cardíaca de tipo fisiológica, reversible, sin signos histológicos de fibrosis, generada por factores de crecimiento como el factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1) y otra de tipo patológico, irreversible, cuya progresión genera insuficiencia cardíaca y cardiomiopatía dilatada, asociada a la acción de agonistas de receptores acoplados a proteína G como norepinefrina (NE), entre otros. Un aspecto importante a considerar es el metabolismo energético del corazón y su participación en el proceso hipertrófico, puesto que es uno de los órganos con mayor tasa de consumo de ATP y una disminución en la disponibilidad energética se traduce en alteraciones de la actividad contráctil y en el desarrollo de distintas patologías cardíacas. La mitocondria es el organelo responsable de la generación de energía en la célula, en el cardiomiocito se encuentran ubicadas entre las miofibrillas y ocupan sobre el 50 % del volumen citoplasmático en el músculo cardíaco. Actualmente se reconoce la existencia de un retículo mitocondrial, donde estos organelos forman verdaderos “cables energéticos” cuya morfología y función dependen del equilibrio entre los procesos de fisión y fusión mitocondrial. Diversas proteínas, entre ellas OPA-1 y Mfn1/2 se relacionan con fusión mitocondrial mientras que Drp-1 y Fis-1 se asocian al proceso inverso.

Tomando en cuenta la relación entre metabolismo e hipertrofia cardíaca, resulta evidente la importancia que adquieren los procesos de dinámica mitocondrial al regular la función de este organelo. Hasta la fecha se desconoce qué tipo de proceso de dinámica mitocondrial predomina en hipertrofia cardíaca, ni en qué forma la fusión/fisión de la mitocondria afecta el desarrollo del proceso hipertrófico en el cardiomiocito. Por esta razón, el objetivo principal del presente trabajo consistió en determinar si los estímulos prohipertróficos IGF-1 o NE, alteran la morfología y actividad mitocondrial. Para este fin, cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas se trataron con IGF-1 (10 nM) o NE (10 μ M) entre 0 - 48 h. La red mitocondrial se visualizó mediante microscopía confocal y tinción con mitotracker Green. Los resultados muestran que desde las 24 h, NE

produjo fisión de la red mitocondrial, identificada por un incremento en el porcentaje de células con fragmentación mitocondrial (+26 %, $p < 0,05$ y +39 %, $p < 0,001$), en el número relativo de mitocondrias por célula (+42 %, $p < 0,005$ y +65 %, $p < 0,001$) y disminución en el volumen mitocondrial promedio (-24 %, $p < 0,005$ y -47 %, $p < 0,001$, para las 24 y 48 h, respectivamente. Además, luego de los cambios morfológicos se observó una disminución del potencial de membrana mitocondrial (-23 %, $p < 0,05$), del contenido intracelular de ATP (-27 %, $p < 0,05$) y de la velocidad de consumo de oxígeno (-24 %, $p < 0,05$), después de 48 h de exposición a NE. No se observaron cambios morfológicos ni metabólicos en la red mitocondrial de cardiomiocitos tratados con IGF-1. Igualmente se observó que la fisión mitocondrial inducida por NE se asoció con un incremento en la migración de Drp-1 a mitocondria, evaluado a través de un incremento en los niveles de Drp-1 en fracción mitocondrial y aumento en la colocalización entre Drp-1 y Fis-1.

Calcineurina es una de las proteínas transduccionales de mayor relevancia en la respuesta hipertrófica inducida por NE, describiéndose que participa en la modulación de la dinámica mitocondrial mediante desfosforilación de Drp-1, incrementando su actividad. Para evaluar su participación, cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas se transdujeron con un adenovirus que expresa la subunidad catalítica de calcineurina constitutivamente activa (AdCN) o con uno que codifica un péptido inhibitorio para calcineurina (CAIN), observándose que su inhibición redujo significativamente los cambios morfológicos en la red mitocondrial inducidos por NE y que su sobreexpresión es suficiente para producir fisión mitocondrial. Además, el uso de herramientas adenovirales, también permitió determinar que una disminución en los niveles de Mfn2 produce fisión mitocondrial e induce la respuesta hipertrófica en el cardiomiocito, determinada como un incremento en el área celular, la sarcomerización y la reexpresión de biomarcadores asociados al proceso, mientras que la disminución en la actividad de Drp-1 fusiona la red mitocondrial y previene la hipertrofia cardíaca en los cardiomiocitos tratados con ambos estímulos.

En base a estos resultados, se puede concluir que durante el desarrollo del proceso hipertrófico patológico del cardiomiocito se produce fragmentación de la red mitocondrial, a través de un mecanismo que involucra el incremento en la migración de Drp-1 a

membrana mitocondrial y la participación de la fosfatasa calcineurina, todo esto asociado a una disminución en diversos parámetros metabólicos. Por otro lado, la modulación en los niveles o actividad de proteínas asociadas a los procesos de fusión y fisión mitocondrial, modificó significativamente el desarrollo del proceso hipertrófico, por lo que colectivamente, estos resultados revelan la importancia de los procesos de dinámica mitocondrial en el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

3. SUMMARY

Regulation of cardiomyocyte mitochondrial dynamics by IGF-1 and norepinephrine

Cardiac hypertrophy is an adaptive response induced by an increased contractile work. Physiological cardiac hypertrophy is reversible, without histological signs of fibrosis, generated by growth factors such as insulin like growth factor 1 (IGF-1). In contrast, pathological cardiac hypertrophy is irreversible, progress to heart failure and dilated cardiomyopathy and it has been associated with the action of G protein-coupled receptors agonists such as norepinephrine. An important aspect to consider is the heart's energy metabolism and its role in the hypertrophic process, since myocardial tissue is one of the organs with the highest rate of ATP consumption. A decrease in energy availability results in detrimental changes in contractile activity and the development of distinct cardiac diseases. Mitochondria have a key role in energy generation in the cardiomyocyte are located between the myofibrils and occupy over 50% of cytoplasmic volume. The existence of a mitochondrial reticulum is recognized now and these organelles are true "power-transmitting cables" whose morphology and function depend on the balance between mitochondrial fission and fusion. Several proteins like OPA-1 and Mfn1/2 have been linked to mitochondrial fusion while Drp-1 and Fis-1 are associated with mitochondrial fission.

Taking into account the relationship between metabolism and cardiac hypertrophy, the role of mitochondrial dynamics in the development of hypertrophic growth must be relevant. However, the mitochondrial morphology in the hypertrophic cardiomyocyte, or how the mitochondrial fusion/fission events affect the development of the cardiomyocyte hypertrophic process is unknown. For this reason, our main objective was to investigate whether IGF-1 or NE stimulation produces changes in morphology and mitochondrial activity. For this goal, primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were treated with IGF-1 (10 nM) or NE (10 μ M) for 0 - 48 h. The mitochondrial network was visualized by confocal microscopy and Mitotracker Green staining. The results show that NE triggered mitochondrial fission after 24 hours of exposure, identified by an increase in

the percentage of cells with mitochondrial fragmentation (+26%, $p < 0.05$ and +39%, $p < 0.001$), increase in the relative number of mitochondria per cell (+42%, $p < 0.005$ and +65%, $p < 0.001$) and decrease in the average mitochondrial volume (-24%, $p < 0.005$ and -47%, $p < 0.001$, for the 24 and 48 h respectively). In addition to these, morphological changes, decreases in mitochondrial membrane potential (-23%, $p < 0.05$), intracellular ATP content (-27%, $p < 0.05$) and oxygen consumption rate (-24%, $p < 0.05$) were also observed after 48 h of exposure to NE. No morphological or metabolic changes in the mitochondrial network were detected in cardiomyocytes treated with IGF-1. NE-induced mitochondrial fission was associated with an increase in the migration of Drp-1 to mitochondria, evaluated by increase in levels of Drp-1 in mitochondrial fraction and by Drp-1 and Fis-1 colocalization.

Calcineurin is one of the most important signaling molecules in the hypertrophic response induced by NE. This phosphatase is also involved in the modulation of mitochondrial dynamics by dephosphorylation of Drp-1, increasing its activity. To evaluate its role, culture neonatal rat cardiomyocytes were transduced with an adenovirus expressing the calcineurin catalytic subunit constitutively active (AdCN) an inhibitory peptide (CAIN). Inhibition of calcineurin significantly decreased morphological changes in the mitochondrial network triggered by NE and AdCN overexpression being sufficient to cause mitochondrial fission. Using other adenoviral tools, we show that a decrease in Mfn2 levels causes mitochondrial fission, and induces the cardiomyocyte hypertrophic response, determined by increases in cell area, sarcomerización and biomarkers associated with hypertrophic response. The decrease in Drp-1 activity, stimulated mitochondrial fusion and prevented cardiac hypertrophy induced by NE and IGF-1.

Collectively our results suggest, that mitochondrial network is fragmented during the development of pathological cardiomyocyte hypertrophy, through a mechanism involving the migration of Drp1 to the mitochondria and the phosphatase calcineurin activation, associated with decreases in several metabolic parameters. In addition, the modulation in the activity of proteins associated with mitochondrial fusion/fission, produced significant changes in the development of hypertrophy. Collectively these results demonstrate the importance of mitochondrial dynamics in the development of cardiac hypertrophy.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Hipertrofia cardíaca

4.1.1. Definición

El tejido cardíaco está compuesto por distintos tipos celulares entre los cuales se distinguen principalmente cardiomiocitos, fibroblastos y en menor proporción células endoteliales y de la musculatura lisa vascular. Los cardiomiocitos son los responsables del trabajo contráctil y conforman entre el 30-40% del número total de células, pero ocupan aproximadamente un 75% del volumen cardíaco [1, 2]. Estas células proliferan activamente durante la etapa fetal manifestando capacidad contráctil a muy temprana edad, sin embargo su actividad mitótica disminuye en etapas tardías de la embriogénesis para reducirse casi completamente después del nacimiento. Al no poder reentrar en el ciclo celular, el cardiomiocito cuando se expone a estímulos proliferativos aumenta su tamaño, lo que se conoce como proceso hipertrófico, éste proceso, además conlleva un incremento en la síntesis proteica y un cambio en la organización de la estructura sarcomérica, reflejándose a nivel macroscópico como un aumento en la masa muscular del corazón [3, 4]. La hipertrofia cardíaca (HC) se considera como una respuesta adaptativa, desencadenada por una mayor demanda de trabajo contráctil por parte del cardiomiocito, como consecuencia de un aumento del estrés biomecánico. En un comienzo, el crecimiento hipertrófico es paralelo al aumento de la angiogénesis cardíaca y por ello es de carácter fisiológico, mejorando la eficiencia cardíaca frente al estrés. Sin embargo, cuando la angiogénesis cesa y prosigue el proceso hipertrófico, este cuadro se torna patológico, generándose disfunción ventricular e insuficiencia cardíaca [5, 6]. El mecanismo fisiológico permite la adaptación a modificaciones hemodinámicas de corto plazo y ocurre en respuesta a cambios adaptativos, es típica de deportistas y embarazadas, no conduce a procesos patológicos y es reversible [7], por otro lado, la hipertrofia patológica es asociada con una progresiva dilatación ventricular, el estímulo biomecánico prolongado provoca una descompensación en el crecimiento celular lo que finalmente culmina con muerte de cardiomiocitos que son reemplazados por tejido

fibroso, trayendo como consecuencia una disminución en la capacidad contráctil del corazón. Además, se produce un remodelado estructural irreversible del tejido cardíaco caracterizado por alteraciones en la matriz extracelular, pérdida en la respuesta de receptores β adrenérgicos, cambios metabólicos y modificación de la expresión en las isoformas de las proteínas contráctiles, produciéndose un cuadro irreversible [8].

El proceso hipertrófico también puede ser subdividido según la naturaleza del estímulo hemodinámico que lo genera, observándose 2 tipos: la hipertrofia concéntrica, provocada por sobrecarga de presión y caracterizada por adición paralela de sarcómeros con crecimiento lateral del cardiomiocito y aumento en el grosor de la pared ventricular, inicialmente sin cambios en el volumen de la cámara, y la hipertrofia excéntrica, donde los sarcómeros son agregados en serie y la célula aumenta de tamaño longitudinalmente como respuesta a la sobrecarga de volumen, produciéndose adelgazamiento de la pared ventricular con un aumento en la capacidad volumétrica de la cámara [5]. Estos distintos tipos de crecimiento pueden observarse tanto en hipertrofia patológica como fisiológica, por ejemplo, un estímulo patológico que produzca sobrecarga de presión (como hipertensión arterial o estenosis aórtica), generará un incremento en la fuerza aplicada sobre la pared ventricular durante la sístole, produciéndose hipertrofia concéntrica, mientras que un estímulo patológico que genere sobrecarga de volumen (como regurgitación aórtica o fístulas arteriovenosas) producirá hipertrofia excéntrica. En lo que respecta al crecimiento fisiológico, se sabe que el embarazo y ejercicios aeróbicos (como natación y atletismo) incrementan el retorno venoso al corazón generando sobrecarga de volumen e hipertrofia excéntrica con aumento en la capacidad de la cámara ventricular y en el grosor de la pared en forma proporcional, y ejercicios isométricos (como levantamiento de pesas) producen principalmente sobrecarga de presión e hipertrofia concéntrica [9].

La consecuencia que provocan los diversos factores hipertróficos sobre las vías de señalización intracelular en el músculo cardíaco y la identificación de los mecanismos que favorecen la transición de hipertrofia fisiológica a una de tipo patológica, aún no han sido esclarecidos completamente, sin embargo diversos estudios han mostrado interesantes resultados contribuyendo a la comprensión del proceso.

4.1.2. Estímulos hipertróficos y vías de señalización en el cardiomiocito

La hipertrofia cardíaca es un factor de riesgo independiente que se manifiesta en distintos tipos de patologías como hipertensión arterial, enfermedad isquémica, valvulopatías e insuficiencia cardíaca entre otras, se ha descrito una gran variedad de factores inductores del crecimiento hipertrófico en el cardiomiocito, éstos pueden subdividirse en aumento de la tensión mecánica y la exposición a factores neurohumorales [10].

Estrés mecánico El estiramiento mecánico se considera como el estímulo primario en el proceso hipertrófico, pues por sí solo aumenta la síntesis proteica y activa la expresión de perfiles genéticos característicos de hipertrofia [11, 12]. Se han identificado diversas dianas moleculares como posibles responsables de la mecanotransducción de señales por estiramiento mecánico, entre éstas se incluyen a: a) Integrinas que censan cambios en la matriz extracelular y transducen intracelularmente por la interacción con proteínas del citoesqueleto y reclutación de quinasas a través de su tallo citoplasmático [13, 14]; b) Intercambiador Na^+/H^+ , que al ser inhibido, produce una disminución marcada de la activación de ERK y la estimulación de la síntesis proteica inducidas por estrés mecánico [15]; y c) La proteína LIMP ubicada en el disco Z del sarcómero, la cual cumpliría un rol importante en la mecanorecepción [16].

El estrés mecánico, principalmente activa tres vías de transducción de señales relacionadas con hipertrofia cardíaca:

1. Cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que corresponde a una superfamilia de serina/treonina quinasas con participación en el crecimiento hipertrófico mediante la modulación de sustratos nucleares como c-jun, c-myc, ATF-2, p62 y la activación de otras quinasas como la vía PI3K/AKT.
2. Vía JAK/STAT que frente a estrés mecánico es activada a través de gp130. Luego de la activación por JAKs, STATs migra al núcleo donde induce la expresión génica [17].
3. Vía Ca^{2+} -calcineurina-NFAT3, donde el último componente corresponde a un factor

transcripcional de gran importancia en el proceso hipertrófico generado por diversos estímulos, observándose una interacción sinérgica entre NFAT3 y GATA4 para producir la respuesta hipertrófica. Además en un trabajo reciente se determinó que el estrés mecánico produce la activación de calcineurina a través de un mecanismo que requiere la presencia del receptor AT1 para angiotensina II, pero no de su ligando [18].

Junto con ejercer un efecto directo en el crecimiento hipertrófico, se ha señalado que el estiramiento mecánico del cardiomiocito también genera una respuesta indirecta a través de la liberación de factores neurohumorales que provocarían hipertrofia mediante mecanismos autocrinos y/o paracrinos, al respecto se ha determinado que factores de crecimiento, como el **factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1)**, estarían relacionados al desarrollo de hipertrofia cardíaca fisiológica, mientras que la acción de agonistas de receptores acoplados a proteína G heterotrimérica, como **norepinefrina (NE)**, generarían la respuesta patológica [10, 17].

Principales estímulos y vías de señalización en hipertrofia cardíaca fisiológica

Factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e IGF-1 corresponden a un grupo importante entre los diversos estímulos humorales asociados al proceso hipertrófico. Estos péptidos interactúan con receptores de membrana que presentan actividad tirosinquinasa intrínseca (IGF-1, FGF) o actividad serina/treonina quinasa (TGF- β), siendo capaces de promover la activación de distintas vías transduccionales como MAPK (ERK, JNK, p38), PI3K/AKT y PLC/PKC en el cardiomiocito [19]. Otros estímulos asociados al desarrollo de hipertrofia cardíaca fisiológica son el factor transcripcional HSF1 (Heat Shock Transcriptional Factor 1), que regula la expresión de genes como *Hsp70* y *Hsp27*, cuyo incremento se observa en corazones de ratas sometidas a entrenamiento físico [20] y la hormona tiroidea, que interactúa con receptores nucleares regulando directamente la expresión de genes cardíacos como: α y β -MHC, troponina cardíaca, SERCA2a y canales de potasio dependientes de voltaje [21–23]. Entre todos estos estímulos, IGF-1 ha sido el mejor caracterizado en lo que respecta al desarrollo de hipertrofia cardíaca.

IGF-1 es un péptido sintetizado principalmente a nivel hepático, mediante estimulación por la hormona del crecimiento y es esencial para el desarrollo fetal y posnatal, además IGF-1 también es producido en el corazón en respuesta a sobrecarga hemodinámica por actividad física [24]. Diversas evidencias señalan que la acción de IGF-1 en el músculo cardíaco induce hipertrofia de tipo adaptativa o fisiológica, por ejemplo se ha observado que en ratones que presentan un incremento en la expresión cardíaca de IGF-1 o de su receptor, se induce el crecimiento hipertrófico con una función cardíaca normal o incrementada, sin signos histopatológicos como necrosis o fibrosis, lo que concuerda con un proceso hipertrófico de tipo adaptativo [25, 26]. Por otro lado, *Kim et al.* observaron que ratones transgénicos, cuyos cardiomiocitos carecían del receptor de IGF-1, presentaban una disminución en la respuesta hipertrófica cuando eran sometidos a actividad física [27].

La interacción entre IGF-1 y su receptor produce la activación de la proteína fosfatidilinositol-3-quinasa clase I α [PI3K(p110 α)]. Las enzimas PI3K, corresponden a una familia de quinasas de lípidos relacionadas a supervivencia, crecimiento y proliferación celular, se dividen en tres clases (clase I, II, III) y a su vez las de clase I se subdividen en IA, compuestas por una subunidad catalítica p110 (α, β, δ) y una subunidad regulatoria p85 o p55, y en clase IB, compuestas por una subunidad catalítica p110 γ , regulada por una subunidad p101. Entre las PI3Ks de clase I las más abundantes en corazón son p110 α y p110 γ [28]. *McMullen et al.* demostraron que PI3K(p110 α) desempeña un papel clave en el desarrollo de hipertrofia fisiológica y no patológica, observando que ratones transgénicos que expresaban un dominante negativo para esta proteína a nivel cardíaco, no generaban la respuesta hipertrófica cuando eran sometidos a un incremento en la actividad física mediante natación, al contrario de los animales transgénicos con bandedo aórtico [29]. PI3K(p110 α) interactúa con el fosfolípido de membrana fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2), produciendo su fosforilación en la posición 3 del anillo inositolico, lo que genera una señal de reclutamiento para la proteína quinasa AKT y para su activador la proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositido (PDK-1) a la membrana, forzando la colocalización de ambas proteínas y dando como resultado la activación de AKT [30]. Un estudio reciente señaló que el ejercicio y un aumento en la actividad de la vía PI3K/AKT

en ratones con cardiomiopatía dilatada previene la progresión de la enfermedad en parte por la inhibición de las cascadas de señalización involucradas en el proceso patológico [31].

Principales estímulos y vías de señalización en hipertrofia cardíaca patológica

Como se mencionó anteriormente, agonistas de receptores heptahelicoidales acoplados a proteína G heterotrimérica se han asociado al desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica, encontrándose una gran variedad de sustancias entre las cuales destacan: endotelina-1 (ET-1), que genera una potente inducción hipertrófica a través de la vía MAPK y además, pareciera tener cierta participación en la supervivencia del cardiomiocito [32]; prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), que mediaría la respuesta hipertrófica por la activación de PKC, p38, ERK, y donde también pareciera tener un rol importante la fosfatasa calcineurina [33]; angiotensina II (AngII), que es la principal sustancia vasoactiva del sistema renina-angiotensina con una gran variedad de acciones fisiopatológicas como vasoconstricción, liberación de aldosterona y crecimiento celular [34].

El sistema adrenérgico desempeña un papel fundamental en la regulación de la función cardíaca, catecolaminas como norepinefrina (NE) inducen la expresión del fenotipo hipertrófico a través de la interacción con receptores adrenérgicos de tipo α y β ($RA\alpha$ y $RA\beta$). En el corazón se expresan tres isoformas del $RA\alpha_1$: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} y tres isoformas del $RA\beta$: β_1 , β_2 y β_3 , siendo éstos últimos los más predominantes a nivel cardíaco con una relación $\beta_1:\beta_2$ de 80:20, mientras que la expresión de los $RA\alpha$ es más variable entre las distintas especies y comprenden solo un 20% respecto al total de receptores adrenérgicos presentes en el corazón [35, 36]. $RA\beta_1$ y $RA\beta_2$ se encuentran principalmente regulando la actividad contráctil del cardiomiocito, ambos receptores están acoplados a proteína Gs, activando adenilato ciclasa (AC), incrementando los niveles de AMP cíclico (cAMP) y activando la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la activación de PKA es de gran importancia para la mantención de la actividad contráctil, debido a que PKA regula la recaptación y el influjo de Ca^{++} mediante la fosforilación de canales de Ca^{2+} tipo L y de fosfolamban [37]. $RA\beta_2$ también se encuentra acoplado a proteína Gi, donde además de producir inhibición de AC, participaría en la

activación de la vía MAPK a través de las subunidades $G\beta\gamma$, en un proceso regulado por la fosforilación del receptor mediante PKA [38].

Los pacientes con insuficiencia cardíaca presentan un incremento en las catecolaminas circulantes, produciéndose un aumento inicial en la capacidad contráctil del corazón, sin embargo, el incremento prolongado del tono adrenérgico genera deterioro en la actividad cardíaca y se asocia con una desensibilización de $RA\beta$ s [39]. Además, un estudio mostró que en ratones transgénicos que expresaban en corazón un dominante negativo para la quinasa de $RA\beta$ s, responsable de la desensibilización de estos receptores, se generaba protección en contra del desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica e insuficiencia cardíaca [40]. Los $RA\alpha_1$, a pesar de presentar una proporción menor en tejido cardíaco, desempeñan un rol importante en el proceso hipertrófico. El principal $RA\alpha_1$ expresado en corazón es el α_{1B} , donde participaría regulando la actividad contráctil y el crecimiento cardíaco, $RA\alpha_{1D}$ principalmente estaría regulando la presión arterial, mientras que la activación del $RA\alpha_{1A}$ pareciera presentar efectos protectores frente al desarrollo del proceso hipertrófico patológico e insuficiencia cardíaca [9]. Los tres $RA\alpha_1$ se encuentran acoplados a proteína Gq/11, por lo tanto, la interacción con su ligando genera la activación de fosfolipasa C (PLC), la cual es reclutada a membrana celular hidrolizando a PIP_2 , liberando inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). IP_3 se une a su receptor en el retículo sarcoplásmico liberando Ca^{2+} hacia el citosol, que junto a DAG producen la activación de la proteína quinasa C (PKC). Esta proteína posee diversas isoformas que cumplen roles distintos en la hipertrofia cardíaca, al respecto las isoformas clásicas, $PKC\alpha$ y $PKC\beta$, participan en el desarrollo de hipertrofia patológica, mientras que las isoformas no convencionales, $PKC\delta$ y $PKC\varepsilon$, cuya activación es independiente de Ca^{2+} , participarían en la manifestación del poseso fisiológico [41, 42]. Otra proteína regulada por Ca^{2+} y de gran importancia en el proceso hipertrófico es la proteína fosfatasa calcineurina (CN), que se encuentra formando un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica (CNA) y una subunidad regulatoria (CNB). El incremento sostenido en el Ca^{2+} citosólico, luego del estímulo adrenérgico en el cardiomiocito, genera la interacción entre calmodulina (CaM) y CNA provocando el cambio estructural de la fosfatasa favoreciendo su conformación activa, ésta a su vez,

desfosforila diversos residuos en la porción amino-terminal del factor de transcripción NFAT que trasloca al núcleo y activa a genes involucrados en la respuesta hipertrófica [43, 44]. m-TOR es otra proteína quinasa que desempeña un importante papel en la síntesis de proteínas, su activación puede ocurrir a través de factores de crecimiento mediante PI3K α o por factores neurohumorales a través de PI3K β y la vía MAPK, es inhibida por la proteína quinasa glicógeno sintetasa 3 (GSK3) y se ha considerado como una vía final en el desarrollo tanto de hipertrofia patológica como fisiológica [42].

Es importante establecer que muchos de estos eventos ocurren en forma simultánea en el poseso fisiopatológico, además los elementos que desencadenan la respuesta hipertrófica y las diversas vías transduccionales presentan variados mecanismos de regulación entre sí, existiendo un número mayor de participantes y cascadas de señalización que las aquí mencionadas, lo que genera un proceso de alta complejidad. La **Figura 1** muestra un resumen con los diferentes tipos de hipertrofia cardíaca y las principales vías transduccionales activadas por IGF-1 y NE.

4.1.3. Eventos génicos en hipertrofia cardíaca

Las distintas cascadas de señalización gatilladas por estímulos hipertróficos en el cardiomiocito culminan en el núcleo para dar origen a la regulación en la expresión de diversos genes que finalmente serán los responsables de inducir el fenotipo hipertrófico, siendo los factores de transcripción las proteínas encargadas de regular este proceso. Los factores transcripcionales cardíacos se encuentran representados por GATA, MEF2, NFAT y el factor transcripcional homeobox Csx/Nkx2-5 [45].

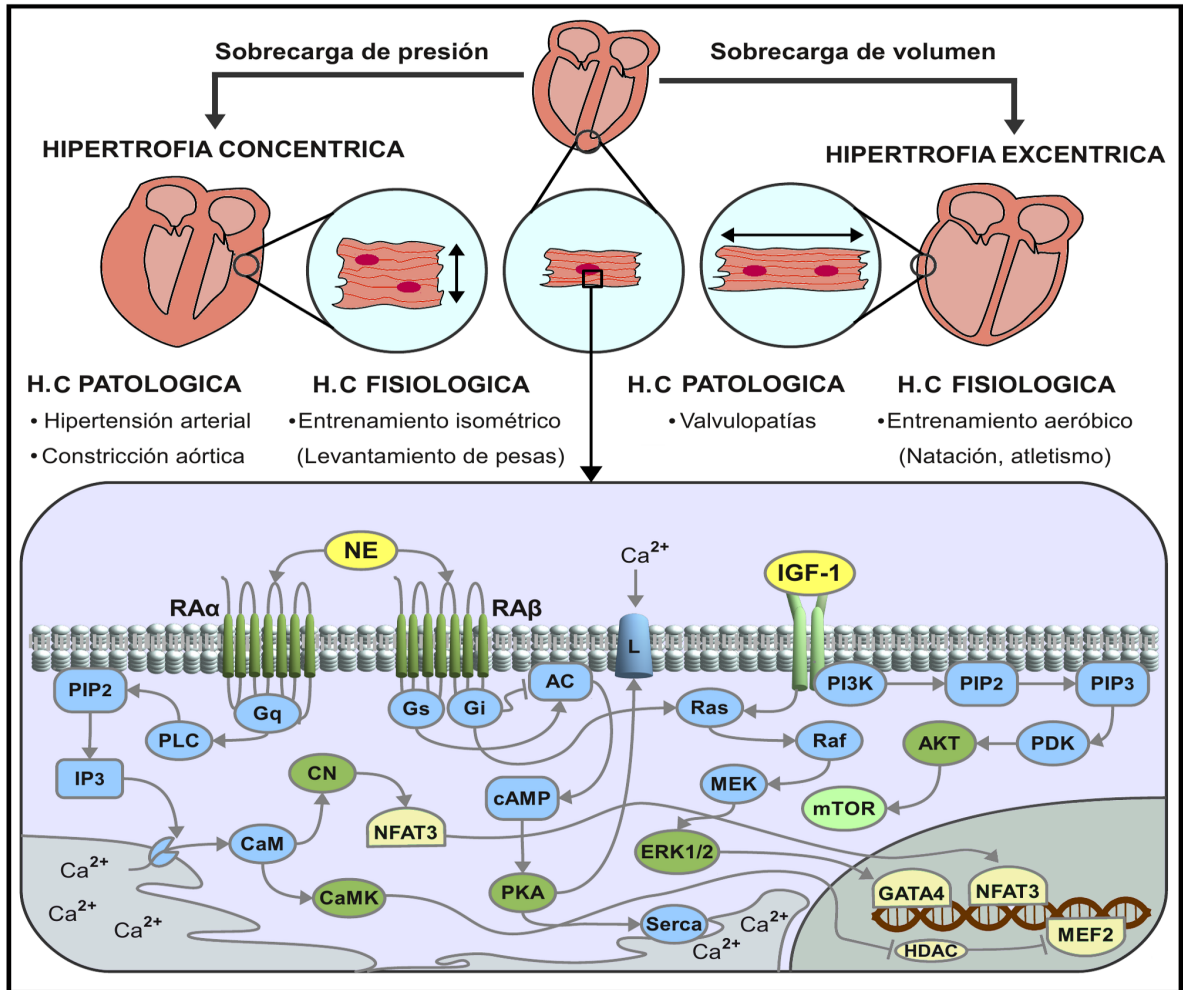


Figura 1: **Tipos de hipertrofia cardíaca y principales vías transduccionales activadas por IGF-1 y NE en el cardiomiocito**

En la parte superior de la figura se muestra un esquema con los diferentes tipos de hipertrofia cardíaca de acuerdo al estímulo hemodinámico que las generan, destacándose el impacto en la morfología cardíaca y las respectivas condiciones asociadas al desarrollo de la respuesta patológica y fisiológica. Las estructuras ilustradas en los círculos centrales representan a cardiomiocitos donde las flechas indican la dirección del crecimiento en los distintos tipos de hipertrofia cardíaca. El panel inferior muestra las principales cascadas transduccionales activadas por IGF-1 y NE en el cardiomiocito. H.C: hipertrofia cardíaca, RA α : receptor adrenérgico tipo α , RA β : receptor adrenérgico tipo β , L: canal de Ca²⁺ tipo L.

Entre la familia de factores transcripcionales GATA, GATA4 ha sido uno de los más estudiados en el corazón, regulando en forma directa la transcripción basal de un amplio espectro de genes cardíacos como: la cadena pesada de la α -miosina (α -MHC), péptido natriurético auricular (ANP), troponina cardíaca I y carnitina palmitoil transferasa [45]. Esta proteína se activa mediante fosforilación por ERK1/2 y p38 y en su regulación participa GSK3 β . La sobreexpresión GATA4 produce hipertrofia en cultivo de cardiomiocitos y en corazón de ratón, mostrando que tiene una importante participación en el proceso hipertrófico [46]. MEF2 se une a regiones del DNA ricas en A/T que han sido identificadas dentro de zonas promotoras para diversos genes cardíacos (creatinaa quinasa muscular, α -MHC, α actina esquelética y troponina cardíaca T, C e I, entre otras), su activación por p38MAPK y ERK5 se ha relacionado ampliamente con la manifestación de hipertrofia [47, 48] y además existe evidencia de una interacción sinérgica entre MEF2 y GATA4 [49].

NFAT tiene una importante participación en el desarrollo del fenotipo hipertrófico, en respuesta a estímulos hipertróficos como NE, NFAT se desfosforila por calcineurina en su porción amino terminal, específicamente en residuos conservados de serina, lo que produce la translocación de NFAT al núcleo donde controla la expresión de diversos genes hipertróficos, en parte a través de la formación de un complejo con GATA4 [50, 51]. Sin embargo, se ha demostrado que la activación de NFAT por si sola es suficiente para inducir el fenotipo hipertrófico en el cardiomiocito [43].

El factor Csx/Nkx2-5 se ha asociado con la activación del programa genético cardíaco debido a que posee diversos blancos río abajo de importancia como ANP, calreticulina, α - actina cardíaca y conexina 40. Su participación en hipertrofia cardíaca se desconoce, pero se ha observado que durante este proceso aumenta su expresión [10, 45].

GATA5, GATA6, TEF-1, HAND, SRF, HOP y Sp corresponden a otros factores transcripcionales relacionados a la activación de genes cardíacos, todos estos, incluyendo los antes mencionados, presentan diversas interacciones entre si de tipo sinérgico y antagónico, indicando un alto nivel de regulación.

El proceso hipertrófico presenta un patrón genético característico, los primeros genes en ser inducidos son los denominados “genes de respuesta temprana” que incluyen c-fos,

c-myc y c-jun entre otros, comenzando su transcripción aproximadamente a los 30 min y retornando a sus niveles basales dentro de las 24 a 48 h. Estos genes a su vez, regulan la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la protección frente al estrés en distintos tipos celulares, pudiendo ser inducidos en el cardiomiocito por incremento en la carga hemodinámica, factores solubles como catecolaminas, factores de crecimiento y por otras perturbaciones en la homeostasis miocárdica como isquemia, hipoxia y estrés osmótico [52, 53]. Como un evento más tardío, se induce la expresión del programa genético fetal, donde proteínas que solo se expresan en corazón durante la etapa del desarrollo embrionario vuelven a ser reexpresadas en el cardiomiocito hipertrófico, por lo que se utilizan como parámetros marcadores para determinar la presencia de este proceso. Las principales proteínas del programa genético fetal son: la cadena pesada de la β miosina (β MHC), que reemplaza a la isoforma α de la misma proteína; la α actina esquelética (SKA), que reemplaza a la isoforma cardíaca y el péptido natriurético auricular (ANP), cuya expresión queda relegada a aurícula después del nacimiento, pero que vuelve a expresarse en ventrículo durante la inducción del fenotipo hipertrófico [17, 54].

4.1.4. Cambios metabólicos en el cardiomiocito hipertrófico

El corazón requiere de grandes cantidades de energía para mantener su incesante trabajo contráctil, esto lo logra a través de la utilización de ácidos grasos y glucosa como principales sustratos para la generación de ATP por la mitocondria. Los ácidos grasos son catabolizados en la matriz mitocondrial por el proceso de β oxidación, mientras que el piruvato derivado de lactato y glucosa es oxidado por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) ubicado en la membrana interna mitocondrial. El producto final de ambas vías (la glicólisis y la β oxidación) es la generación de acetil-coA, que es oxidado en el ciclo de Krebs para generar los factores reducidos NADH y FADH₂. Estos a su vez, participan en el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa, generándose una gradiente de protones que más tarde será utilizada en la generación de ATP [55]. El fosfato que se encuentra unido al ATP es transferido a una molécula de creatinaa mediante la creatinaa quinasa mitocondrial (mtCK), formando fosfocreatinaa y ADP, la

molécula de fosfocreatina es de tamaño pequeño por lo que rápidamente difunde desde la mitocondria hasta las miofibrillas donde es hidrolizada por la fosfocreatina quinasa miofibrilar (CK) regenerando ATP, que es utilizado para el trabajo contráctil, y creatina que difunde nuevamente a la mitocondria [56].

En el proceso hipertrófico ocurren diversos cambios metabólicos a nivel de la utilización de sustrato, fosforilación oxidativa y metabolismo del ATP. Bajo condiciones normales la mayor cantidad de ATP se genera mediante la β oxidación de ácidos grasos con un aporte del 60-90%, sin embargo en la hipertrofia cardíaca, al igual que en el desarrollo fetal, se favorece la oxidación de glucosa para generar energía. Estas alteraciones metabólicas implican cambios en la expresión de enzimas involucradas en la utilización de ácidos grasos, donde receptores nucleares como el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPARs) y el receptor relacionado a estrógenos (ERR), al igual que el coactivador de PPAR (PGC-1 α), desempeñan una función clave [55, 56].

Los receptores **PPARs** comprenden una familia de factores transcripcionales con tres isoformas conocidas cuya actividad en la regulación génica la desempeñan mediante la heterodimerización con el receptor de retinoides X (RXR), PPAR α regula la activación transcripcional de genes que codifican para enzimas mitocondriales claves en el metabolismo de ácidos grasos al igual que PPAR β , mientras que PPAR γ participa principalmente, en la regulación del almacenamiento de lípidos [55–57]. En modelos de hipertrofia cardíaca en humanos y animales, disminuye la actividad de PPAR α de manera proporcional a la reducción de la oxidación de ácidos grasos, en base a estas evidencias se considera la regulación negativa de PPAR α como un mecanismo clave en el cambio de la utilización de sustrato, típico de hipertrofia cardíaca [56, 58]. Estudios recientes han demostrado que los agonistas específicos PPAR β inducen la expresión de enzimas mitocondriales relacionadas con la oxidación de ácidos grasos en los cardiomiocitos neonatos y adultos, al igual que ligandos selectivos para PPAR α . Además, la activación de PPAR β rescata la expresión de estas enzimas en el cardiomiocito carente de receptores PPAR α , demostrando la existencia de una vía regulatoria entre ambos receptores [55]. La isoforma PPAR γ se expresa en niveles inferiores a las antes mencionadas en el músculo cardíaco. Los agonistas específicos para este receptor,

inhibieron la inducción de marcadores hipertróficos en cardiomiocitos, pese a que no mostraron cambios significativos en la inducción de enzimas metabólicas mitocondriales [55, 59].

Los **ERRs** corresponden a una subfamilia de receptores nucleares huérfanos compuesta por tres integrantes, $ERR\alpha$, $ERR\beta$ y $ERR\gamma$. Diversas evidencias sugieren que estos receptores participan en la expresión constitutiva de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos, donde la isoforma $ERR\alpha$ parece tener una participación mayor en el metabolismo cardíaco. Al respecto se ha descrito que el $ERR\alpha$ participa en la regulación de genes relacionados con la captación de ácidos grasos, con la β -oxidación y con el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa mitocondrial, así como también activa la expresión génica de $PPAR\alpha$ [60, 61]. Algunos estudios han mostrado que el tratamiento con estrógenos (17- β -Estradiol) disminuye la respuesta hipertrófica frente a sobrecarga de presión y de volumen [62, 63].

El **PGC-1 α** fue inicialmente identificado en adipocito marrón como el coactivador de $PPAR\gamma$, actualmente se considera como un elemento integrador en la red transcripcional que regula la biogénesis y función mitocondrial [55]. $PGC-1\alpha$ regula los genes involucrados en la captación y metabolismo mitocondrial de ácidos grasos a través de la coactivación directa de $PPARs$ y $ERRs$. Además, $PGC-1\alpha$ también coactiva a los factores nucleares respiratorios (NRFs), cuyos blancos directos ríe abajo corresponden a genes involucrados en la biogénesis y la respiración mitocondrial [58, 60, 61]. La expresión de $PGC-1\alpha$ en el corazón se incrementa en el nacimiento, al mismo tiempo que aumenta la capacidad oxidativa de este órgano y la oxidación de glucosa es desplazada por la β oxidación de ácidos grasos. Este coactivador se induce por estímulos fisiológicos que incrementan la demanda de ATP y estimulan la oxidación mitocondrial incluyendo exposición al frío, ayuno y ejercicio. Además en cultivos primarios de cardiomiocitos, $PGC-1\alpha$ incrementa el número de mitocondrias, induce expresión de proteínas mitocondriales y aumenta la tasa de oxidación de ácidos grasos. Al igual que $PPAR\alpha$, los niveles de $PGC-1\alpha$ disminuyen en hipertrofia cardíaca y su sobreexpresión así como también el tratamiento con agonistas de $PPAR\alpha$ previenen la manifestación de hipertrofia cardíaca y mejoran la actividad contráctil [55, 57, 64]. La

progresión del proceso hipertrófico conlleva una disminución gradual, pero progresiva, en el metabolismo oxidativo, sin embargo esta disminución en la actividad mitocondrial no es solamente un efecto secundario, sino que también cumple una importante función en la patogénesis del proceso puesto que, como se discutirá en la siguiente sección, cualquier disminución en la disposición energética se traduce en fallas de la actividad contráctil del cardiomiocito, situando a la mitocondria como un elemento clave en la manifestación y desarrollo de hipertrofia y diversas patologías cardíacas.

4.2. Mitocondria y patología cardíaca

Los procesos bioenergéticos que ocurren en la mitocondria son esenciales para mantener la viabilidad celular, sin embargo, en forma paradójica, también son críticos en eventos de muerte celular [65–67]. La disfunción mitocondrial, caracterizada por un desbalance entre la producción de ATP y su utilización, cambios en la homeostasis iónica y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [68–71], produce daño celular que finalmente culmina en el término de la vida útil de la célula mediante procesos de necrosis o apoptosis [72], esto cobra mayor importancia en células terminalmente diferenciadas como los cardiomiocitos que además requieren grandes cantidades de energía para mantener el trabajo contráctil.

La estrecha relación que existe entre las funciones cardíaca y mitocondrial queda de manifiesto en modelos transgénicos que conducen a fallas mitocondriales y finalmente a un menor aporte energético y disfunción de éste organelo. Por ejemplo, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), es un intercambiador mitocondrial codificado en tres diferentes genes (Ant 1, 2 y 3) que intercambia ATP mitocondrial por ADP citosólico a través de la membrana interna, siendo un importante regulador entre la producción de ATP y su consumo en la matriz mitocondrial. En 1997, *Graham et al.* observaron que ratones $Ant1^{-/-}$ (la isoforma más expresada en corazón) presentaban defectos en la función del sistema de fosforilación oxidativa y un progresivo fenotipo hipertrófico cardíaco [73]. Otro ejemplo es el factor transcripcional mitocondrial A (TFAM) que es esencial para la biogénesis y función de este organelo. Ratones homocigotos $TFAM^{-/-}$ sufren cardiomiopatía embrionaria letal, mientras que los ratones heterocigotos

presentan una reducción aproximada del 50 % en la expresión del factor transcripcional y son viables hasta los 20 días donde manifiestan cardiomiopatía dilatada [74]. Por otra parte, la evidencia clínica indica que el metabolismo bioenergético mitocondrial desempeña un papel crítico en el desarrollo de patologías cardíacas, observándose individuos con una variedad de cardiomiopatías asociadas a defectos específicos en genes que codifican para proteínas mitocondriales o metabólicas como subunidades del complejo respiratorio, enzimas participantes en la oxidación de ácidos grasos y moléculas relacionadas al ensamblaje del complejo IV, entre otras [75].

4.2.1. Mitocondria e insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca es una condición compleja provocada por situaciones isquémicas y diversos estímulos neurohumorales, se caracteriza por una disminución en la fuerza contráctil, aumento en la frecuencia del miocardio, reducción en la capacidad para responder frente a factores hipóxicos y oxidativos, cambios en canales iónicos y función electrofisiológica, incremento en la fibrosis y remodelado celular además de cambios en las reservas bioenergéticas y en la utilización de substratos [57, 76]. Observaciones en modelos animales y en estudios clínicos muestran que defectos en la bioactividad mitocondrial pueden ser la base de varios de los aspectos fenotípicos antes mencionados [77].

En el corazón insuficiente se producen cambios en las diversas etapas que participan en la producción energética, por ejemplo, en etapas tempranas de la insuficiencia cardíaca se produce un incremento en la utilización de glucosa mientras que el uso de ácidos grasos disminuye a medida que la patología avanza [78, 79]. Los niveles de ATP disminuyen aproximadamente un 30 % en estadios avanzados de insuficiencia cardíaca, mientras que las actividades de la mtCK y la CK son reducidas aproximadamente a un 20 % y 50 % respectivamente, comparado con sus valores normales [80–82]. En modelos animales la cantidad total de creatinaa cardíaca fosforilada a la forma de fosfo-creatinaa disminuye aproximadamente en un 60 % y la magnitud de esta depleción se correlaciona con la severidad de la patología [77]. Todo esto produce una disminución importante en la transferencia de ATP y en el flujo de energía intracelular calculándose una disminución

en el aporte energético a las miofibrillas de un 71 %. Estas anormalidades metabólicas contribuyen a la disfunción del trabajo contráctil y a la pérdida de las reservas inotrópicas, características típicas de insuficiencia cardíaca [57].

Otro factor importante a considerar es la participación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca debido a que gran parte de estas moléculas son producidas en la mitocondria. Además el incremento en la producción de ROS se ha asociado a la generación de daños en el DNA mitocondrial y a pérdida en la función de este organelo. En cultivos primarios de cardiomiocitos se ha observado que la exposición a ROS induce hipertrofia y apoptosis, mientras que en fibroblastos produce activación de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP). En la insuficiencia cardíaca se incrementa la generación de ROS y por consecuencia también la activación de las MMP [83]. Al disminuir la actividad de ROS con dimetiltiourea, se impide el remodelado ventricular y la progresión de la insuficiencia cardíaca a través de la inhibición de MMP-2, lo que demuestra la importancia de la producción de ROS en el desarrollo de esta patología [84].

4.2.2. Mitocondria, eventos de isquemia - reperfusión y preconditionamiento isquémico

Los eventos de isquemia y reperfusión (IR) tienen gran impacto a nivel cardíaco por el excesivo daño y muerte celular que en ellos se produce. Durante la IR las células cardíacas son expuestas a hipoxia e inhibición metabólica, afectándose la estructura y función mitocondrial. El daño isquémico tempranamente produce hinchazón de las mitocondrias y desacoplamiento entre la fosforilación oxidativa y la respiración mitocondrial, más tarde se produce depleción de ATP, disminuyendo el estado energético celular y conduciendo a la muerte [85, 86].

Las condiciones que se generan en IR como el incremento en la concentración de calcio intramitocondrial, fósforo inorgánico (Pi) y aumento en la formación de ROS, provocan la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM). Este es una estructura proteica anclada a la membrana interna mitocondrial y que normalmente se encuentra cerrada, sin embargo, cuando se abre produce un incremento

en la permeabilidad permitiendo la entrada de moléculas menores de 1,5 kDa lo que genera un movimiento de solutos hacia la matriz mitocondrial e hinchamiento de las mitocondrias. Además, la apertura del PTPM no solo reduce la síntesis de ATP, sino que también genera un funcionamiento inverso de la maquinaria mitocondrial produciéndose hidrólisis del ATP generado por la glicólisis o por otras mitocondrias funcionales [86].

Los antecedentes actuales muestran que la apertura del PTPM es un evento clave en la generación de daño celular en la IR, es por esto que actualmente se investigan diversos protocolos cardioprotectores cuyo objetivo es impedir que éste evento ocurra, ya sea mediante el uso de inhibidores directos del PTPM como ciclosporina A, o a través de estrategias indirectas como las disminuciones (durante la reperfusión) de la sobrecarga de Ca^{2+} , del estrés oxidativo y pH intracelular [85]. Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que breves periodos repetidos de isquemia brindan protección cardíaca frente a periodos isquémicos prolongados. A este régimen se le conoce como preacondicionamiento isquémico y entre los posibles mecanismos involucrados figura el aumento en la expresión de proteínas que desempeñan un papel protector como las relacionadas a sobrevida celular y enzimas con actividad antioxidante [87]. El preacondicionamiento isquémico disminuye la muerte celular por necrosis y apoptosis impidiendo la activación de células inflamatorias, disminuyendo la expresión de proteínas proapoptóticas como BAX y Bad e incrementando la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 [88, 89]. Finalmente todas estas señales previenen el influjo de Ca^{2+} dentro de la mitocondria, la apertura de PTPM y la liberación de citocromo c, observándose una disminución en el tamaño del territorio isquémico y en la incidencia de arritmias cardíacas [90].

4.2.3. Mitocondria y cardiopatía diabética

Hoy en día se reconoce a la diabetes mellitus como un factor de riesgo cardiovascular independiente cuya progresión genera anomalías en la función contráctil, hipertrofia ventricular y disminución en la tolerancia isquémica del músculo cardíaco, teniendo gran importancia los cambios en el metabolismo mitocondrial que se producen durante la enfermedad [91, 92]. En el corazón diabético, al contrario de lo que ocurre en

insuficiencia cardíaca, se produce un incremento en la β -oxidación de ácidos grasos y una disminución en el uso de glucosa para la generación de energía. El cambio en el metabolismo cardíaco parece estar relacionado con la disminución del efecto de la insulina sobre diversos tejidos, lo que finalmente conduce a un incremento de la liberación de ácidos grasos desde el hígado y adipocitos, esto a su vez genera la activación de factores y cofactores transcripcionales relacionados al metabolismo de estos mismos como PPAR α y su coactivador PGC1- α , produciéndose aumento en la expresión de proteínas responsables de la captación y metabolización de ácidos grasos en la mitocondria. Además se genera una reducción crónica en la capacidad glicolítica cardíaca y el metabolismo oxidativo de la glucosa disminuye por una caída en la actividad de la piruvato deshidrogenasa [93–95].

Todos los cambios metabólicos que se producen en el corazón diabético, al parecer son producto de una respuesta adaptativa secundaria al aumento de ácidos grasos circulantes, sin embargo, el corazón no es un órgano adaptado para el almacenaje de ácidos grasos, por lo tanto, su acumulación conlleva consecuencias degenerativas para la función cardíaca. Los estudios en modelos animales de diabetes han revelado que el 60 % de las proteínas que aumentan su expresión se localizan en mitocondria. Estas proteínas corresponden principalmente a transportadores y enzimas del metabolismo de ácidos grasos y su incremento altera la composición lipídica mitocondrial disminuyendo la eficiencia en la producción de ATP e incrementando la producción de ROS. Además la β -oxidación es un 10 % menos eficiente en la generación de ATP por consumo de oxígeno que la utilización de glucosa [96, 97].

Respecto a la producción de ROS, su aumento contribuye al desarrollo y la progresión de cardiomiopatía diabética, observándose una disminución en la disfunción cardíaca cuando se activan mecanismos antioxidantes [98]. Al respecto, la sobreexpresión de metalotionina, glutatión peroxidasa y la manganeso superóxido dismutasa en el corazón, produce reversión de la sintomatología asociada a la cardiomiopatía diabética en modelos animales relacionados a diabetes mellitus tipo 1 y 2 [98–100].

4.2.4. Mitocondria y patología vascular

La relación más documentada entre mitocondria y patología vascular corresponde al incremento del estrés oxidativo sobretodo en el desarrollo de arteriosclerosis, observándose que una disminución en la actividad de los mecanismos antioxidantes mitocondriales exacerba la sintomatología de la enfermedad, mientras que la disminución de la formación de ROS en la mitocondria, reduce la aterogénesis [101–103] Además, como se ha mencionado, el aumento en la producción de ROS provoca la apertura del PTPM, gatillando eventos de muerte en células endoteliales y de la musculatura lisa vascular [101, 104]. La mitocondria además de ser una importante fuente de ROS también es blanco de estas moléculas experimentando modificaciones que producen disfunción del organelo y como consecuencia mayor producción de ROS. Estos eventos, conducen a disfunción endotelial, proliferación de células de la musculatura lisa vascular y macrófagos generando un aumento de las patologías vasculares [103].

El endotelio vascular es un gran productor de óxido nítrico (NO), éste modula la formación de ROS mitocondriales a través de la inhibición reversible de la citocromo c oxidasa, produciendo daños a la función de la cadena respiratoria [105]. También, el NO puede reaccionar con el anión superóxido generando peroxinitrito, produciendo nitración irreversible de proteínas, observándose que un tercio de estas proteínas nitrosiladas son de origen mitocondrial [106].

La hipertensión arterial es un factor de riesgo cardiovascular asociado a disfunción endotelial y producción de ROS, donde alteraciones en la función mitocondrial parecen tener un papel protagónico [107–109], observándose un deterioro en la producción energética y una disminución en la actividad del complejo IV en cardiomiocitos de ratas espontáneamente hipertensas [110, 111]. Otro importante factor de riesgo cardiovascular es el envejecimiento, encontrándose en diversos estudios en humanos y modelos animales una disminución en la actividad de la cadena transportadora de electrones y en la capacidad de síntesis de ATP, como consecuencia de la acumulación de mutaciones oxidativas en el DNA mitocondrial [103].

4.3. Dinámica mitocondrial

4.3.1. Definición

Las mitocondrias son organelos altamente especializados, poseen una doble membrana caracterizada por invaginaciones llamadas “crestas” en la porción interna, además de genoma y sistema de transcripción/traducción propios [112]. Aparte de proveer energía en la célula eucarionte, la mitocondria participa en la mantención de la homeostasis de Ca^{2+} , metabolismo de lípidos y regulación de la apoptosis, entre otras funciones [113, 114]. Diversos estudios han revelado que la morfología mitocondrial no es constante, sino que es un proceso de gran plasticidad, observándose que estos organelos forman redes interconectadas entre sí, definidas como retículo o red mitocondrial, donde su estructura, distribución y actividad dependen del balance de dos procesos opuestos, la fisión y la fusión mitocondrial [112, 115]. Los primeros estudios focalizados a comprender la dinámica mitocondrial se realizaron en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), gracias a estas investigaciones se identificaron las principales proteínas de la maquinaria molecular básica. Además, posteriormente se constató, que el mecanismo que regula la dinámica mitocondrial se encuentra conservado evolutivamente para diversas especies, incluido el hombre [116]. El desbalance entre los mecanismos de fusión y fisión produce severas alteraciones en la morfología mitocondrial. Disminución en los procesos de fusión da como resultado fragmentación de la red en pequeñas esferas debido a un predominio de los procesos de fisión. Por el contrario, cuando la fisión es bloqueada se produce agregación de las mitocondrias, formando largas estructuras tubulares, por un aumento del proceso de fusión. Además de la regulación morfológica, los eventos de dinámica mitocondrial se encuentran estrechamente relacionados a la actividad bioenergética de este organelo. Las células cuyos procesos de fisión/fusión han sido modulados presentan anomalías en diversos parámetros metabólicos, donde al parecer, mitocondrias con un incremento en la fusión presentan una mayor actividad. Sin embargo, aún no se ha determinado en forma clara esta relación [117, 118].

4.3.2. Maquinaria molecular de la fusión mitocondrial

Proteínas involucradas. Diversos estudios han identificado los principales actores que constituyen la maquinaria de fusión mitocondrial. El primero fue la proteína Fzo con participación en la espermatogénesis de *Drosophila* y más tarde en levadura como Fzo1p cuyo homólogo en mamíferos es la proteína mitofusina (Mfn) de la cual se han identificado dos isoformas, Mfn1 y Mfn2 [116–119]. Ambas isoformas de Mfn consisten en largas GTPasas ubicadas en la membrana externa mitocondrial con una homología en su secuencia de un 81 % aproximadamente. La región transmembrana de estas proteínas tiene una forma de U, ubicando a las porciones N-terminal (con actividad GTPasa) y C-terminal en el citosol [118]. Además del dominio GTPasa, Mfn1 y Mfn2 presentan dominios “coil-coil”, por lo que son capaces de formar homo o heterodímeros con la Mfn de la mitocondria adyacente, provocando el acercamiento entre ambas mitocondrias y culminando con la fusión de las membranas externas [120]. Tanto Mfn1 como Mfn2 son indispensables para mantener niveles de fusión mitocondrial normales, puesto que células que carecen de alguna de estas isoformas presentan una disminución significativa en el proceso de fusión. Además cuando se bloquea la expresión de Mfn1, el proceso de fusión es rescatado por sobreexpresión de Mfn2 y viceversa, por lo que ambas parecen presentar actividades similares [117, 120, 121]. Sin embargo, diversos estudios han relacionado a Mfn2 con distintos roles fisiológicos, observándose que también participa en la modulación de procesos bioenergéticos, en el acercamiento de la mitocondria con el retículo endoplásmico y en la proliferación celular [122–124]. Mutaciones en el gen *MFN2*, principalmente en el dominio GTPasa, se asocian al desarrollo de la enfermedad de Charcot Marie Toth 2A, neuropatía que cursa con degeneración progresiva de neuronas periféricas sensoriales y motoras [125].

OPA-1 (Optic atrophy) es otra proteína perteneciente a la familia de las dinaminas con actividad GTPasa en la porción N-terminal y al igual que Mfn es esencial para la fusión mitocondrial. Su nombre se debe a que mutaciones genéticas, principalmente ubicadas en la región GTPásica de esta proteína, se han asociado a la manifestación de atrofia óptica autosómica dominante, que es la más común de las neuropatías

ópticas familiares [126, 127]. OPA-1 se ubica principalmente en el espacio intermembrana donde se encuentra asociada a membrana interna, sin embargo posee ocho isoformas generadas por corte y empalme alternativo y sufre modificaciones postranscripcionales mediante proteólisis generándose formas largas y cortas, por lo que su ubicación es variada [128, 129].

La fusión mitocondrial culmina con la unión de ambas matrices mitocondriales para formar una nueva unidad, esto involucra la fusión coordinada de la membrana externa e interna. Al respecto se ha señalado que Mfn y OPA-1 trabajan juntas en este proceso, donde OPA1 se encontraría regulando los cambios relacionados a la membrana interna [120, 130, 131], observándose que su sobreexpresión en células MEF produce agregación mitocondrial tubular de manera Mfn1 dependiente [132]. Por otro lado, análisis de microscopía electrónica en células que presentan una disminución en la expresión de OPA1, han revelado fragmentación de la red y desorganización de las crestas mitocondriales, concluyéndose que OPA1, además de regular la fusión mitocondrial, también participa en la organización de la arquitectura interna de la mitocondria. En levaduras, estudios de inmunoprecipitación han evidenciado interacción entre los ortólogos de Mfn1/2 y OPA-1 (Fzo1p y Mgm1p, respectivamente), donde una tercera proteína llamada Ugo1p, también requerida para la fusión, interactuaría con este complejo. Sin embargo, no se ha observado interacción bioquímica entre ambas proteínas en células de mamíferos [120, 133].

Regulación. Recientemente *Eura et al.*[134] identificaron una proteína que interactúa con Mfn1/2 modulando su actividad. Esta proteína recibe el nombre de MIB (mitofusin binding) y contiene un dominio conservado de unión a una coenzima que fija e hidroliza nucleótidos. La sobreexpresión de MIB genera fragmentación mitocondrial, mientras que la disminución de su expresión conduce a elongación de las mitocondrias, además se constató interacción entre MIB y las proteínas de fusión Mfn1/2 y no con la proteína de fisión Drp-1, por lo que se sospecha que MIB a través de su dominio de unión a nucleótidos interactúa con Mfn1/2, impidiendo la hidrólisis de GTP [134].

MARCH-V es otra proteína relacionada al proceso de fusión mitocondrial que ha

sido identificada como una proteína integral de la membrana externa mitocondrial con actividad ubiquitina ligasa. Los estudios de inmuno-precipitación han revelado que MARCH-V interactúa con Mfn2 y su sobreexpresión produce agregación tubular de las mitocondrias de manera Mfn2 dependiente. Además, como se verá más adelante, MARCH-V también modula la actividad de la maquinaria de fisión [135]. *Zhou et al.* [136] mostraron que Mfn2 puede ser fosforilada por PKA en el residuo Ser422. Esta fosforilación disminuye los efectos antiproliferativos que Mfn2 ejerce sobre las células de la musculatura lisa vascular, de manera independiente a la modulación de la morfología mitocondrial.

Se ha descrito que la dinámica mitocondrial se modula durante la apoptosis, al respecto los factores proapoptóticos Bax y Bak regulan el ensamblaje de Mfn2 en complejos de alta masa molecular, debido a que en ausencia de estas proteínas Mfn2 forma complejos de menor tamaño y se ve alterada su distribución subcelular. Además en células doble knockout para Bax/Bak, se observó una disminución en los procesos de fusión mitocondrial, primando una morfología preferentemente fragmentada de éste organelo [137]. Por otro lado, las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL y CED-9, promueven la fusión de la red mitocondrial mediante interacción física con Mfn2 [138].

Como se mencionó anteriormente, OPA-1 existe al menos como 8 isoformas generadas por corte y empalme alternativo, distribuyéndose en distintas zonas de la mitocondria, todas ellas sintetizadas como proteínas precursoras con una secuencia de localización mitocondrial en la porción N-terminal, la cual es removida durante la importación a la mitocondria por una peptidasa mitocondrial generando las formas largas de la proteína, que posteriormente son procesadas para generar las formas cortas en el espacio intermembrana por la proteasa YME1L, o en la matriz mitocondrial por las proteasas Afg3l1/2 o paraplegina. Ambas formas de OPA-1 (largas y cortas) son necesarias para mantener una tasa de fusión mitocondrial normal [129, 139]. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial, ya sea por el uso de un agente desacoplante como CCCP o por eventos como la depleción del DNA mitocondrial, provoca fragmentación de la red mitocondrial con una rápida conversión de las formas largas de OPA-1 a las formas cortas mediante la acción de la proteasa

OMA1, observándose que el silenciamiento de esta proteasa inhibe completamente el procesamiento de OPA-1. OMA-1 es una metaloproteasa dependiente de zinc, inserta en la membrana interna de la mitocondria donde se encuentra en dos formas, una de 40 kDa y otra de 60 kDa, siendo esta última la forma activa, la cual se acumula en la mitocondria durante eventos de disipación del potencial de membrana mitocondrial, lo que lleva finalmente a la proteólisis de OPA-1 [140, 141].

Función. Los procesos de dinámica mitocondrial cambian constantemente la identidad de este organelo, con la fusión se obtiene nuevo material mitocondrial mientras que con la fisión se retira, es posible que este intercambio de material prolongue la vida útil de la mitocondria, puesto que cuando las mitocondrias pierden la capacidad de interactuar con sus pares, principalmente por anomalías en la fusión, los defectos en este organelo, como pérdida de sustratos o de metabolitos, no podrán ser complementados por la unión con otra mitocondria, además el proceso de fusión puede proteger a la mitocondria de los efectos deletéreos provocados por la mutación o la pérdida de su DNA, puesto que al fusionarse el material génico es complementado [117]. *Chen et al.* observaron que en células carentes de Mfn1 o Mfn2 se producía disminución en la respiración celular, disipación del potencial de membrana mitocondrial y retardo en el crecimiento celular, resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó un siRNA para OPA-1 [130]. Estos cambios metabólicos pueden ser el resultado de una disminución en el intercambio de componentes matriciales, debido a una caída en la tasa de fusión mitocondrial. En concordancia con esta observación, la disminución en los niveles de Mfn2, mediante el uso de un adenovirus antisentido en células musculares, disminuye la capacidad oxidativa mitocondrial, que se relaciona con la disminución en la expresión de algunos de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa [122]. Además este mismo grupo de investigación determinó que la actividad física incrementa los niveles del mRNA de Mfn1, Mfn2, el factor nuclear respiratorio 2 y el complejo IV de la fosforilación oxidativa [142], así como también observaron aumento en la expresión de Mfn2 en músculo esquelético y adipocito marrón, en condiciones que generan un incremento en la demanda energética, como exposición a bajas temperaturas y tratamiento con

agonistas β 3-adrenérgicos, encontrándose además, sitios de unión específicos para PGC-1 α y ERR α en la región promotora de Mfn2 [143]. Mfn2 también se encuentra en las membranas asociadas a mitocondria del retículo endoplasmático, donde interactúa con las Mfns mitocondriales para generar uniones inteorganelares. Estos contactos tienen gran importancia fisiológica para la señalización por Ca²⁺, el intercambio de metabolitos, la apoptosis y el metabolismo mitocondrial [123, 144, 145].

La interpretación de todos estos resultados puede llevar a generar como conclusión que el proceso de fusión mitocondrial se encuentra asociado a un incremento en la actividad bioenergética de la célula, sin embargo, como se verá más adelante, algunos trabajos han mostrado que esta relación no siempre ocurre en ese sentido, por lo tanto debe tenerse presente, que los procesos de fisión mitocondrial también son necesarios para el correcto funcionamiento de la mitocondria.

4.3.3. Maquinaria molecular de la fisión mitocondrial

Proteínas involucradas. Drp-1 (Dinamin related protein) y Fis-1 (Fission) han sido identificadas como las proteínas responsables del mecanismo de fisión. Drp-1 presenta dos distribuciones, una porción se encuentra en el citosol y otra en retículo mitocondrial donde se distribuye como un discreto patrón punteado indicando los futuros sitios de fisión. Esta proteína presenta distintos dominios característicos de la familia dinaminas GTPasas incluyendo dominio GTPasa, dominio central y dominio GTPasa efector [117, 118]. La inhibición de Drp-1 por un dominante negativo, o la utilización de un siRNA conduce a un incremento en el tamaño y en la interconectividad del retículo mitocondrial como efecto secundario a un aumento de la fusión, indicando que cumple un rol clave en el proceso de fisión [131].

Fis-1 es el otro componente clave en la fisión mitocondrial. Fis-1 es una pequeña proteína distribuida uniformemente en la membrana externa de la mitocondria, anclada a esta mediante su extremo C-terminal, donde su mayor parte queda expuesta al citosol. La sobreexpresión de Fis-1 produce fragmentación de la red mitocondrial en forma dependiente de Drp-1, mientras que el bloqueo de su actividad conduce a elongación del túbulo mitocondrial [117, 146]. El reclutamiento de Drp-1 a la mitocondria es un

paso importante para el proceso de fisión. En levaduras Dnmp1 (análogo de Drp-1) se recluta a mitocondria mediante Fis-1p a través de adaptadores como Mdv1p y Caf4p, pero en mamíferos no se ha observado una interacción directa entre estas dos proteínas *in vivo*, sólo se ha mostrado una asociación débil utilizando proteínas recombinantes [147]. La disminución de los niveles de Fis-1 por un siRNA no cambió la migración de Drp-1 a membrana mitocondrial [118, 148]. Un estudio reciente informó la participación de la proteína Mff (Mitochondrial Fission Factor) en el proceso de fisión mitocondrial de mamíferos, observándose que una reducción en su expresión disminuye el reclutamiento de Drp-1 a la membrana externa y fisión mitocondrial. Interesantemente, la fisión mitocondrial inducida por sobreexpresión de Mff es independiente de la actividad de Fis-1 [149].

Regulación. Durante el proceso de fisión mitocondrial se producen cambios y redistribución de las proteínas responsables, por ejemplo, se ha determinado que Fis-1 se organiza alrededor de los futuros sitios de fusión, oligomerizando en complejos de aproximadamente 200 kDa en la membrana externa mitocondrial, siendo esta interacción de gran importancia para su actividad [150].

Por otro lado, la proteína Drp-1 parece ser la más ampliamente regulada de todas las proteínas relacionadas a la dinámica mitocondrial en células de mamíferos, al respecto *Taguchi et al.* demostraron que durante la mitosis, Drp-1 es fosforilada por Cdk1/ciclina B en serina 585, produciendo un incremento en su actividad y dando como resultado la fragmentación de la red mitocondrial para poder repartir dicho organelo entre ambas células hijas [151]. En otro estudio se observó que en neuronas y células HeLa expuestas a elevadas concentraciones de K^+ se producía fragmentación mitocondrial debido a la fosforilación de Drp-1 en serina 600 por la acción de la proteína quinasa $I\alpha$ dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CAMK $I\alpha$), que a su vez es activada por el influjo de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje, concluyéndose que la fosforilación por CAMK $I\alpha$ incrementa la actividad de Drp-1 [152]. Drp-1 también puede ser fosforilada por PKA en serina 637, pero esta fosforilación, a diferencia de las descritas, produce una disminución del reclutamiento de Drp-1 a membrana mitocondrial y por ende una disminución en

la fisión de la mitocondria. Sin embargo, este sitio de fosforilación también es blanco de la fosfatasa calcineurina que a través de su acción sobre Drp-1, genera incremento en la migración de esta proteína hacia la mitocondria y por lo tanto fragmentación de este organelo [153, 154]. Como se mencionó anteriormente, la proteína mitocondrial E3 ubiquitin ligasa MARCH-V participa en la modulación de la dinámica mitocondrial. Sin embargo los resultados son controversiales debido a que *Nakamura et al.* han descrito que su sobreexpresión produce elongación mitocondrial, mientras que *Karbowski et al.* mostraron que el uso de un siRNA para disminuir la expresión de MARCH-V genera este mismo efecto. Pese a estos antecedentes contradictorios, en ambos trabajos observan que MARCH-V interactúa con Drp-1, regulando su distribución subcelular [135, 155]. Los experimentos de inmunoprecipitación han revelado asociación entre Drp-1, la proteína SUMO y su enzima de conjugación Ubc9, confirmándose que ambas proteínas forman un complejo funcional que modifica a Drp-1, disminuyendo su degradación y generando fisión mitocondrial [156, 157]. Además durante la apoptosis, se produce un incremento en la sumoilación de Drp-1, que es dependiente de la presencia de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, lo que incrementa su asociación con la membrana mitocondrial [158].

Función. Los eventos de fisión mitocondrial se encuentran presentes en diversas etapas de la vida celular, por ejemplo, como se ha mencionado, durante la mitosis se produce fragmentación de la red mitocondrial para facilitar la distribución de este organelo entre las células hijas, mediante la regulación que ejerce Cdk1/ciclina B sobre la actividad de Drp-1 [151]. También se ha observado que la mitocondria cumple un importante papel en la apoptosis, debido a que la red mitocondrial es rápidamente fisionada al inducirse este tipo de muerte celular, donde se ha observado un aumento en el patrón punteado de Drp-1 que co-localiza con BAX. Al utilizar un siRNA para Drp-1 se impide la fragmentación y disminuye la muerte celular, al igual que cuando se utiliza un siRNA para Fis-1, impidiéndose la translocación de BAX y la liberación de citocromo c [137]. Por lo tanto, una célula que muere mediante apoptosis, experimenta eventos de fisión mitocondrial al menos durante el comienzo y el final de su vida.

Anteriormente se ha discutido la relación que existe entre los cambios morfológicos y la actividad de la red mitocondrial, destacándose que las primeras publicaciones asociaban a la fusión mitocondrial, principalmente a través de un aumento en la intercooperatividad del organelo, con un incremento en la función y eficiencia de la mitocondria. Esta relación se encuentra apoyada por el hallazgo de la participación de Mfn2 y OPA-1 en los procesos metabólicos y en la estructuración de las crestas mitocondriales respectivamente [122, 130, 146]. Sin embargo, los trabajos posteriores, han sugerido que esta relación no siempre se cumple. Es así como *Benard et al.* observaron que al disminuir la expresión de Drp-1, se genera fusión de la red mitocondrial, acompañada de una disminución en el consumo de oxígeno, en el contenido de ATP intracelular y en la actividad del complejo IV de la fosforilación oxidativa [159]. Además, posteriormente, *Parone et al.* obtuvieron resultados similares al utilizar un siRNA contra Drp-1, observándose disfunción mitocondrial, incremento en la producción de ROS y pérdida del DNA mitocondrial [160]. Estas evidencias condujeron a estos investigadores a concluir que los eventos de fisión, son necesarios para mantener la función mitocondrial. Por otro lado, en cultivos celulares se ha determinado que prácticamente en forma inmediata a un evento de fusión ocurre un evento de fisión, donde entre las mitocondrias resultantes, una exhibe un potencial de membrana elevado, con alta probabilidad de volver a sufrir eventos de fusión, mientras que la otra mitocondria tiene un potencial de membrana bajo y presenta una probabilidad muy escasa de volver a fusionarse. De esta forma se genera una población de mitocondrias despolarizadas que no vuelven a experimentar eventos de fusión y que finalmente son eliminadas por autofagia (mitofagia). Se ha concluido que este proceso ocurre para poder eliminar material mitocondrial que no puede ser reutilizado como tal y, por lo tanto, deberá ser reciclado mediante autofagia. Al inhibir la fisión mitocondrial, disminuye la mitofagia y la acumulación de proteínas mitocondriales oxidadas, generándose disfunción del organelo [161].

Todos éstos antecedentes ilustran la complejidad de establecer una relación clara entre morfología y actividad mitocondrial, pudiendo cambiar el escenario según el estímulo o condición utilizada y el modelo en estudio. A partir de todas estas evidencias,

se puede resumir que los procesos de fusión y fisión mitocondrial forman parte de un equilibrio, donde ambos componentes son necesarios para mantener una adecuada función bioenergética celular. En la **Figura 2** se muestran las principales etapas que tienen lugar en los procesos de dinámica mitocondrial identificando las proteínas que participan y las funciones asociadas a cada proceso.

4.4. Dinámica mitocondrial en la fisiopatología cardíaca

En la sección 4.2 se ha discutido ampliamente la participación de la mitocondria en el desarrollo de diversas patologías cardíacas, donde eventos que conducen a una disminución en el aporte metabólico mitocondrial en el cardiomiocito, generan finalmente un deterioro en la función del corazón. Por otro lado, también se ha mencionado que la dinámica mitocondrial, además de regular la morfología de este organelo, cumple un papel clave en su actividad. Por lo tanto, resulta evidente asociar los procesos de fusión/fisión mitocondrial a la mantención de la función cardíaca. Sin embargo, las mitocondrias en las células cardíacas se encuentran altamente empaquetadas entre las miofibrillas (mitocondrias intermiofibrilares) o entre la membrana plasmática y las miofibrillas (mitocondrias subsarcolemales), por lo que las mitocondrias en el cardiomiocito adulto no se encuentran aparentemente formando redes mitocondriales continuas como en otros tipos celulares [162].

Beraud et al. estudiaron la conectividad mitocondrial en los cardiomiocitos adultos de ratas sanas, utilizando la sonda mito tracker Green TM y microscopía confocal. Sus resultados muestran la existencia de pequeños movimientos mitocondriales, determinados como un leve desplazamiento en sus centros de fluorescencia, sin observarse eventos de fusión o fisión mitocondrial [163]. Esto puede deberse a la alta estructuración que presentan las mitocondrias en estas células, por lo que los eventos de dinámica mitocondrial podrían estar restringidos. Sin embargo, llama la atención la gran abundancia de las proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial en el corazón, lo que sugiere que estos organelos no se encuentran completamente libres de experimentar eventos de fisión/fusión en el tejido cardíaco [164].

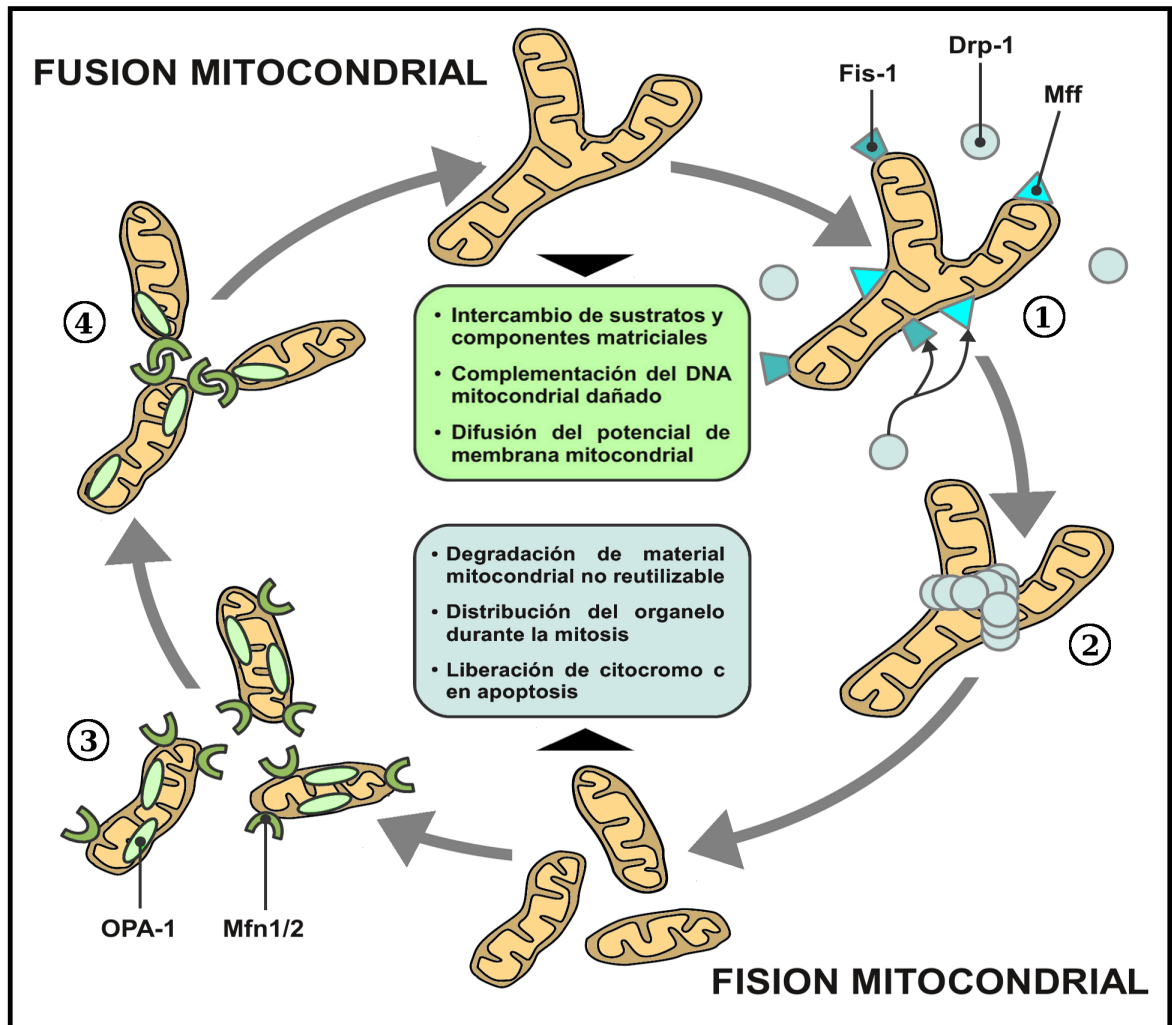


Figura 2: **Acciones y proteínas principales involucradas en la dinámica mitocondrial**

En la figura se muestran de forma general las diferentes etapas en los eventos de dinámica mitocondrial. Para el proceso de fisión mitocondrial se observa: 1) Reclutamiento de Drp-1 a membrana mitocondrial, mediante la posible interacción con Fis-1 o Mff. 2) Organización de Drp-1 rodeando la superficie mitocondrial para más tarde producir la contracción del organelo. Las etapas ilustradas para el proceso de fusión mitocondrial corresponden a: 3) reubicación y acercamiento de mitocondrias vecinas y 4) interacción entre las proteínas Mfn1/2 de las mitocondrias cercanas para dar lugar a la fusión de la membrana mitocondrial externa, evento coordinado con la fusión de la membrana mitocondrial interna mediante la acción de la proteína OPA-1. En los recuadros ubicados al centro del esquema se muestran las principales funciones asociadas a los procesos de dinámica mitocondrial.

Efectivamente, se ha observado que en condiciones patológicas se producen cambios en el equilibrio de la dinámica mitocondrial en el cardiomiocito adulto, al respecto, en un estudio reciente *Chen et al.* observaron una caída en los niveles de la proteína de fusión OPA-1 junto con una morfología mitocondrial fragmentada en corazón, con disminución en el área mitocondrial y un incremento en el número de mitocondrias utilizando un modelo de insuficiencia cardíaca post-infarto [165]. En este mismo estudio, el análisis de muestras humanas de corazones con cardiomiopatía isquémica mostró niveles proteicos aumentados de Mfn1, Mfn2, Drp-1 y una reducción en los niveles de OPA1. Interesantemente, *Ong et al.* describieron que la inhibición de la fisión mitocondrial protege al cardiomiocito frente al daño por isquemia/reperfusión, tanto *in vitro* como *in vivo*, determinando que el tratamiento con el inhibidor farmacológico de Drp-1, mdivi-1, aumentó la proporción de cardiomiocitos adultos con mitocondrias elongadas, protegió del daño por isquemia/reperfusión simulada, inhibió la apertura del poro de transición mitocondrial y disminuyó el área de infarto [166]. Estos resultados sugieren que la preservación de la fusión mitocondrial genera protección del cardiomiocito, sin embargo, un desplazamiento marcado del equilibrio morfológico hacia el fenotipo fusionado, finalmente conduce a un deterioro funcional en la célula cardíaca tal como lo han mostrado *Ashrafian et al.* quienes observaron un incremento en la elongación de la red mitocondrial en corazones de ratones que presentaban una mutación disfuncional en la proteína Drp-1 [167]. Además estos investigadores encontraron que disminuían los niveles de las proteínas relacionadas a la fosforilación oxidativa y el contenido de ATP cardíaco, generándose finalmente un tipo de cardiomiopatía dilatada. En contraste con lo descrito anteriormente, cardiomiocitos adultos deficientes en Mfn2, presentan protección y mejor recuperación frente a eventos de isquemia/reperfusión [168]. Estudios en cultivo de cardiomiocitos senescentes han mostrado la acumulación de mitocondrias de gran tamaño, lo que se ha relacionado con la pérdida de funcionalidad mitocondrial y un aumento de ROS, a su vez, el aumento del tamaño podría estar asociado a un proceso de fisión imperfecto, debido al daño oxidativo sufrido por la mitocondria [169, 170].

De acuerdo a lo expuesto, los procesos relacionados a dinámica mitocondrial ocurren en el cardiomiocito adulto principalmente en la respuesta patológica. Sin embargo,

en este modelo se hace complejo este tipo de investigación debido a la arquitectura que adquieren las mitocondrias y a la dificultad para generar cultivos primarios de cardiomiocitos adultos. Por esta razón las células HL-1 y los cultivos primarios de cardiomiocitos de animales neonatos son una herramienta de gran utilidad para investigar los cambios que experimenta el retículo mitocondrial frente a diversas condiciones. Las células HL-1 (cardiomiocitos auriculares de ratón) luego de 2 h de isquemia, muestran un fenotipo mitocondrial completamente fragmentado, y el uso del inhibidor de Drp-1, mdiv-1, impide la fisión mitocondrial, protegiendo de la apertura del PTPM y de la muerte celular. Como ya se ha mencionado, resultados similares se encontraron en este mismo trabajo, en cultivos de cardiomiocitos adultos, lo que demuestra que los resultados obtenidos en células HL-1 son extrapolables a cardiomiocitos adultos [166]. En otro estudio, los cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatas se trataron durante 48 h con el agonista α -adrenérgico fenilefrina. Estas células generaron respuesta hipertrófica, determinada mediante incremento en el área celular y en la incorporación de [H^3]-leucina, presentando una disminución en los niveles del mRNA para Mfn2. Estos hallazgos fueron corroborado, en el mismo trabajo, con modelos *in vivo* de hipertrofia cardíaca, obteniéndose resultados similares [171]. Estos últimos resultados son particularmente interesantes debido a que el crecimiento hipertrófico se considera una condición común a diversas patologías cardíacas. Los estudios epidemiológicos han establecido que este proceso es un evento primario en el remodelado cardíaco observado en el infarto al miocardio, hipertensión arterial, diabetes mellitus, arritmias y otras importantes patologías cardiovasculares y, por lo tanto, concita gran interés conocer los mecanismos moleculares y controlar su progresión. Actualmente las publicaciones que hacen referencia al proceso hipertrófico y a la dinámica mitocondrial son muy escasas, existiendo una sola publicación, discutida anteriormente, en la que se observó que la disminución de los niveles cardíacos de Mfn2 en ratón, genera una modesta hipertrofia, leve disfunción sistólica y una pequeña disminución en la fracción de acortamiento del cardiomiocito [168]. Sin embargo, estos hallazgos permiten suponer que podría existir una relación entre los eventos de dinámica mitocondrial y el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

Se desconoce, hasta la fecha, qué fenotipo de dinámica mitocondrial predomina en

el cardiomiocito hipertrófico, ni tampoco se conoce si la dinámica mitocondrial participa en el desarrollo de hipertrofia cardíaca. Además, debe recordarse que existen dos tipos de respuesta hipertrófica, con diferencias metabólicas fundamentales, una de carácter fisiológica en la cual aumenta tanto el consumo de glucosa como de ácidos grasos en el cardiomiocito, dando cuenta de un incremento sostenido en la actividad mitocondrial. En cambio, en el crecimiento hipertrófico cardíaco patológico, cambia el uso de combustible, aumentando el consumo de glucosa por sobre el de ácidos grasos, y produciéndose, en etapas más tardías, un deterioro generalizado de la función mitocondrial.

En su conjunto, toda la información aportada indica que se requiere investigar si existen cambios en el equilibrio morfológico de la mitocondria en el cardiomiocito hipertrófico, y si hay una relación causa efecto entre la dinámica mitocondrial y el desarrollo de hipertrofia cardíaca. Por este motivo, algunas de estas interrogantes se abordarán en la presente investigación.

5. HIPÓTESIS

“Los estímulos prohipertróficos IGF-1 y norepinefrina regulan la fusión/fisión mitocondrial del cardiomiocito”

6. OBJETIVOS

- Objetivo específico 1: Determinar si IGF-1 y norepinefrina modifican la morfología y actividad de la red mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos.

- Objetivo específico 2: Determinar expresión y niveles de proteínas de fusión/fisión mitocondrial en ambos modelos de hipertrofia y posibles mecanismos transduccionales implicados.

- Objetivo específico 3: Evaluar la participación de proteínas de fusión/fisión mitocondrial en el crecimiento hipertrófico de cardiomiocitos inducido por IGF-1 (estímulo prohipertrófico fisiológico) y norepinefrina (estímulo prohipertrófico patológico).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio Hank's, medio DME, medio 199, pancreatina, gelatina, triton X-100, 5-bromo-2'-deoxiuridina, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), anticuerpo anti α -actina (A5441), anti β -tubulina (T4026) y anti RCAN 1.4. En BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, EEUU) se adquirió el anticuerpo anti Drp-1 (611112). El anticuerpo anti Fis-1 (ALX-210-907) se obtuvo de Alexis Biochemicals (San Diego, CA, EEUU) y el anticuerpo anti mtHsp-70 (MA3-028) en ABR-Affinity Bioreagents (Gloster, CO, EEUU). Los anticuerpos anti Opa-1 (anticuerpo monoclonal producido en ratón; ab55772 y el anticuerpo policlonal producido en conejo; ab42364) se compraron en Abcam (Cambridge, MA, EEUU), mientras que en Cell Signalling (Danvers, MA, EEUU) se obtuvieron los anticuerpos anti Mfn2 y anti fosfo-Drp-1 (Ser 637). De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron: colagenasa tipo II, suero fetal bovino (FBS) y suero de ternera (FCS). Mitotracker Green-FM (M7514), tetrametilrodamina metil éster perclorato (TMRM, T-668) y los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexas anti ratón y conejo (A-11036, A-11034, A-11031 y A-11029) se compraron en Molecular Probes - Invitrogen (Eugene, OR, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, Ca, EEUU). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot ECL se adquirió en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra) y el antagonista prazocín fue obtenido en laboratorios Pfizer S.A. Para la determinación de genes reporteros se utilizó el kit Luciferase assay kit (cat: E1500 Promega). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a no ser que se especifique lo contrario. El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU).

7.2. Modelo experimental

Para la realización de esta tesis se utilizó como modelo experimental cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata, los cuales se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Todos los animales se trataron siguiendo las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de experimentación: Guide for the use of laboratory animals (NIH, Publication No. 85-23, revised 1996), siendo los protocolos experimentales además aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

7.3. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, los corazones se removieron y lavaron a 37°C en medio Hank's estéril, luego fueron desprovistos de sus aurículas, para finalmente ser homogenizados con el fin de comenzar con la digestión enzimática, la cual permite obtener las células aisladas. Los ciclos de digestión se realizaron en presencia de colagenasa de tipo II (0,02 gr/100 mL Hank's) y pancreatinaa (0,06 gr/100 mL Hank's). Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial a superficies plásticas que presentan los 2 tipos celulares presentes en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos). El producto de la digestión se pre-plaqueó en botellas de cultivo de 250 mL durante 2 h en medio DME:M199 (4:1) 10% FBS. Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron, centrifugaron a 1.000 r.p.m durante 5 min y resuspendieron en 21 mL de medio DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán, el que permite visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer.

Conocida su concentración, las células se sembraron en DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS a distintas densidades, según las necesidades experimentales, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina, sobre placas de cultivo precubiertas con una monocapa de

gelatina (2 % p/v) y mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5 % y 95 % de aire [172].

7.4. Estímulo hipertrófico

IGF-1 recombinante humano fue donado por el Dr. C. George-Nascimento (Austral Biologicals, San Ramon, CA) y norepinefrina (-) (A7257) se obtuvo en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). Después de 24 h posteriores al sembrado, las células se lavaron 3 veces con tampón moscona estéril mantenido a 37°C, para luego ser dejadas por 24 h con medio DME:M199 (4:1) en ausencia de suero fetal. Transcurrido éste tiempo los cardiomiocitos se estimularon con norepinefrina 10 μ M o con IGF-1 10 nM entre 0 y 48 h, dependiendo del experimento.

7.5. Tratamiento adenoviral y uso de plasmidios

Los adenovirus recombinantes que expresan un RNA antisentido para Mfn2 (AsMfn2) y una proteína dominante negativo para Drp-1 (K38A), fueron facilitados por el Dr. Antonio Zorzano (Institute of Research in Biomedicine, Barcelona Science Park, Universitat de Barcelona, España). El adenovirus AsMfn2 consiste en el transcrito antisentido para el gen de ratón de Mfn2 entre 1 y 370 bp [122], mientras que el adenovirus dominante negativo para Drp-1 expresa la proteína mutante Drp-1 K38A [173]. Ambos adenovirus fueron amplificados en células 293 y purificados mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Los adenovirus que expresan la sub unidad catalítica de calcineurina constitutivamente activa (AdCN) y el péptido inhibitorio de la misma proteína (CAIN), fueron donados por el laboratorio del Dr. Jeffery D. Molkenin (Division of Molecular Cardiovascular Biology, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, EEUU) [174]. Los cardiomiocitos se transdujeron con AsMfn, K38A o CAIN 24 h antes de recibir el estímulo hipertófico a una multiplicidad de infección (MOI) de 1000 partículas virales por célula a excepción del adenovirus CAIN, cuyo MOI fue de 2000. El AdCN se utilizó a un MOI de 1000 por 48 h, mientras que el adenovirus control o Mock se utilizó a los mismos tiempos y concentraciones que las herramientas adenovirales descritas.

Para determinar la expresión de las proteínas asociadas al programa genético fetal ANF y SKA, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos y se transfectaron con 0,4 μg de plasmidios reporteros que contenían el sitio promotor de la proteína de interés acoplado al gen de luciferasa (“firefly”), como control de transfección se utilizó el plasmidio pRL TK (reportero timidin quinasa acoplado a luciferasa renilla). La transfección se realizó en medio DME:M199 en ausencia de antibióticos durante al menos 6 h, luego de las cuales las células se lavaron y se les restauró el medio. La actividad luciféasa se determinó mediante el uso de un luminómetro a temperatura ambiente. Los plasmidios reporteros ANF-lux y SKA-lux, fueron donados por el Dr. K.R. Chien (Harvard Medical School) y el Dr. M.D. Schneider (Baylor College of Medicine) respectivamente [175].

7.6. Preparación de extractos celulares totales

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con solución PBS fría y luego se lisaron con 80 μL de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; tritón X-100 1 % v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na_3VO_4 1 mM). El homogenizado se centrifugó a 10.000 r.p.m durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x, para ser almacenado posteriormente a -20°C .

7.7. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, se cargaron alrededor de 30 μg de extracto proteico. El gel concentrador se preparó al 5% y el separador al 12%, sin embargo para la detección de βMHC se utilizó un gel en gradiente cuyas concentraciones fluctuaban entre el 5 y el 12%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante (100 V) en tampón de electroforesis. Una vez realizada la electroforesis, las

proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, EEUU) de 0,45 μm a 0,45 A por 90 min en tampón de transferencia.

7.8. Western blot

Una vez transferidas, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios a una dilución 1:1.000, salvo Drp-1 (dilución 1:750), β MHC (dilución 1:3.000) y RCAN 1.4 (dilución 1:2.000), en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) toda la noche a 4°C y con agitación suave. Luego, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario; anti-IgG de ratón o conejo conjugado con peroxidasa, según corresponda, en un título de 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS 1x; Tween-20 al 0,1%.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot ECL y se expusieron en una película de fotografía Kodak-Biomax.

Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h en una solución de rojo Ponceau (rojo ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos. Posteriormente, para corregir las posibles diferencias de cantidades de proteínas cargadas en el gel, se analizaron los niveles de α -actina o β -tubulina, mediante reacciones de inmunodetección iguales a las descritas anteriormente (1° anticuerpo 1:1.000 y 2° anticuerpo anti-ratón 1:5.000 para ambos anticuerpos).

7.9. Inmunofluorescencia indirecta

Posterior al cultivo, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2%). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón

X-100 al 0,1 % en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1 % en PBS (filtrado) durante 1 h. Posteriormente, para determinar la distribución subcelular de las proteínas de fisión mitocondrial y para determinar la morfología de este organelo, las células se incubaron con los anticuerpos anti: Drp-1 (dilución 1:750), Fis-1 (dilución 1:1.000) o mtHsp70 (dilución 1:1.000), en PBS-BSA 1 % durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron por 2 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz con el anticuerpo secundario Alexa 488 o 568, anti IgG de ratón o anti IgG de conejo, según corresponda (dilución 1:500). Por otro lado, para determinar el grado de sarcomerización, las células se trataron con la sonda faloidina-rodamina (dilución 1:500) y Hoechst (dilución 1:1000) para visualizar los núcleos. Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje. Luego, las preparaciones para Drp-1, Fis-1 y mtHsp70 se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss Microsystems, Oberkochen, Alemania), mientras que las células tratadas para determinar sarcomerización se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia, salvo que se indique lo contrario. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (NIH, EEUU), y se describe en detalle más adelante.

7.10. Citometría de flujo

Para todos los experimentos en que se realizó citometría de flujo, se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Una vez finalizados los tratamientos y la carga de la sonda respectiva, se removió el medio y las células se soltaron utilizando 300 μ L de una solución de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS durante 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min de tripsinización, la reacción se detuvo utilizando SFB en una proporción 1:10. Posteriormente, las células ya cargadas se traspasaron a tubos BD para citometría y su fluorescencia se analizó en un citómetro de flujo FACS – SCAN (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, EEUU). Esta técnica se utilizó para estudiar los siguientes parámetros:

- Potencial de membrana mitocondrial: para esta determinación se usó la sonda TMRM (excitación: 543 nm, emisión: sobre los 560 nm) a una concentración de

200 nM, las células se preincubaron por 30 min y como control se utilizó el agente desacoplante CCCP 50 μ M, el cual también se preincubó por 30 min antes de la medición [176].

- Producción de ROS: se utilizó la sonda 1,2,3 Dihidrorodamina (DHR) (Excitación: 488 nm, Emisión: 515 nm), preincubada por 30 min y peróxido de hidrógeno 100 μ M, como control (15 min antes de la determinación) [177].
- Viabilidad celular: se determinó mediante incorporación de yoduro de propidio (PI) (excitación: 493 nm, emisión: 630 nm), como control se usó peróxido de hidrógeno 1mM [178].
- Porcentaje de células apoptóticas: También se determinó mediante incorporación de PI, pero en células fijadas y permeabilizadas con metanol 100%. De esta manera, las células apoptóticas (que presentan fragmentación del DNA) tienen una fluorescencia menor, lo que se visualiza como un incremento en la población sub G1. Como control de apoptosis, las células se incubaron por 6 h con sorbitol 300 mOsm [179, 180].
- Masa mitocondrial total: Para evaluar este parámetro, los cardiomiocitos se incubaron por 30 min con la sonda mitotracker Green FM (MTG) a una concentración de 400 nM. Como esta sonda se une específicamente a mitocondria, cualquier cambio en el contenido mitocondrial de la célula, provocará variaciones en la fluorescencia medida por citometría.

7.11. Determinación de los niveles intracelulares de ATP

Para determinar los niveles relativos de ATP intracelular, se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células/pocillo. Una vez finalizados los estímulos, se removió el medio de las placas y se agregaron 20 μ L de medio Krebs con Ca^{2+} (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,0 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES-Na, 5,6 mM glucosa, pH 7,4). A continuación, se adicionó el tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) en una relación 1:1. La placa se agitó durante 2 min

con el fin de completar la reacción. Posteriormente, las células se traspasaron a una placa opaca de 96 pocillos y se analizaron en un luminómetro TopCountNXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EEUU), siendo la luminiscencia estable por un período de hasta 4 h [181].

7.12. Medición de la velocidad del consumo de oxígeno celular

Para este tipo de ensayos se utilizaron placas de cultivo de 60 mm con una densidad celular de 3×10^6 células/placa. Una vez finalizados los estímulos, se procedió a remover el medio y lavar las células tres veces con solución PBS. Posteriormente, las células se soltaron utilizando 1 mL de solución tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS durante 5 min a 37°C, esta reacción luego se detuvo con SFB en una proporción 1:10. Una vez finalizada la tripsinización, las células se traspasaron a un tubo eppendorf y se centrifugaron por 5 min a 1600 r.p.m. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y la pella se resuspendió en 200 μ L de PBS, los cuales se vertieron en una cámara (volumen final de 600 μ L) acoplada al sistema de electrodos. La velocidad del consumo de oxígeno se registró en un electrodo de Clark 5331 (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EEUU), acoplado a un sistema de registro digital, mediante la utilización del programa WinDaq Data Acquisition Software (Akron, OH, EEUU) a 25°C. Los datos se guardaron en formato .csv y se analizaron utilizando el programa Origin Pro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU). Una vez que se extrajeron las pendientes de las curvas obtenidas para cada condición, los resultados se expresaron como promedios de las mediciones normalizadas con respecto a las células control [182].

Adicionalmente, y como un control interno de todos los experimentos realizados, antes de que las células consumieran el 100% del oxígeno presente en la cámara, también se evaluó la velocidad de respiración desacoplada (Uncoupled Respiration Ratio, UCR), la cual corresponde al inverso de la denominada tasa de control respiratorio y da cuenta de la capacidad total de la cadena transportadora de electrones en relación a la respiración basal parcialmente acoplada. Para esto, una vez que las células han consumido aproximadamente el 75% del oxígeno de la cámara, se les agregó CCCP a una concentración final de 2 nM.

7.13. Visualización de la morfología mitocondrial

Luego de realizar los distintos estímulos prohipertróficos, los cardiomiocitos de ratas neonatas se incubaron con la sonda MTG preparada en tampón Krebs por 25 min a 37°C y a una concentración de 400 nM, posteriormente utilizando un microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5 equipado con una cámara enfriada CCD y un sistema de adquisición de imágenes LSM, se observó la fluorescencia de la red mitocondrial mediante la excitación con láser de argón a una longitud de onda a 488 nm. Los cubreobjetos conteniendo los cardiomiocitos cargados con MTG se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 μ L de solución y las imágenes de fluorescencia se adquirieron como secuencias de profundidad en el eje Z cada 0,5 μ m, siendo cada secuencia de 8 a 12 imágenes. Se utilizó el lente objetivo de 60x el cual posee una apertura numérica de 1,2 [178].

7.14. Análisis digital de las imágenes

Las secuencias de imágenes obtenidas con la sonda MTG se deconvolucionaron para eliminar la fluorescencia fuera de foco, usando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (Point Spread Function) correspondiente a las condiciones experimentales. Una vez que las imágenes se deconvolucionaron, se contó el número de partículas teñidas con MTG, así como su volumen, utilizando el programa accesorio 3D Object Counter para Image J [178].

La cuantificación digital de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta se realizó analizando los coeficientes de Manders para cada una de las señales fluorescentes en estudio y asociadas a dos canales diferentes en el microscopio confocal, para lo cual se utilizó el programa accesorio Colocalization Finder para Image J [178]. Previo a este análisis, también se utilizó la eliminación de la fluorescencia fuera de foco usando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Para la determinación del área celular relativa se utilizó el programa ImageJ, trazando el contorno de cada célula en forma manual. Se analizaron entre 50 y 100 células para cada condición, además, utilizando las mismas muestras, se determinó el porcentaje de

cardiomiocitos que presentaban sarcomerización [175].

7.15. Análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados (a menos que se indique un análisis estadístico distinto), considerándose como significativo un $p < 0,05$.

8. RESULTADOS

8.1. Objetivo 1: Determinar si IGF-1 y norepinefrina modifican la morfología y actividad de la red mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos

El equilibrio de los procesos de fusión y fisión mitocondrial dan cuenta de la morfología de estos organelos y además regulan la actividad de los mismos, observándose que un aumento en los niveles de las proteínas relacionadas con la fusión mitocondrial incrementan la actividad metabólica de la mitocondria [122, 130]. Esta actividad mitocondrial desempeña un papel fundamental en el proceso hipertrófico puesto que alteraciones en el metabolismo oxidativo conllevan una disminución de la energía disponible para el trabajo contráctil, incrementando el cuadro patológico [75]. Actualmente se desconoce qué tipo de morfología mitocondrial predomina en el cardiomiocito hipertrófico. Sin embargo, un estudio reciente demostró que en cultivos de cardiomiocitos neonatos de rata estimulados con fenilefrina y en algunos modelos de hipertrofia *in vivo*, ambos asociados a la respuesta patológica, los niveles del mRNA de Mfn2 disminuían significativamente [171]. Considerando estos antecedentes, podría esperarse que en estos modelos de hipertrofia patológica prevalezca una morfología mayoritariamente fragmentada en la red mitocondrial, pero no existen evidencias que esclarezcan esta interrogante.

8.1.1. Efecto de los estímulos prohipertróficos sobre la morfología mitocondrial

Para resolver el objetivo 1, el primer paso fue determinar si los estímulos prohipertróficos producían un desplazamiento en el equilibrio de los procesos de dinámica mitocondrial. Con este fin, cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas se estimularon a distintos tiempos (0-48 h) con NE (10 μ M), estímulo prohipertrófico patológico, o con IGF-1 10 nM, estímulo prohipertrófico fisiológico. Posteriormente, las células se incubaron con la sonda fluorescente MTG (400 nM) y la red mitocondrial se visualizó mediante microscopía confocal, obteniéndose imágenes como

secuencias de profundidad en el eje z cada 0,5 μm y determinándose el número relativo de mitocondrias por célula, el volumen mitocondrial promedio y el porcentaje de células que presentan morfología mitocondrial fragmentada.

En la **Figura 3** se observa que el tratamiento con NE, a partir de las 24 h de exposición, produce un incremento en el porcentaje de cardiomiocitos que presentan fragmentación de la red mitocondrial ($14 \pm 1\%$; $39 \pm 8\%$ y $53 \pm 8\%$ para las 0, 24 y 48 h, respectivamente), lo que se correlaciona con un incremento significativo en el número de mitocondrias por célula (con un aumento del $48 \pm 10\%$ para las 24 h y $84 \pm 9\%$ para las 48 h), y con una disminución en el volumen mitocondrial promedio ($23 \pm 8\%$ a las 24 h y $46 \pm 2\%$ para las 48 h) (valores promedio \pm SEM). De estos resultados se puede concluir que la exposición a NE ($10 \mu\text{M}$) produce fragmentación de la red mitocondrial en el cardiomiocito, observándose resultados estadísticamente significativos a partir de las 24 h y con una respuesta mayor a las 48 h de tratamiento.

Por otro lado, al analizar las imágenes obtenidas de cardiomiocitos estimulados con IGF-1 (**Figura 4**) y al cuantificar los parámetros relacionados a morfología mitocondrial, no se observaron cambios significativos, por lo tanto, este experimento sugiere que en la hipertrofia producida por IGF-1, no existen cambios perceptibles en la morfología mitocondrial.

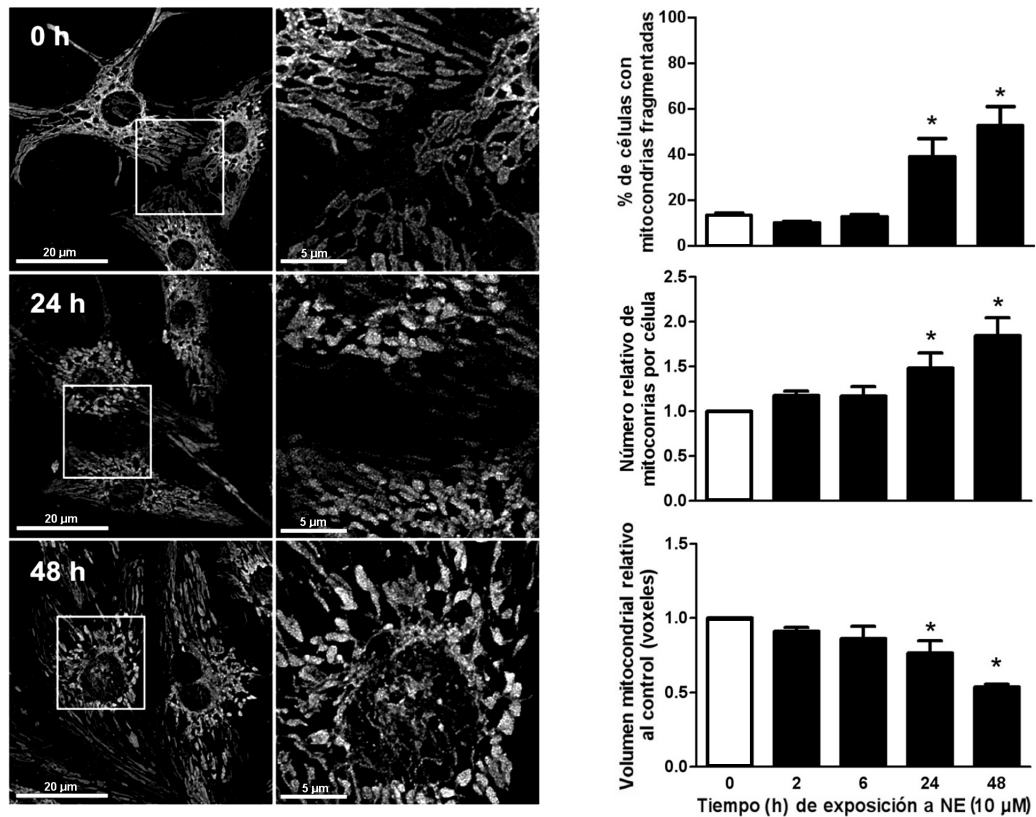


Figura 3: **Efecto de NE sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito**

El panel izquierdo corresponde a imágenes de microscopía confocal para cardiomiocitos tratados por 0, 24 y 48 h con NE (10 μ M) e incubados con Mitotracker Green (400 nM), 20 min antes, para visualizar la red mitocondrial. En el panel derecho se muestran los gráficos para el porcentaje de células con morfología mitocondrial fragmentada, número de mitocondrias por célula relativo al control y el volumen mitocondrial relativo al control a los tiempos de 2, 6, 24 y 48 h. Para el tratamiento de imágenes y la determinación de los parámetros morfológicos, se utilizó el plugin object counter 3D del software ImageJ. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio \pm SEM (n=5 experimentos independientes). En cada experimento individual se analizaron 20 células escogidas al azar para cada condición. *p<0,05 vs tiempo 0.

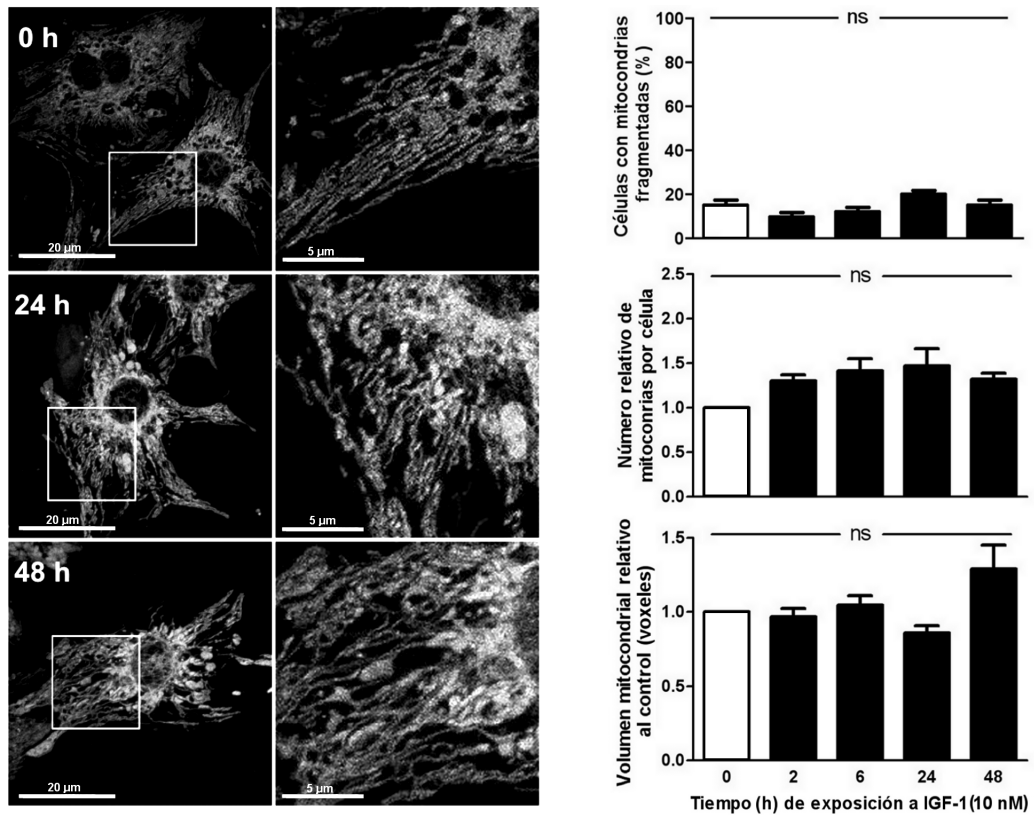


Figura 4: **Efecto de IGF-1 sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito**
 A la izquierda se observa, mediante el uso de Mito tracker Green TM y microscopía confocal, la red mitocondrial de cardiomiocitos tratados con IGF-1 (10 nM) por 0, 24 y 48 h, mientras que a la derecha se encuentran los gráficos correspondientes a la cuantificación del porcentaje de células con morfología mitocondrial fragmentada, número de mitocondrias por célula relativo al control y el volumen mitocondrial relativo al control a las 0, 2, 6, 24 y 48 h de exposición a IGF-1. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio \pm SEM (n=4 experimentos independientes). En cada experimento individual se analizaron 20 células escogidas al azar para cada condición. ns=no significativo.

Diversos grupos han descrito que la estimulación con NE produce apoptosis en el cardiomiocito [183], además, también se ha descrito que durante la inducción del proceso apoptótico las mitocondrias son rápidamente fragmentadas, por lo tanto es probable que la fisión mitocondrial observada se deba simplemente a la presencia de cardiomiocitos apoptóticos. Para resolver esta interrogante se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo e incorporación de PI en cardiomiocitos tratados con ambos estímulos hipertróficos, además, la misma técnica se utilizó para investigar el porcentaje de células apoptóticas en cardiomiocitos fijados y permeabilizados (**Figura 5**).

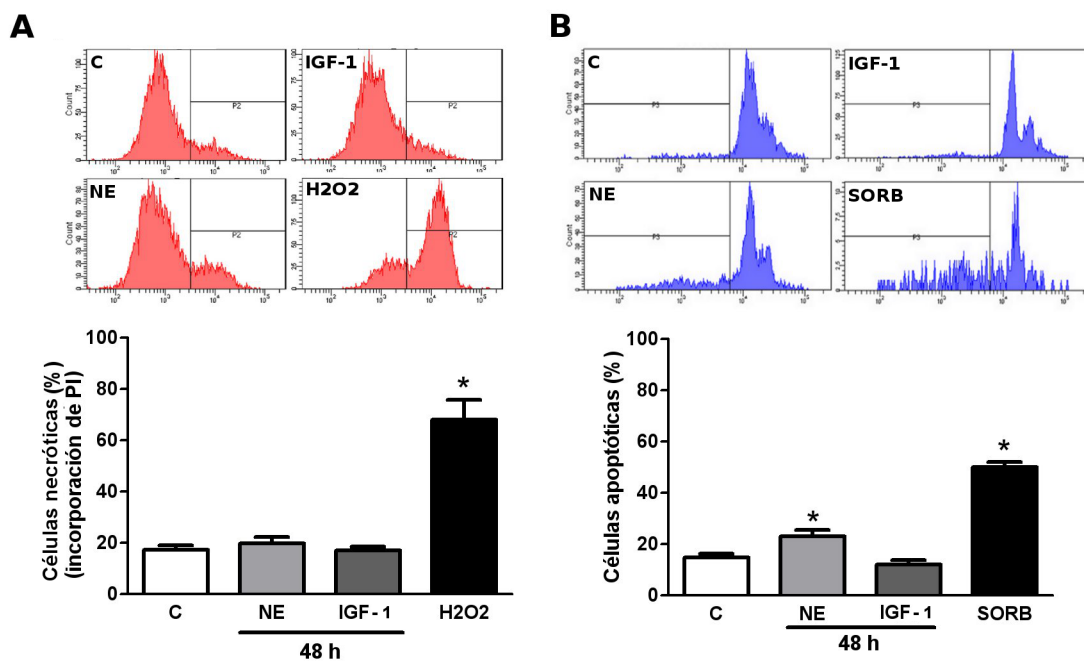


Figura 5: Efecto de los estímulos prohipertróficos sobre la viabilidad y la inducción de la apoptosis

Cardiomiocitos de ratas se trataron con NE (10 μ M) o IGF-1 (10 nM) por 48 h y se determinó el A) porcentaje de células con incorporación de PI, como medida de necrosis, y B) porcentaje de células que presentan aumento de la fracción subG1, en cardiomiocitos fijados y permeabilizados, como parámetro indicativo de apoptosis. En la parte superior se muestran los histogramas representativos para cada una de las condiciones y los gráficos corresponden a la respectiva cuantificación. H2O2 1 mM, sorbitol (SORB) 300 mOsm, Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=3 experimentos independientes) *p<0.05 vs C.

Los resultados revelan que NE e IGF-1 no producen cambios en el porcentaje de células que presentan incorporación de PI respecto al control ($23 \pm 1\%$ y $18 \pm 3\%$ vs $17 \pm 2\%$, para NE, IGF-1 y C respectivamente; promedio \pm SEM). Por otro lado, IGF-1 tampoco provocó cambios en la inducción del proceso apoptótico, sin embargo, cuando los cardiomiocitos son expuestos a NE, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas respecto al control ($23 \pm 3\%$ para NE vs $15 \pm 1\%$ para C; valores promedio \pm SD). Para determinar si el aporte que entrega la población de células apoptóticas a la fragmentación mitocondrial producida por NE es importante, se restó el porcentaje de células apoptóticas al porcentaje de cardiomiocitos con fenotipo mitocondrial fragmentado (dato no mostrado). Los resultados indican que aún prevalece una diferencia significativa en el porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas entre el grupo control y el estimulado con NE por 48 h ($14 \pm 2\%$ vs $44,49 \pm 7\%$; respectivamente), por lo tanto, la inducción del proceso apoptótico mediado por NE, no da cuenta del aporte total de células con fragmentación de la red mitocondrial.

Otro factor que puede afectar la cuantificación morfológica de la mitocondria es su biogénesis, debido a que puede llevar a un incremento en el número de partículas mitocondriales por célula, sin que se produzcan cambios en la dinámica del organelo. Para determinar si los estímulos hipertróficos generan cambios en el contenido mitocondrial, cardiomiocitos de ratas neonatas se trataron con NE ($10 \mu\text{M}$) o IGF-1 (10 nM) por 48 h, y se determinó la masa mitocondrial total mediante tinción con MTG y citometría de flujo. Además, se investigó posibles cambios en los niveles de la proteína mtHsp70, por Western blot en extractos totales. Esta proteína es exclusiva de mitocondria donde se encuentra formando parte del complejo TOM20, y por lo tanto cambios en la biogénesis o en la degradación mitocondrial se verán reflejados en el contenido de esta proteína. En la **Figura 6** se muestran los resultados correspondientes a estas dos mediciones, observándose que la exposición a los estímulos prohipertróficos no cambió la fluorescencia emitida por las células cargadas con MTG, ni en el contenido de mtHsp70, por lo tanto, se puede concluir que no se encontraron alteraciones en el contenido mitocondrial total de cardiomiocitos sometidos a los tratamientos hipertróficos.

Finalmente, para comprobar si la fragmentación de la red mitocondrial generada

por NE se produce en aquellos cardiomiocitos que desarrollan el fenotipo hipertrófico, las células se trataron con la sonda fluorescente faloidina-rodamina, que permite visualizar la organización sarcomérica mediante la unión a F-actina, considerando como criterio hipertrófico un incremento en la estructuración de los sarcómeros, y también se realizó una inmunofluorescencia indirecta para la proteína Hsp70 mitocondrial. Esta aproximación permite determinar la morfología de la mitocondria en aquellas células que muestran características hipertróficas.

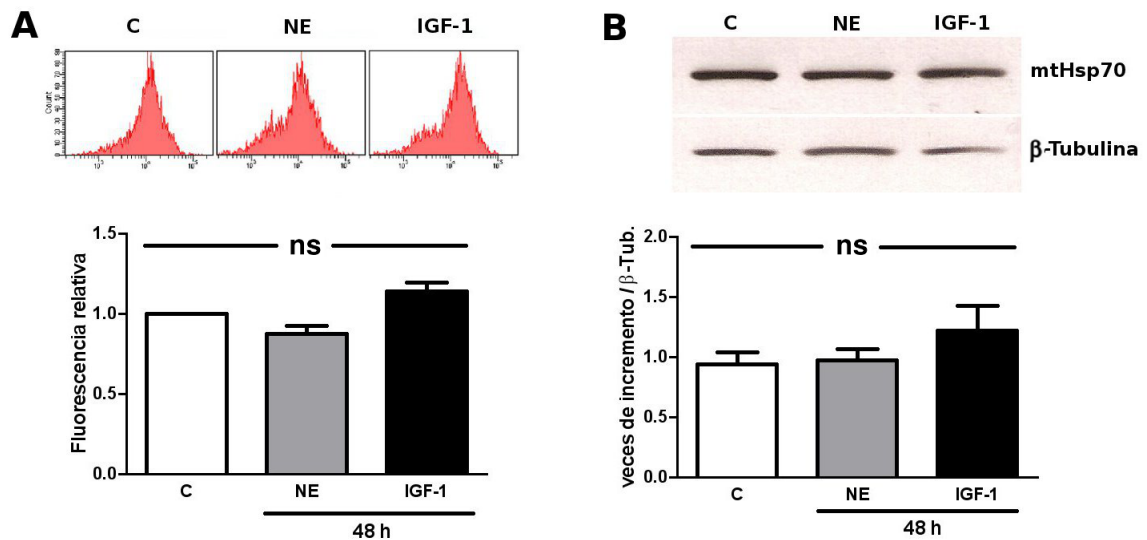


Figura 6: Efecto de NE e IGF-1 sobre el contenido mitocondrial

Luego del tratamiento con los estímulos prohipertóxicos por 48 h, se determinó el contenido mitocondrial total en los cardiomiocitos mediante A) tinción con MTG y citometría de flujo, las imágenes superiores corresponden a histogramas representativos para cada una de las condiciones, y el gráfico inferior corresponde a la cuantificación de la fluorescencia media; y B) Western blot de extractos totales para la determinación de los niveles de la proteína mitocondrial mtHsp70. Los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=6$ experimentos independientes). ns = no significativo.

La **Figura 7A** muestra imágenes de microscopia confocal para cardiomiocitos de ratas neonatas sometidos a los tratamientos antes descritos y estimulados con NE por 48 h, además de cardiomiocitos control (C). Como se puede observar, cuando NE desencadena la respuesta hipertrófica, se produce un aumento en la sarcomerización del cardiomiocito, visualizado como un incremento en la organización de las fibras contráctiles (tinción en rojo). Además, en las células no estimuladas, se observan mitocondrias tubulares y alargadas, mientras que en el cardiomiocito hipertrófico la morfología cambia, para dar paso a mitocondrias esféricas y menos interconectadas (tinción en verde).

El incremento en la sarcomerización se produce por un aumento en la organización de los sarcómeros y por una mayor presencia de unidades sarcoméricas, por lo tanto en estas células se produce un incremento en los niveles de F-actina, siendo capaces de fijar más faloidina-rodamina y generando una mayor respuesta fluorescente. La **Figura 7B** muestra un gráfico con la cuantificación de esta magnitud y otro con la determinación del área celular, observándose un incremento en la fluorescencia, indicativo de sarcomerización, y en el tamaño del cardiomiocito. La **Figura 7C** muestra la cantidad de mitocondrias por célula, observándose un incremento respecto a la situación control, y el área mitocondrial promedio, observándose una disminución en los cardiomiocitos tratados con NE.

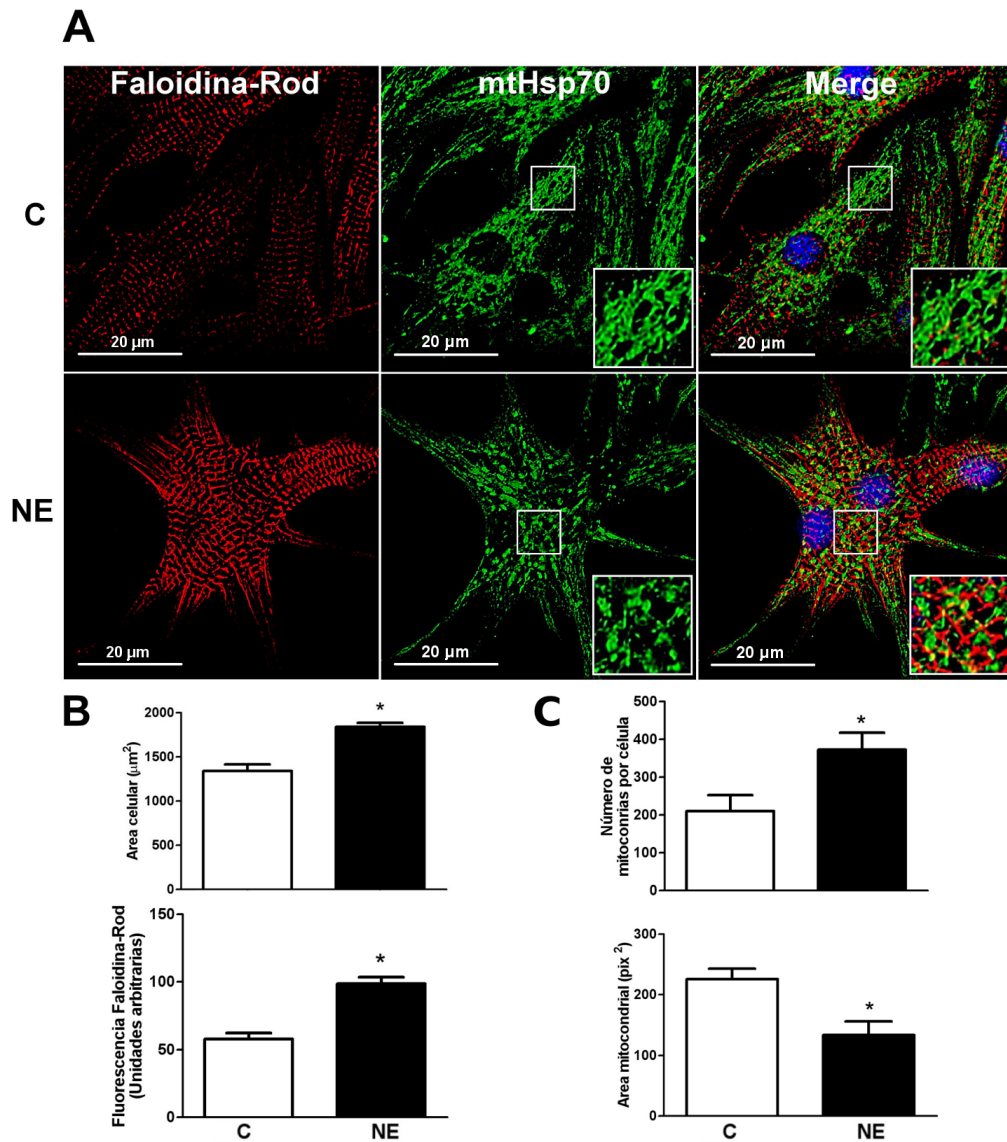


Figura 7: **Sarcomerización y morfología mitocondrial en cardiomiocitos estimulados con NE**

Luego del tratamiento con NE ($10 \mu\text{M}$) por 48 h, los cardiomiocitos se fijaron y permeabilizaron para ser incubados con la sonda faloidina-rodamina y con un anticuerpo específico para detectar la proteína de membrana mitocondrial mtHsp70. A) imágenes de microscopía confocal para visualizar las estructuras sarcoméricas (color rojo) y la morfología mitocondrial (color verde) del cardiomiocito. La figura del panel inferior derecho de cada imagen, muestra un detalle (magnificación 2,5x) de la sección más pequeña delimitada por el recuadro blanco. B) Gráficos con la cuantificación de parámetros indicativos de hipertrofia. C) Gráficos con la cuantificación de parámetros de morfología mitocondrial. C = control; NE = norepinefrina; Faloidina-Rod. = Faloidina-Rodamina; Los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=3$ experimentos independientes); * $p<0,05$ vs su respectivo control.

8.1.2. Determinación de parámetros metabólicos mitocondriales

Como se ha mencionado anteriormente, en el desarrollo de hipertrofia patológica se producen cambios en la utilización de sustratos metabólicos, incrementándose el consumo de glucosa por sobre el de ácidos grasos. Además el proceso patológico se asocia a disfunción mitocondrial y fallas contráctiles, mientras que en la hipertrofia fisiológica se incrementa la utilización, tanto de glucosa como de ácidos grasos, generando un incremento metabólico sostenido y una mejora en la función del corazón. Para identificar si los estímulos prohipertróficos producen cambios en la actividad mitocondrial del cardiomiocito, se determinaron los siguientes parámetros que dan cuenta de la función mitocondrial: el potencial de membrana mitocondrial, la generación de ROS, el contenido intracelular de ATP (ATPi) y la velocidad de consumo de oxígeno.

El potencial de membrana mitocondrial se genera mediante el paso de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, a través de los complejos I, III y IV en la fosforilación oxidativa y es la fuerza motriz para la producción de ATP en el complejo V (ATP sintetasa). Para la determinación de este parámetro se utilizó la sonda tetrametilrodamina metil éster (TMRM), que se une a mitocondria de manera dependiente de su potencial de membrana, determinándose la fluorescencia por citometría de flujo (**Figura 8**). El tratamiento con IGF-1 no cambió el potencial de membrana mitocondrial a los tiempos estudiados, sin embargo la exposición a NE provocó una caída significativa de la fluorescencia a las 48 h.

La generación de ROS se encuentra incrementada en procesos que generan disfunción mitocondrial, para su estudio se utilizó la sonda fluorescente 1, 2, 3 dihidrorodamina (DHR), que es oxidada a 1, 2, 3 rodamina en presencia de H_2O_2 y luego el cambio en la fluorescencia se detectó mediante citometría de flujo. En la **Figura 9** se observa que NE aumentó significativamente la fluorescencia a las 48 h de exposición, mientras que no se encontraron cambios significativos en cardiomiocitos tratados con IGF-1.

La **Figura 10** corresponde a la determinación del contenido de ATPi. Para este fin se utilizó el kit Cell-Titer Glo (Promega) y luminómetro de placa. A las 48 h de tratamiento

con NE disminuyó significativamente del contenido de ATPi, mientras que el tratamiento con IGF-1, nuevamente no mostró ningún cambio.

Al observar que IGF-1 no produjo cambios en ninguno de los parámetros metabólicos hasta ahora estudiados, la determinación de la velocidad del consumo de oxígeno se evaluó solamente en cardiomiocitos estimulados con NE. En la **Figura 11** se observa que la exposición a NE por 48 h, genera una disminución significativa en el consumo de oxígeno, sin cambios en la velocidad respiratoria máxima.

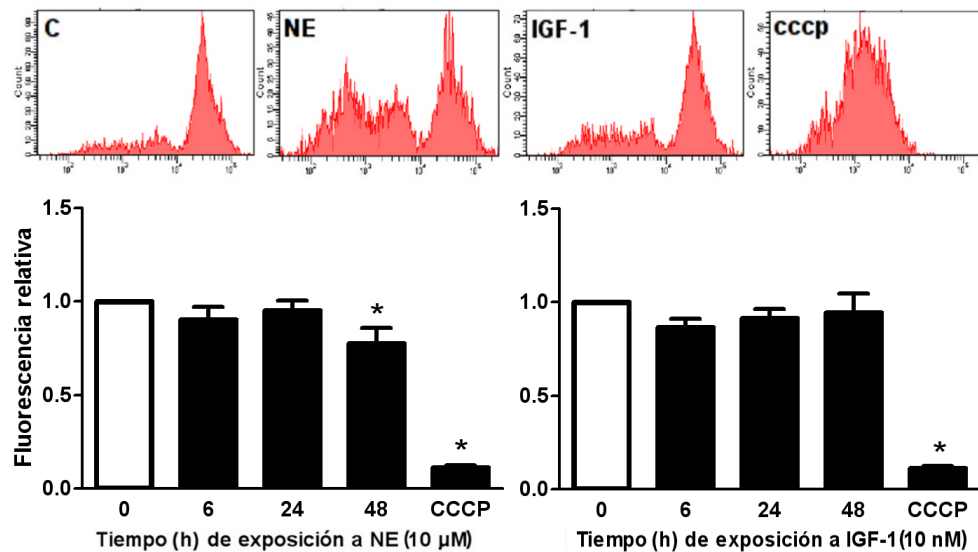


Figura 8: **Potencial de membrana mitocondrial en cardiomiocitos estimulados con IGF-1 y NE**

Cardiomiocitos se estimularon con NE (10 μM) o IGF-1 (10 nM) por 0, 6, 24 o 48 h y luego se incubaron con la sonda TMRM (100 nM) por 20 min para determinar el potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo. En la parte superior se observan los histogramas representativos para 48 h de estímulo, como control se utilizó el agente desacoplante CCCP; Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=4 experimentos independientes) * p<0,05 vs tiempo 0.

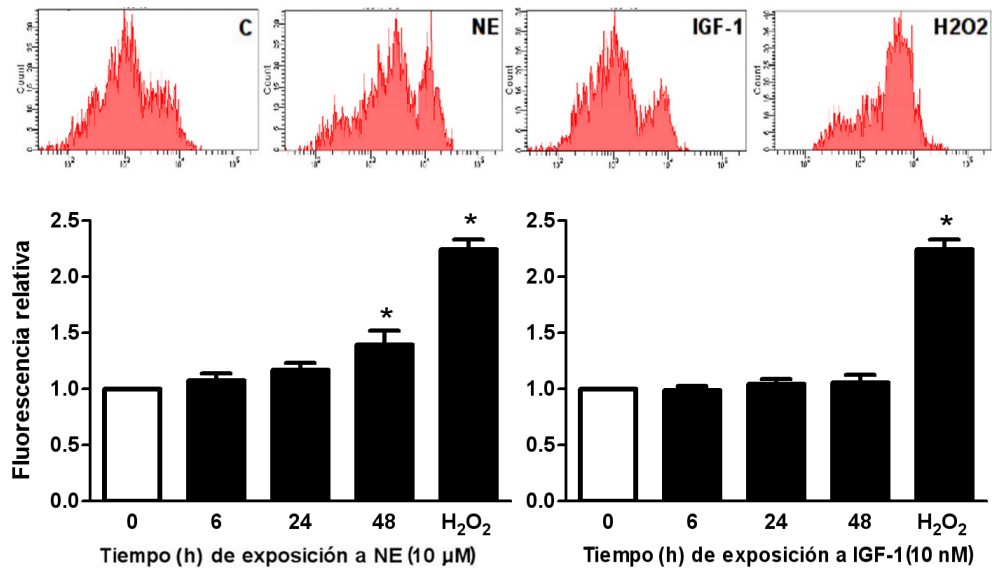


Figura 9: **Generación de ROS en cardiomiocitos tratados con los estímulos prohipertroficós**

Cardiomiocitos de ratas neonatas se estimularon con NE (10 μM) o IGF-1 (10 nM) por 0, 6, 24 y 48 h, luego se incubaron con la sonda fluorescente DHR (25 μM) por 30 minutos para determinar la producción de ROS mediante citometría de flujo. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 100 μM; Los valores corresponden al promedio ± SEM (n=5 experimentos independientes). *p<0,05 vs tiempo 0.

Los resultados muestran que a las 48 h de tratamiento con NE, se produjo disminución de los distintos parámetros metabólicos estudiados, además, a ese mismo tiempo aumentó la generación de ROS. Todo esto indica que NE generó una disminución en la función de la mitocondria, lo que se correlaciona con un incremento en la fragmentación de este organelo, mientras que IGF-1 no cambió los parámetros metabólicos ni morfológicos.

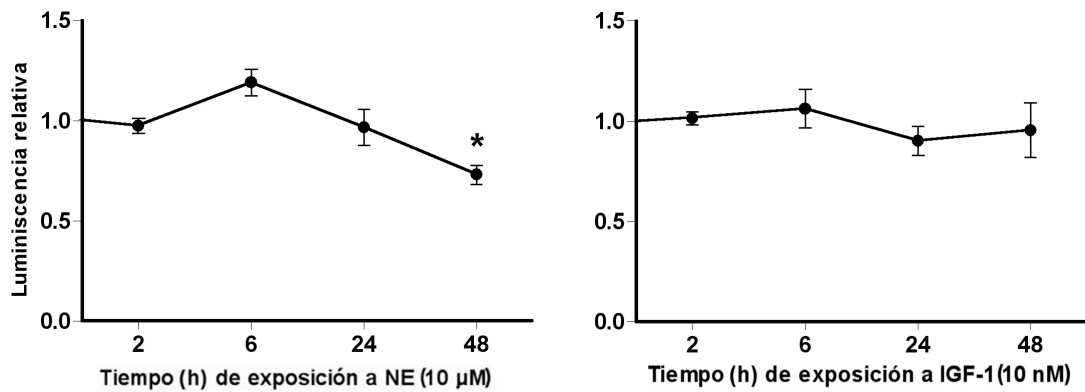


Figura 10: **Efecto de los estímulos prohipertróficos sobre el contenido de ATPi**

Luego del tratamiento con NE e IGF-1 a los tiempos y concentraciones indicadas, se determinaron los niveles de ATPi utilizando ensayo de luciferina/luciferasa (Cell-Titer Glo Kit, Promega). Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=7 experimentos independientes). *p<0,05 vs tiempo 0.

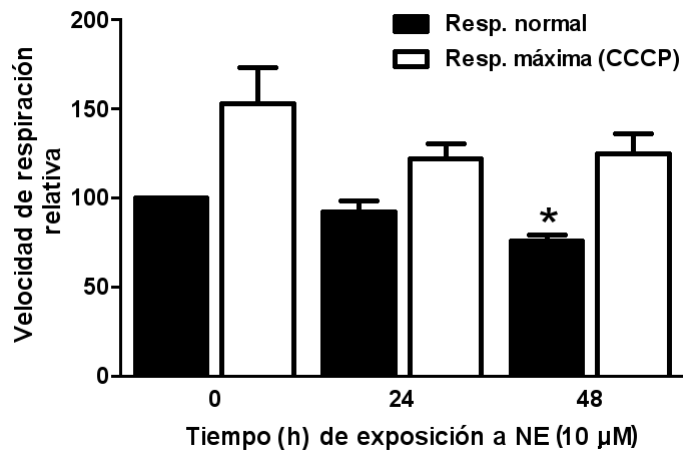


Figura 11: **Consumo de oxígeno en cardiomiocitos estimulados con NE**

Las células se trataron con NE (10 μM) a los tiempos indicados, luego se vertieron en una cámara (volumen final de 600 μL) acoplada a un sistema de electrodo de Clark para registrar la velocidad de consumo de oxígeno. Una vez que las células habían consumido aproximadamente el 75% del oxígeno de la cámara, se les agregó CCCP a una concentración final de 2 nM, para evaluar la velocidad de respiración desacoplada, la cual corresponde al inverso de la denominada tasa de control respiratorio y da cuenta de la capacidad total de la cadena transportadora de electrones en relación a la respiración basal parcialmente acoplada. Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=5 experimentos independientes). *p<0,05 vs tiempo 0.

8.2. Objetivo 2: Determinar expresión y niveles de proteínas de fusión/fisión mitocondrial en ambos modelos de hipertrofia y posibles mecanismos transduccionales implicados

El metabolismo mitocondrial desempeña un rol central en la mantención de la función cardíaca, en directa relación con esto, se ha observado que los procesos de fusión y fisión mitocondrial participan en la regulación de la actividad bioenergética de este organelo produciéndose una disminución de esta bioactividad en el proceso hipertrófico patológico. Tomando en cuenta estos antecedentes es interesante estudiar posibles cambios, en la hipertrofia del cardiomiocito, de los niveles y distribución de las distintas proteínas que gobiernan el proceso de dinámica mitocondrial, donde solo se conoce la disminución de los niveles del mRNA de Mfn2 en modelos asociados a la respuesta patológica, así como también determinar qué tipos de vías transduccionales se encuentran implicadas.

8.2.1. Efecto de los estímulos prohipertróficos sobre los niveles de las proteínas asociadas a dinámica mitocondrial

Para resolver este segundo objetivo, se obtuvieron extractos proteicos totales de cardiomiocitos tratados por 48 h con ambos estímulos prohipertróficos y mediante Western blot, se determinaron los niveles de las principales proteínas asociadas a los procesos de dinámica mitocondrial (**Figura 12**). No se encontraron cambios en los niveles proteicos de OPA1, Mfn2, Drp-1 y Fis-1, al contrario de lo que se esperaba debido a la fisión mitocondrial producida por NE y a la disminución del mRNA de Mfn2 descrita en diversos modelos de hipertrofia por Fang y cols. [171]. Sin embargo, se ha demostrado que durante eventos que producen disipación del potencial de membrana mitocondrial, la proteína OPA1 sufre la acción de la proteasa OMA1, generándose una rápida conversión de las formas largas de OPA1 a las formas cortas, provocando finalmente fragmentación mitocondrial [140, 141]. Debido a que NE provocó disminución del potencial de membrana mitocondrial a las 48 h (**Figura 8**), se investigó si se producía disminución de las formas largas de la proteína OPA1 a las 24 y 48 h de exposición a NE. Para este fin se utilizó un anticuerpo policlonal, que detecta gran parte de las isoformas de OPA1, siendo

necesario el uso de un gel de poliacrilamida al 12 % para obtener la resolución adecuada. Nuevamente los resultados fueron negativos (**figura 13**), ya que el tratamiento con NE no produce alteraciones entre las formas largas y cortas de la proteína.

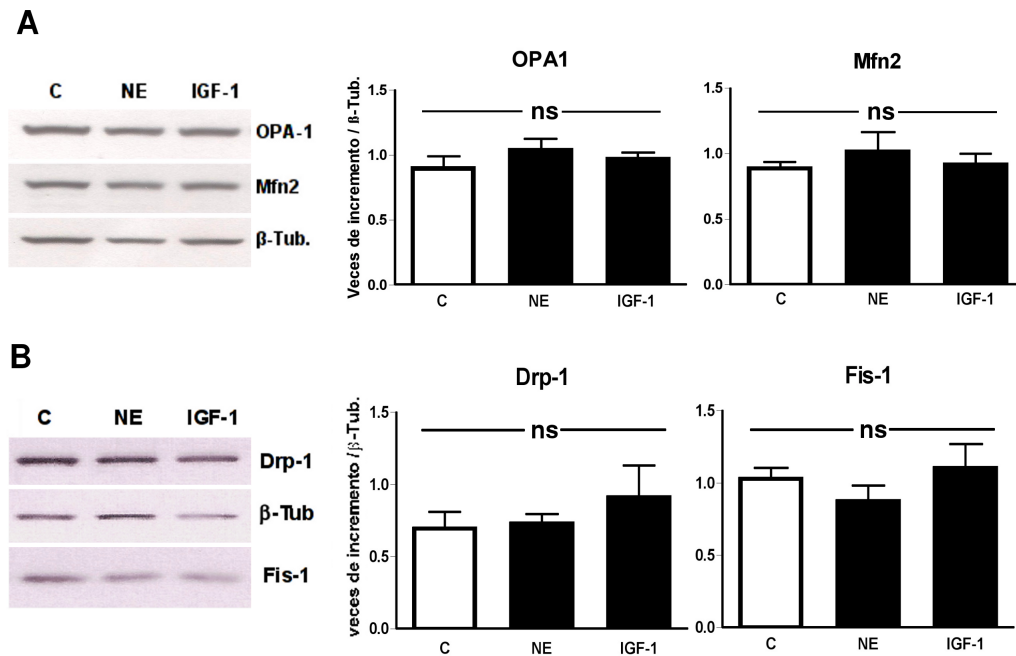


Figura 12: Niveles de las proteínas moduladoras de la dinámica mitocondrial

Cultivos primarios de cardiomiocitos se estimularon por 48 h con NE (10 μ M) o IGF-1 10 (nM), luego se obtuvieron los extractos proteicos totales y se determinó, mediante Western blot, los niveles de las proteínas relacionadas a los procesos de A) fusión mitocondrial (OPA-1 y Mfn2; n=4) y B) fisión mitocondrial (Drp-1 y Fis-1; n=6). A la izquierda se muestra un Western blot representativo para cada proteína y a la derecha el respectivo análisis densitométrico. Como control de carga se utilizó la proteína β -Tubulina; ns=no significativo.

Un evento importante para el proceso de fisión, más que el incremento en la masa de las proteínas involucradas, es la migración de Drp-1 desde el citosol a la membrana mitocondrial, donde diversos investigadores han descrito que interactúa con Fis-1 [117, 178]. Por lo tanto para determinar cambios en la distribución de ésta proteína, cultivos primarios de cardiomiocitos se estimularon a distintos tiempos con NE y luego se fijaron y permeabilizaron para hacer estudios de inmunofluorescencia indirecta para las proteínas Drp-1 y Fis-1 (**Figura 14A**), observándose un incremento en la colocalización

de estas proteínas (**Figura 14B**), determinado mediante el cálculo del coeficiente de Manders y mediante el índice de correlación de Pearson's. Ambos parámetros se calcularon utilizando el programa ImageJ.

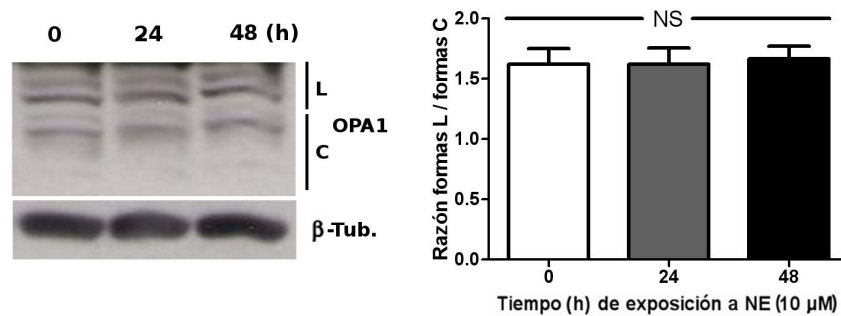


Figura 13: Determinación de formas largas y cortas de la proteína OPA1

Se obtuvieron extractos totales de cardiomiocitos tratados con NE 10 μ M por 0, 24 y 48 h, luego se realizó un Western blot en geles de poliacrilamida al 12% por 6 h para separar las formas largas y cortas de la proteína OPA1, las cuales se identificaron mediante el uso de un anticuerpo policlonal, que detecta la mayoría de las isoformas de la proteína. L = formas largas, C = formas cortas, NS = no significativo, n = 3.

También se realizó fraccionamiento subcelular y se obtuvieron extractos enriquecidos en mitocondrias y en citosol, en los cuales se determinaron los niveles de Drp-1 mediante Western blot. La **Figura 14C** muestra un incremento de la proteína Drp-1 en la fracción mitocondrial de cardiomiocitos tratados con NE (10 μ M) por 24 y 48 h. Por lo tanto, los resultados sugieren que el tratamiento con NE estimula la fragmentación de la red mitocondrial mediante un incremento en la translocación de Drp-1 a la membrana mitocondrial.

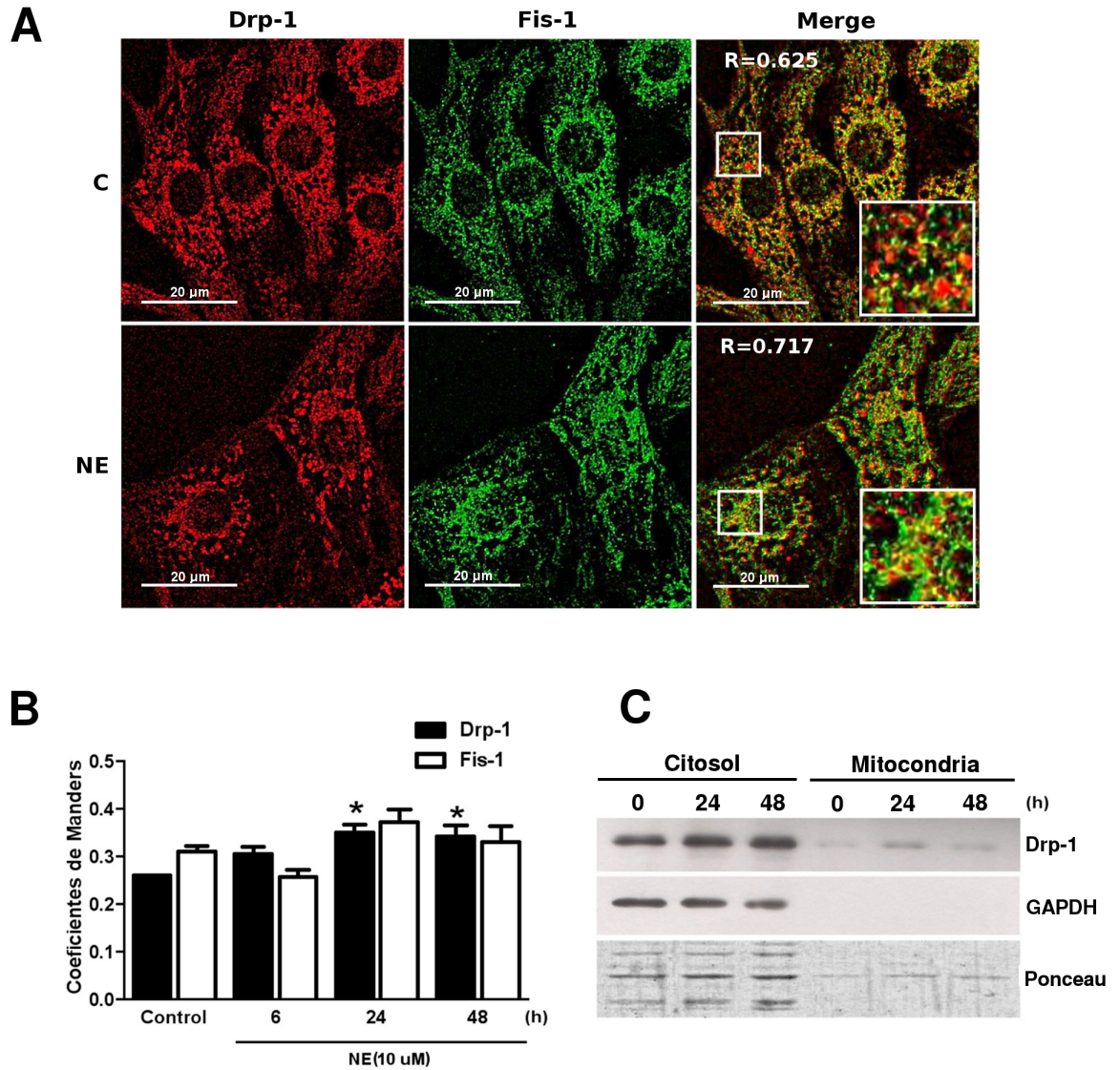


Figura 14: **Distribución subcelular de Drp-1 en cardiomiocitos tratados con NE**

A) Imagen representativa de una inmunofluorescencia adquirida mediante microscopía confocal, para las proteínas Fis-1 (verde) y Drp-1 (rojo) en cardiomiocitos estimulados con NE ($10\mu\text{M}$) por 48 h. En el recuadro de la derecha, se observa un detalle de la microscopía para una región perinuclear (magnificación 3x). R = Coeficiente de Pearson's. B) Cuantificación del coeficiente de Manders para las imágenes de inmunofluorescencia indirecta, en células tratadas por 0, 6, 24 y 48 h con NE ($10\mu\text{M}$), * $p < 0,05$ Drp-1 vs Fis-1; $n = 4$. C) Western blot para determinar los niveles de la proteína Drp-1 en fracciones citosólicas y mitocondriales de cardiomiocitos estimulados con NE ($10\mu\text{M}$) por 0, 24 y 48 h. La proteína gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como marcador citosólico y la tinción con Ponceau se usó como control de carga, $n = 1$.

8.2.2. Participación de la fosfatasa calcineurina en la fragmentación de la red mitocondrial mediada por NE

Una de las vías transduccionales de mayor relevancia en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica es la vía $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{Calcineurina}/\text{NFAT3}$, que entre otros factores, es activada por estimulación adrenérgica [50]. Los ratones transgénicos que expresan una forma activada de calcineurina en corazón desarrollan rápidamente el fenotipo hipertrófico, observándose que al inhibir farmacológicamente la actividad de calcineurina, se impide el desarrollo de hipertrofia *in vivo* e *in vitro* [43]. Se ha descubierto que calcineurina desfosforila a Drp-1 en el residuo Ser637, produciendo un incremento en su migración hacia la membrana mitocondrial, y por lo tanto, fisión de las mitocondrias [154]. Estos antecedentes indican que la activación de calcineurina, provocada por el estímulo adrenérgico, podría estar involucrada en la fragmentación de la red mitocondrial. Para evaluar ésta posibilidad, en primer lugar se determinó la participación del $\text{RA}\alpha$ mediante microscopía confocal de cardiomiocitos incubados con MTG y tratados con el estímulo hipertrófico y/o expuestos al antagonista α adrenergico prazocín. En la **Figura 15** se observa que al bloquear la señalización mediada por el $\text{RA}\alpha$, el estímulo prohipertrófico NE no produce cambios en la morfología de la red mitocondrial del cardiomiocito.

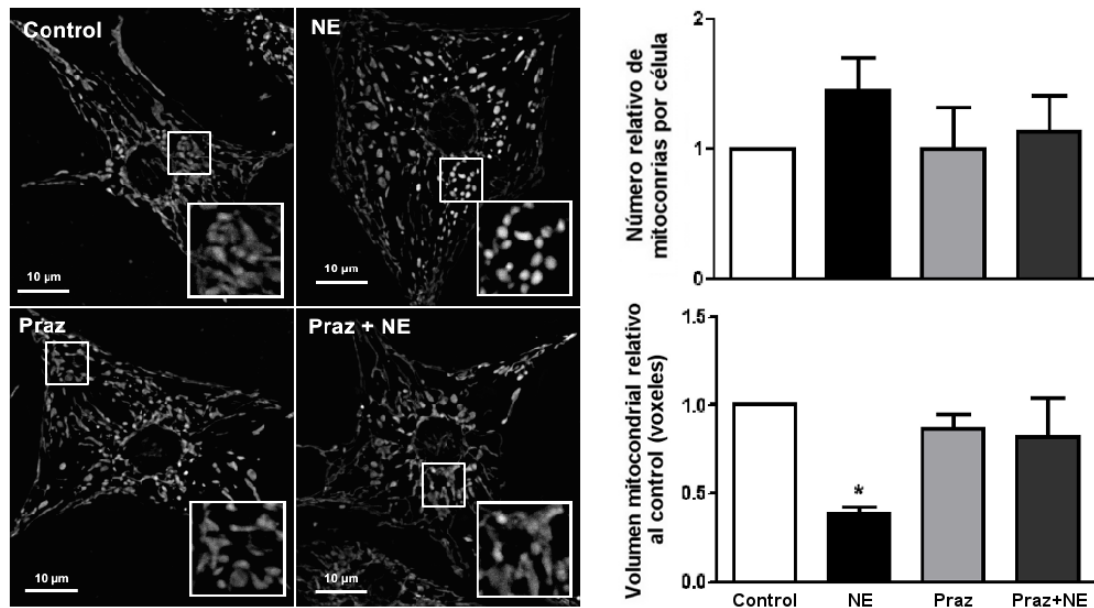


Figura 15: **Participación del receptor adrenérgico tipo α en la fisión mitocondrial del cardiomiocito mediada por NE**

Cardiomiocitos de ratas neonatas fueron incubados con el antagonista α adrenérgico prazosín (1 μ M) y posteriormente fueron tratados por 48 h con NE (10 μ M). La red mitocondrial fue visualizada mediante tinción con MTG y microscopía confocal. En el panel izquierdo, se observan imágenes representativas de la microscopía confocal para las distintas condiciones, el recuadro ubicado en la esquina inferior derecha de cada imagen corresponde a un detalle de la estructura mitocondrial (magnificación 2,5x). El número relativo de mitocondrias por célula y el volumen mitocondrial relativo al control (gráficos del panel derecho), fueron determinados usando el complemento "object counter 3d" del programa ImageJ. * $p < 0,05$ respecto al control.

En segundo lugar, se determinó la activación de calcineurina en cardiomiocitos estimulados con NE, a través de Western blot para la proteína RCAN 1.4, que incrementa su expresión de manera dependiente a la activación de la vía calcineurina/NFAT3 [184]. La **Figura 16A** muestra un Western blot para RCAN 1.4 en extractos totales de cardiomiocitos estimulados con NE entre 0 y 48h, observándose un incremento en los niveles de RCAN 1.4 a contar de las 24 h de tratamiento. También se investigó el grado de fosforilación de Drp-1 en Ser637, mediante Western blot y el uso de un anticuerpo específico de reciente aparición comercial. Como se muestra en la **Figura 16B**, se encontró una disminución significativa en la fosforilación de esta proteína a las 48 h de exposición a NE, sin embargo para las 24 h de tratamiento, no se encontraron

diferencias significativas, aunque se aprecia una tendencia a disminuir el grado de fosforilación de Drp-1. Esto se contrapone a los resultados esperados, donde la activación de calcineurina debiera haber provocado una desfosforilación de Drp-1 desde las 24 h de tratamiento con NE, lo que daría cuenta del incremento en su migración a membrana mitocondrial. Es probable que la falta de resultados estadísticamente diferentes pueda ser consecuencia de los bajos niveles basales de fosforilación que exhibe la proteína, haciendo difícil observar cambios asociados a una mayor reducción de dicha fosforilación.

Para confirmar si calcineurina participa en la fragmentación mitocondrial gatillada por NE, cultivos de cardiomiocitos se transdujeron con un adenovirus que expresa un péptido símil a la subunidad reguladora de calcineurina (adenovirus CAIN), que inhibe la actividad de la enzima, y con un adenovirus que expresa la subunidad catalítica de calcineurina, cuyo dominio autoinhibitorio ha sido eliminado, por lo que es una forma constitutivamente activa de la enzima (AdCN).

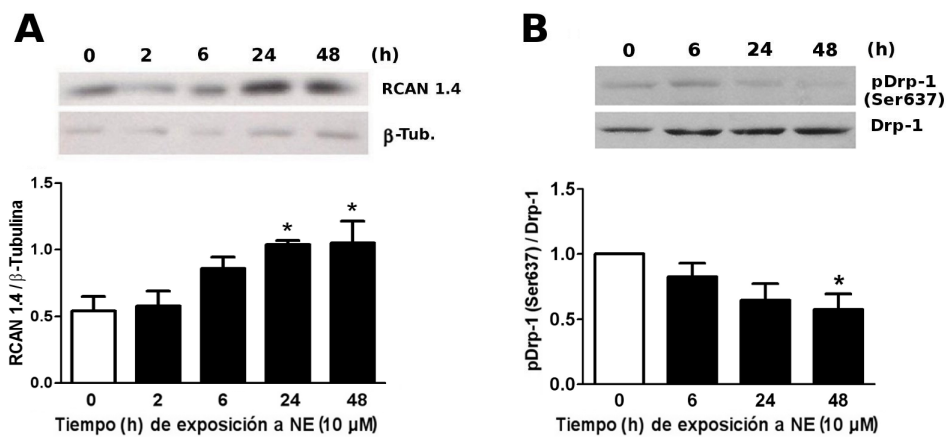


Figura 16: **Efecto de NE sobre los niveles de RCAN 1.4 y desfosforilación de Drp-1**

Las células se estimularon con NE ($10 \mu\text{M}$) entre 0 y 48 h, luego se obtuvieron los extractos proteicos totales y mediante Western blot se determinaron los A) niveles de la proteína RCAN 1.4, como marcador de la actividad de la fosfatasa calcineurina y B) grado de fosforilación de Drp-1 en el residuo de serina 637, que es desfosforilado por calcineurina. * $p < 0,05$ vs tiempo 0; $n=3$.

Como se muestra en las imágenes de microscopia confocal de la **Figura 17**, no se aprecian diferencias en el aspecto de la red mitocondrial con respecto a la situación control en las células que han sido tratadas con NE y transducidas con el adenovirus CAIN, a diferencia de los cardiomiocitos que han sido transducidos con AdCN, donde se observa una red mitocondrial ampliamente fragmentada, presentando además un incremento en el tamaño celular, característica típica del proceso hipertrófico. Además, la cuantificación de los parámetros asociados a morfología mitocondrial, reveló que la transducción con AdCN incrementó el porcentaje de células con fragmentación de la red mitocondrial ($77 \pm 3\%$ vs $22 \pm 4\%$), aumentó en el número de mitocondrias por célula (234 ± 29 vs $103,8 \pm 17$) y disminuyó del volumen mitocondrial respecto al control ($470,1 \pm 30$ vs 1495 ± 226 ; AdCN vs control; promedios \pm SEM), mientras que las células estimuladas con NE y transducidas con el adenovirus CAIN, no presentaron cambios significativos en la morfología mitocondrial.

Los resultados obtenidos en este segundo objetivo, indican que el mecanismo mediante el cual se produce fragmentación mitocondrial en los cardiomiocitos estimulados con NE, es a través de la migración de la proteína Drp-1 a mitocondria, donde la activación de la fosfatasa calcineurina, desempeña un importante rol.

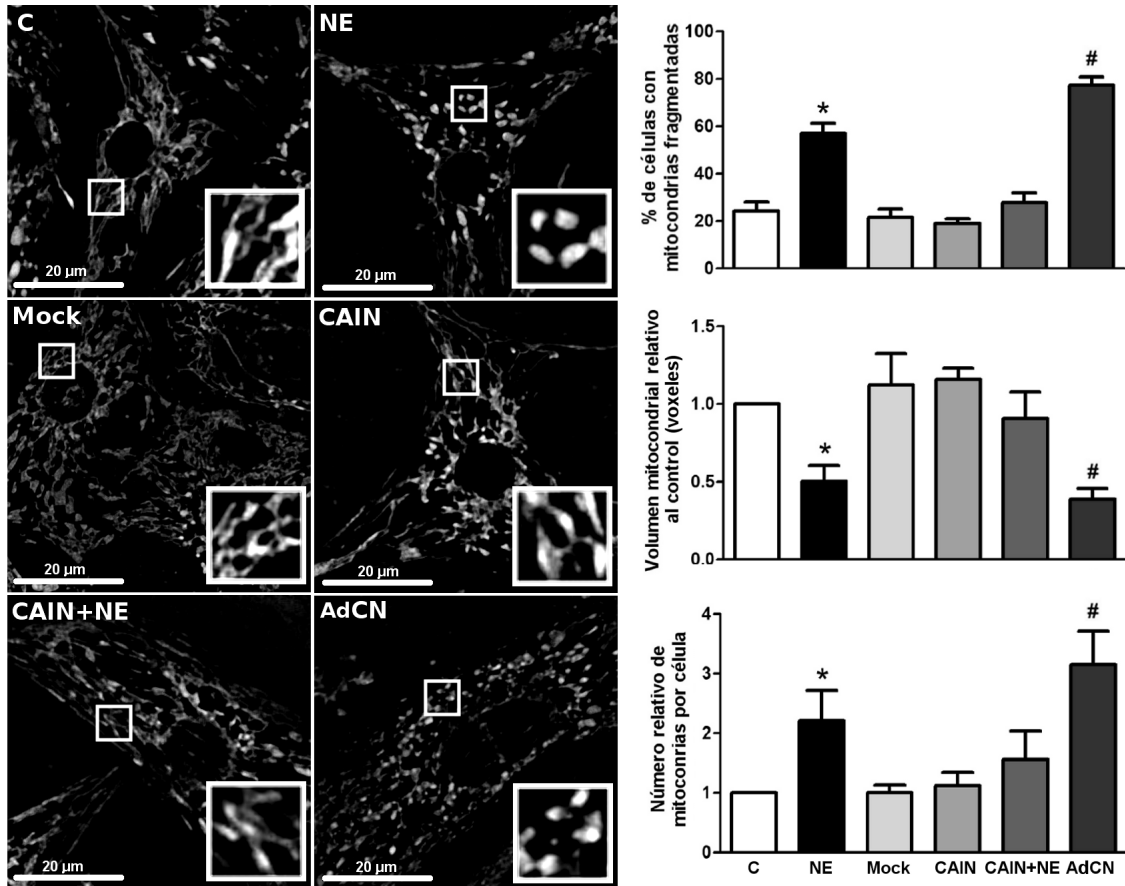


Figura 17: **Efecto de los adenovirus CAIN y CN sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito**

Cardiomiocitos de ratas neonatas se transducieron con un adenovirus que expresa un péptido inhibitorio para calcineurina (CAIN; MOI: 2000), con un adenovirus que expresa una forma constitutivamente activa de calcineurina (AdCN; MOI: 1000), o con adenovirus control (Mock; MOI: 2000). Luego de 24 h, los cardiomiocitos transducidos con el adenovirus CAIN se estimularon con NE (10 μ M) por 48 h y se visualizó la red mitocondrial de ambos grupos mediante tinción con MTG y microscopía confocal. A la izquierda de la figura se muestran imágenes representativas de la red mitocondrial para cada condición, los recuadros de la esquina inferior derecha muestran un detalle de la microscopía (magnificación 3x), mientras que a la izquierda se observa la cuantificación de los parámetros asociados a morfología mitocondrial. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs Mock; C: Control sin transducción; n=3.

8.3. Objetivo 3: Evaluar la participación de proteínas de fusión/fisión mitocondrial en el crecimiento hipertrófico de cardiomiocitos inducido por IGF-1 y norepinefrina

Como se ha mencionado, la actividad mitocondrial es un factor clave para la función cardíaca, observándose que alteraciones asociadas a una disminución en el aporte energético del corazón, se relacionan directamente al desarrollo de diversas patologías cardíacas, donde el fenotipo hipertrófico se presenta como un factor común debido a que su manifestación es el punto de partida del remodelado cardíaco. Por otro lado, al inhibir la actividad de las proteínas participantes en la dinámica mitocondrial, se producen cambios en el metabolismo oxidativo de la mitocondria. Junto con esto, los cambios morfológicos encontrados en éste organelo durante la inducción del proceso hipertrófico por NE, podrían ser indicio de que estas proteínas podrían estar participando en el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

El desarrollo de hipertrofia conlleva una serie de eventos como aumento en la sarcomerización, re-expresión del programa genético fetal y aumento en el volumen y área celular [54], muchos de los cuales se utilizan como criterios para identificar la manifestación del proceso, por lo tanto, para evaluar la participación de la proteína de fusión Mfn2 y de la proteína de fisión mitocondrial Drp-1 en el desarrollo del fenotipo hipertrófico, cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas se transdujeron con un adenovirus que expresa un RNA antisentido para Mfn2 (AsMfn2) o con un adenovirus que expresa una proteína Drp-1 mutante (K38A) que actúa como dominante negativo, y se evaluaron distintos parámetros marcadores de hipertrofia.

8.3.1. Participación de la proteína Mfn2 en el desarrollo de hipertrofia cardíaca

La **Figura 18A** muestra que la transducción con el adenovirus AsMfn2 produce fragmentación de la red mitocondrial del cardiomiocito, con una disminución en el volumen mitocondrial promedio, mientras que en la **Figura 18B** se observa que el adenovirus efectivamente produce una disminución en los niveles de la proteína Mfn2.

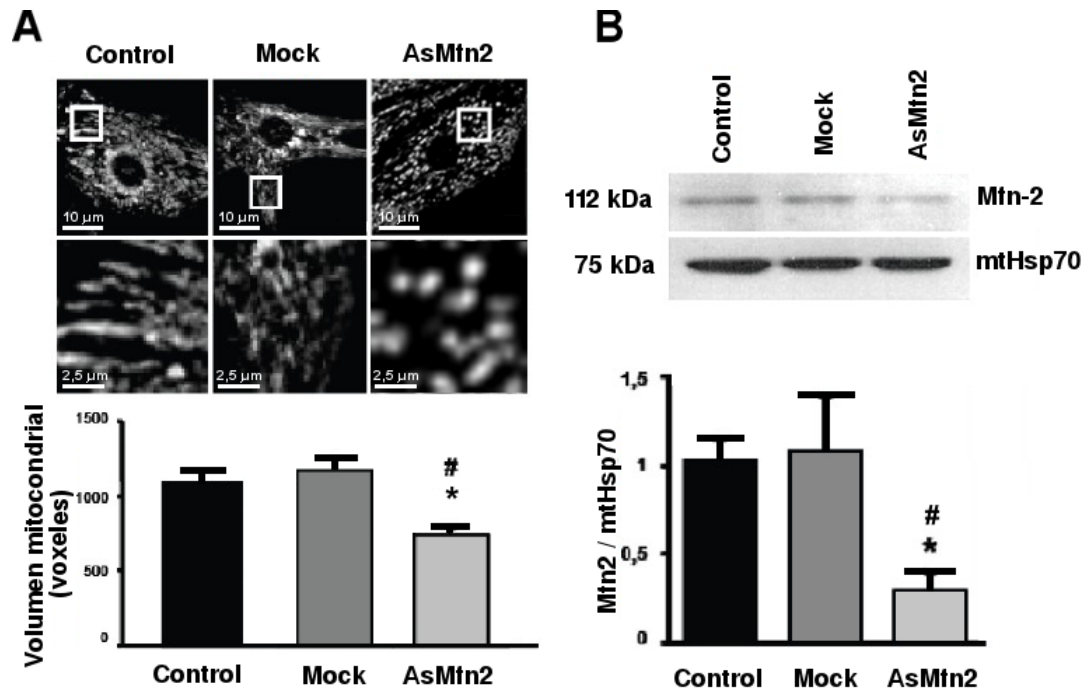


Figura 18: **Efecto del adenovirus AsMfn2 sobre la morfología de la red mitocondrial y los niveles de la proteína Mfn2 en el cardiomiocito.**

Cardiomiocitos de ratas neonatas se transdujeron con un adenovirus antisentido para la proteína Mfn2 (AsMfn2, MOI 1000) o con adenovirus control (Mock, MOI 1000). A) La imagen superior corresponde a una microscopía confocal de células marcadas con mitotracker green (400 nM) para identificar la red mitocondrial, en las imágenes inferiores se muestra una ampliación de la sección demarcada por el recuadro blanco para cada condición. El gráfico inferior corresponde a la cuantificación del volumen mitocondrial promedio por célula (n=3). B) Western blot para la proteína Mfn2 y más abajo su respectivo análisis densitométrico (n = 3). # p<0,05 respecto al control y * p<0,05 respecto a Mock.

Efecto del adenovirus AsMfn2 sobre el área y la sarcomerización del cardiomiocito

En otro experimento, los cardiomiocitos se incubaron con los estímulos prohipertróficos NE (10 μM) o IGF-1 (10 nM) por 48 h y/o se transdujeron con el adenovirus AsMfn2 (**Figura 19**). La exposición a los estímulos prohipertróficos produjo incremento de la estructuración sarcomérica, visualizada mediante tinción con faloidina-rodamina y microscopía de epifluorescencia, además, el mismo efecto se observó cuando se disminuyen los niveles de Mfn2, pero en menor grado que el observado para NE e IGF-1. Esto se corroboró al graficar la intensidad de la fluorescencia que pasa por una trayectoria lineal, observándose que las células sarcomerizadas, como las expuestas a

NE y a AsMfn2, muestran un patrón ordenado debido a que las unidades sarcoméricas al estructurarse presentan zonas definidas de fluorescencia y oscuridad a intervalos regulares, al contrario de las células no sarcomerizadas (**Figura 19**, esquina inferior derecha).

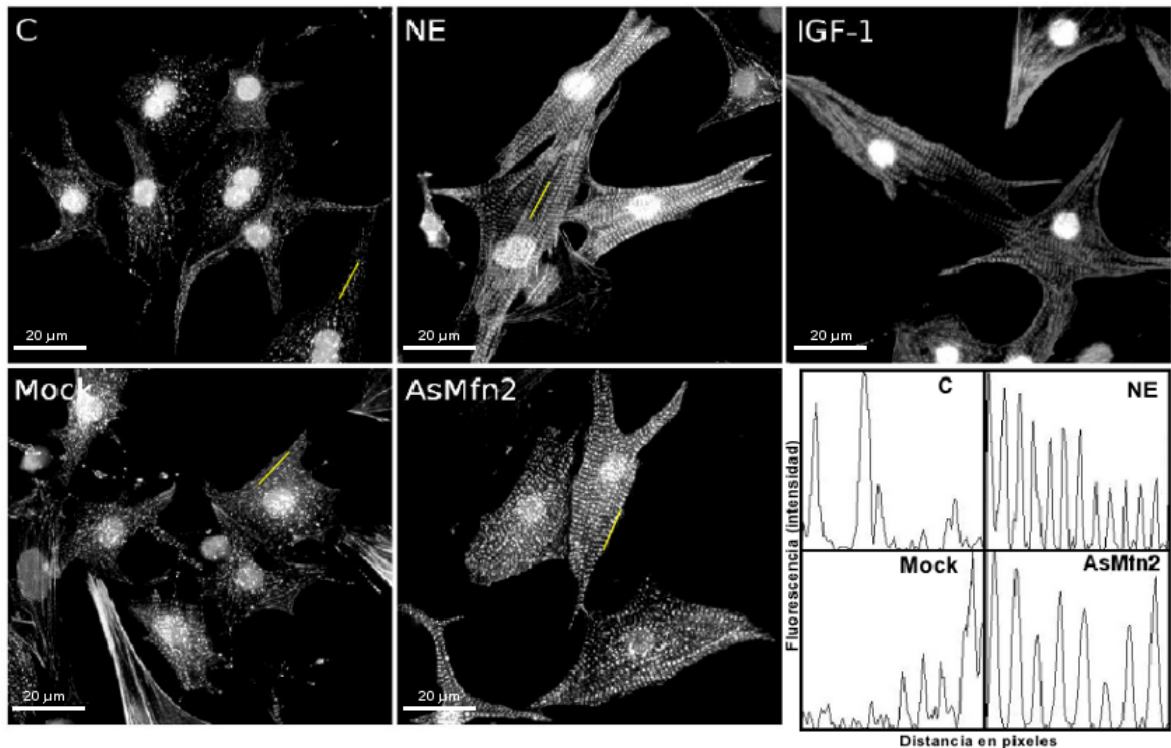


Figura 19: Efecto de NE, IGF-1 y AsMfn2 sobre la sarcomerización del cardiomiocito
 La figura corresponde a una imagen representativa de 4 experimentos en los cuales se muestra la organización sarcomérica mediante tinción con faloidina-rodamina y microscopía de epifluorescencia para cardiomiocitos tratados con los estímulos prohipertróficos NE (10 μ M) o IGF-1 (10 nM) por 48 h, o transducidos con adenovirus antisentido para mitofusina 2 (AsMfn2; MOI 1000). El recuadro de la esquina inferior derecha, corresponde al análisis de la fluorescencia a lo largo de una trayectoria lineal sobre las estructuras sarcoméricas en cada una de las condiciones mostradas (línea amarilla inserta en las imágenes) mediante el uso del software ImageJ, observándose que cardiomiocitos con mayor estructuración sarcomérica muestran una gráfica con patrones de fluorescencia regulares respecto a su intensidad y frecuencia. C: control; Mock: adenovirus control (MOI 1000); los núcleos se marcaron con Hoescht.

El porcentaje de células sarcomerizadas se muestra en la **Figura 20A**, observándose que los cardiomiocitos transducidos con el adenovirus AsMfn2, al igual que aquellos que recibieron los estímulos hipertróficos, presentaron un incremento significativo de este

parámetro ($7 \pm 1\%$ vs $75 \pm 5\%$ y $56 \pm 7\%$ para C, NE e IGF-1, y $12 \pm 2\%$ vs $53 \pm 6\%$ para Mock y AsMfn2 respectivamente; valores promedio \pm SEM). Otra característica del fenotipo hipertrófico es el incremento en el área del cardiomiocito, la **Figura 20B** muestra los resultados para la medición de este parámetro, donde se aprecia que al disminuir los niveles de Mfn2, se produce un aumento significativo del área celular, similar al obtenido con los estímulos NE e IGF-1 ($55 \pm 6\%$; $48 \pm 6\%$ y $44 \pm 8\%$ por sobre el control para NE; IGF-1 y AsMfn2 respectivamente). Para ambos parámetros no se apreciaron diferencias al comparar cardiomiocitos tratados solamente con los estímulos prohipertróficos y aquellos que además fueron transducidos con AsMfn2, lo que indica la ausencia de un efecto sinérgico entre la disminución de los niveles de Mfn2 y los factores prohipertróficos.

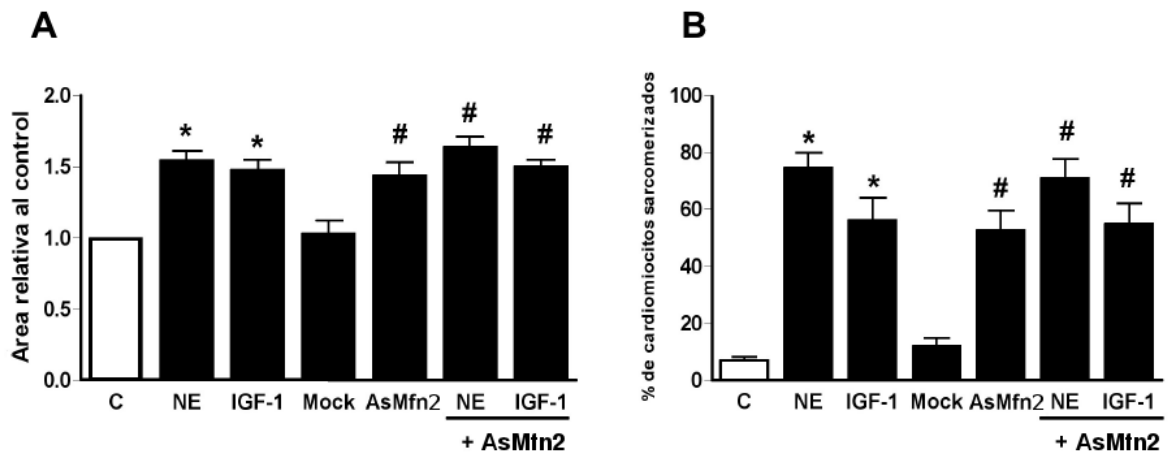


Figura 20: Área celular y sarcomerización en cardiomiocitos tratados con los estímulos prohipertróficos y/o transducidos con AsMfn2

Efecto de NE, IGF-1 y disminución de los niveles de Mfn2 en A) área celular y B) porcentaje de cardiomiocitos sarcomerizados. Los estímulos prohipertróficos IGF (10 nM) y NE (10 μ M), fueron utilizados por 48h; Mock y AsMfn2 MOI = 1000, * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs Mock; se contaron aproximadamente 100 células por estímulo en cada experimento; $n=4$.

Reexpresión del programa genético fetal en cardiomiocitos transducidos con adenovirus AsMfn2 La **Figura 21A** muestra un Western blot representativo y abajo su respectivo análisis densitométrico, donde se aprecia que en los cardiomiocitos transducidos con el adenovirus AsMfn se incrementaron los niveles de β MHC, al igual

que aquellos estimulados con norepinefrina. Para determinar cambios en la expresión de los genes ANF y SKA, las células se transfectaron con plámidas reporteras que contenían el sitio promotor para éstos genes acoplado a luciferasa (**Figura 21B**). No se observaron cambios significativos en la expresión del reportero ANF-LUX en cardiomiocitos transducidos con adenovirus AsMfn2 o estimulados con IGF-1, por otro lado, el tratamiento con NE aumentó la expresión de éste péptido. Respecto a la expresión del reportero SKA-LUX, se observa que ambos estímulos prohipertróficos incrementaron significativamente la actividad del gen reportero al igual que el tratamiento con el adenovirus antisentido para Mfn2.

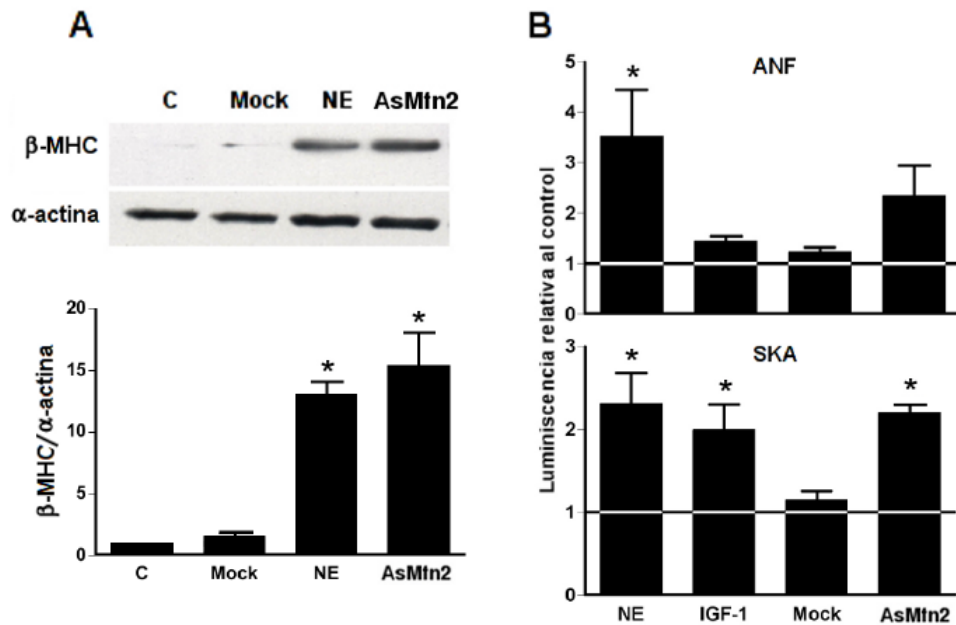


Figura 21: Efecto del adenovirus AsMfn2 sobre la reexpresión del programa genético fetal en cardiomiocitos

Cardiomiocitos de ratas se cultivaron en presencia de los estímulos hipertróficos y/o transducidos con adenovirus AsMfn (MOI 1000), ambos por 48 h. A) Determinación de los niveles de β -MHC mediante Western Blot en extractos totales (n=3) y su respectivo gráfico de densitometría; B) Expresión de las proteínas asociadas al programa genético-fetal ANF y SKA. Cultivos de cardiomiocitos fueron transfectados con genes reporteros LUX para ANF (n=3) y SKA (n=4) y luego de 24 h fueron sometidos a los tratamientos indicados en el gráfico por 48 h. La línea horizontal en los gráficos corresponde al valor relativo del control. * p<0,05; NE e IGF vs C y AsMfn vs Mock.

8.3.2. Participación de la proteína Drp-1 en el desarrollo de hipertrofia cardíaca

En la **Figura 22A** se muestra que el adenovirus K38A produce fusión de la red mitocondrial, que se demuestra en el gráfico mediante un aumento en el volumen mitocondrial promedio, y en la **Figura 22B**, mediante Western blot se muestra que la transducción con el adenovirus K38A produce incremento en los niveles de la proteína mutante.

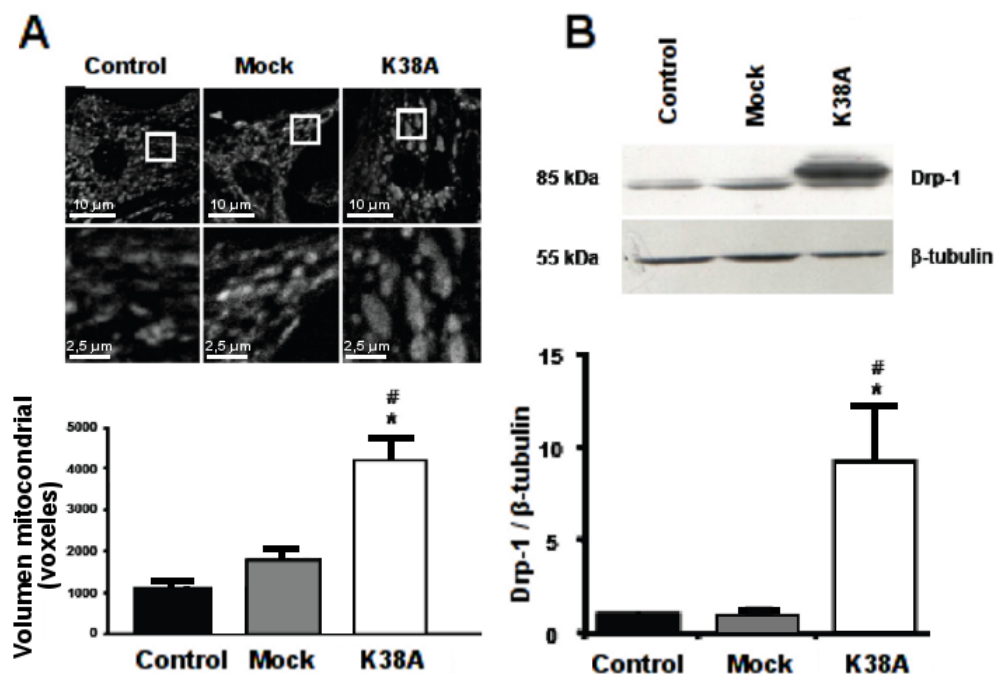


Figura 22: **Efecto del adenovirus K38A sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito**
A) Microscopía confocal de cardiomiocitos tratados con mitotracker green, en las imágenes inferiores se muestra una ampliación de la sección demarcada por el recuadro blanco para cada condición y más abajo se observa el gráfico de volumen mitocondrial. B) Western blot para Drp-1 y su respectivo análisis densitométrico. # $p < 0,05$ vs Mock; * $p < 0,05$ vs C.

Efecto del adenovirus K38A sobre el área y la sarcomerización del cardiomiocito

La **Figura 23** muestra una imagen representativa de la estructura sarcomérica para cardiomiocitos expuestos a los distintos estímulos hipertróficos y transducidos con el adenovirus K38A. En los cardiomiocitos sometidos solamente a los estímulos hipertróficos, se aprecia en forma clara un incremento en la sarcomerización, mientras

que en las células transducidas con el adenovirus K38A y luego estimuladas con NE o IGF-1, no se observan diferencias importantes respecto al control. La **Figura 24A** presenta el porcentaje de cardiomiocitos que presentan sarcomerización, donde el grupo de células que expresa la proteína K38A presenta un menor porcentaje al ser estimuladas con NE o IGF-1. Un resultado similar ocurre en la cuantificación del área celular, observándose que los cardiomiocitos transducidos con K38A muestran un menor incremento en esta magnitud frente a los estímulos (**Figura 24B**).

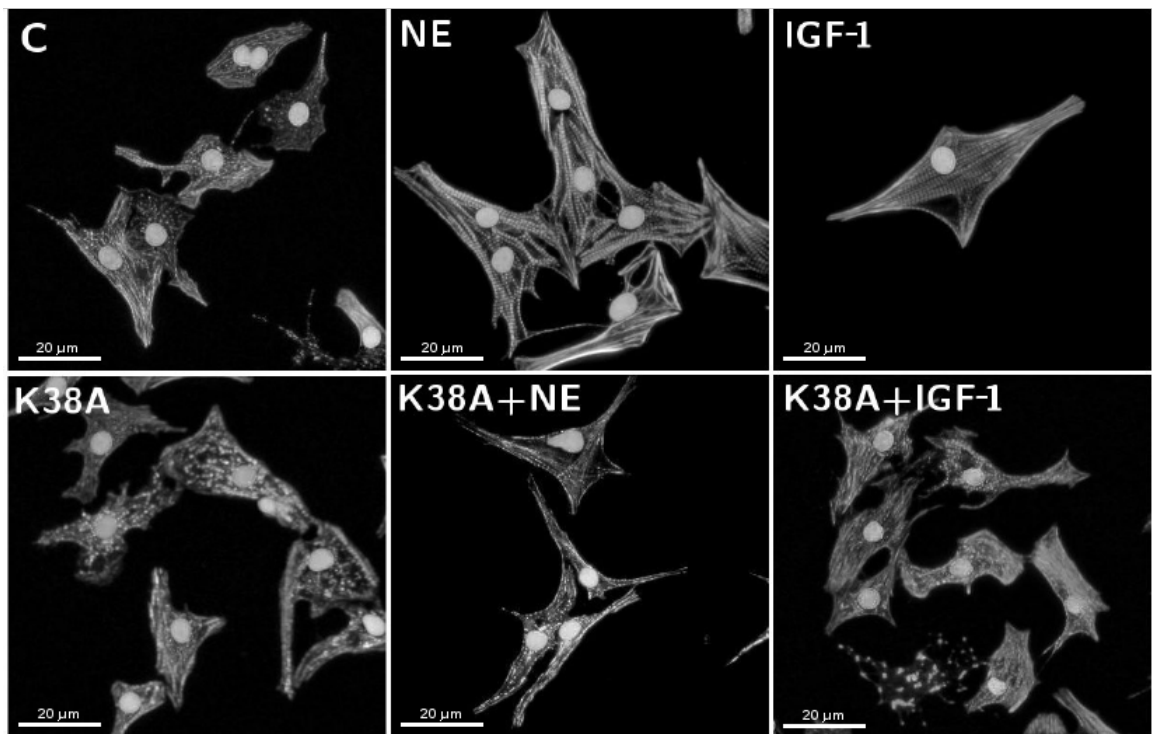


Figura 23: **Efecto de NE, IGF-1 y el adenovirus K38A sobre la sarcomerización del cardiomiocito**

Cardiomiocitos de ratas neonatas se estimularon por 48 h con NE (10 μM), IGF-1 (10 nM) y/o transducidos con un adenovirus que expresa un dominante negativo para la proteína de fisión Drp-1 (K38A). Posteriormente las células se fijaron y trataron con faloidina-rodamina para observar la organización sarcomérica. Los núcleos se marcaron con Hoescht.

Reexpresión del programa genético fetal en cardiomiocitos transducidos con adenovirus K38A Para evaluar la reexpresión del programa genético fetal se determinaron los niveles de la proteína β -MHC y la expresión de los péptidos ANF y SKA. Como se puede observar en la **Figura 25A**, los cardiomiocitos que han sido tratados con los estímulos prohipertróficos IGF-1 o NE, y que además han sido transducidos con el adenovirus K38A, presentan una disminución en el incremento de β -MHC y en la actividad de los genes reporteros, al compararlos con las células tratadas solamente con los estímulos. Se debe destacar que estos resultados corresponden a un único experimento, por lo tanto deberán realizarse nuevas experiencias para comprobar estos resultados.

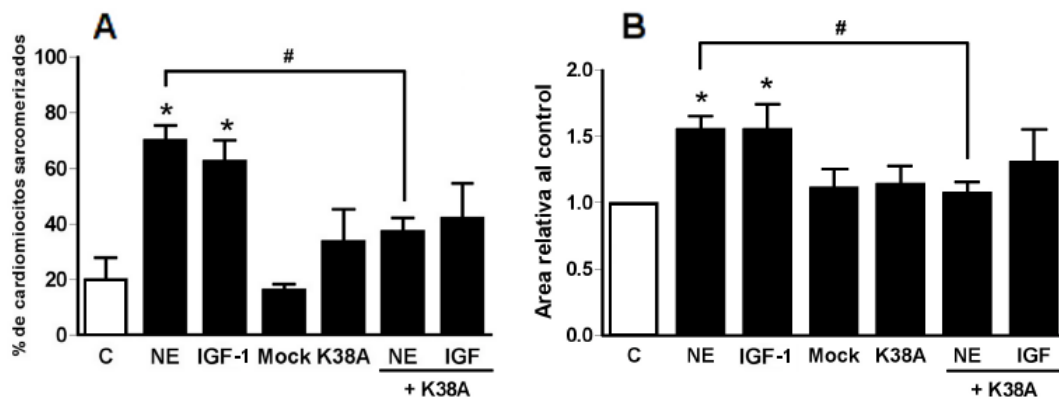


Figura 24: Área celular y sarcomerización en cardiomiocitos tratados con los estímulos prohipertróficos y/o transducidos con el adenovirus K38A

Gráficos de A) porcentaje de células que presentan sarcomerización y B) área celular relativa al control. * $p < 0,05$ NE e IGF-1 vs C; # $p < 0,05$ NE vs NE+K38A, $n = 3$

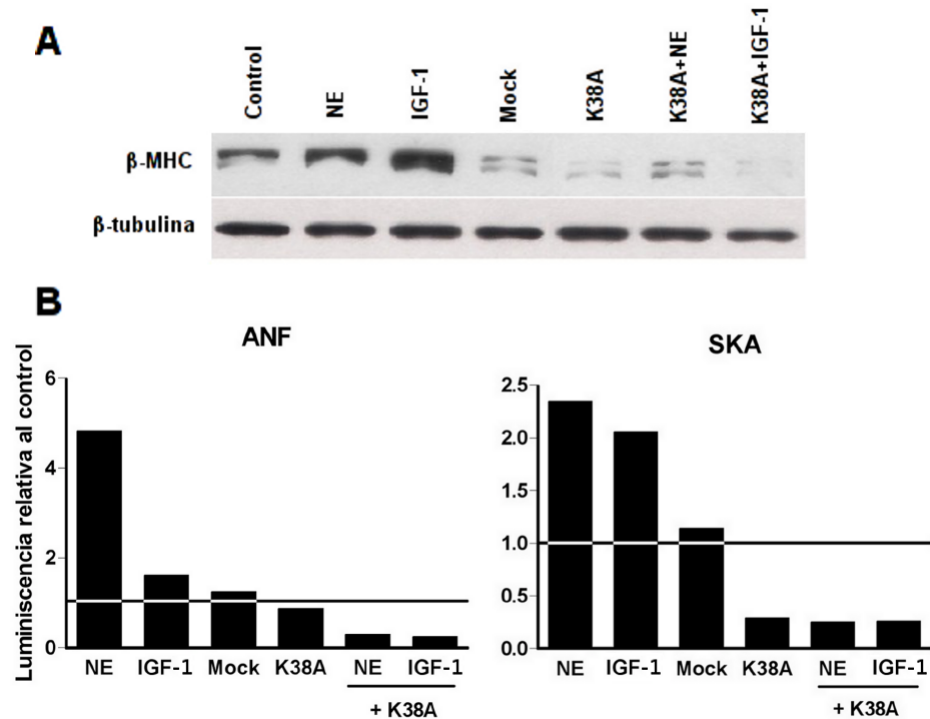


Figura 25: **Efecto del adenovirus K38A sobre la reexpresión del programa genético fetal en cardiomiocitos**

A) Western blot para la proteína β -MHC; B) determinación, mediante el uso de genes reporteros, de la expresión de ANF y SKA. La línea horizontal en los graficos corresponde al valor relativo del control; n=1.

Los resultados de este tercer objetivo, muestran que al fragmentar la red mitocondrial, mediante una disminución de los niveles de Mfn2, se incrementan la mayoría de los parámetros hipertróficos estudiados, mientras que al desplazar el equilibrio hacia el proceso de fusión mitocondrial, por una caída en la actividad de la proteína Drp-1, se produce una disminución en la respuesta hipertrófica generada por ambos estímulos. Por lo tanto, estos resultados indican que el equilibrio de los eventos de fisión y fusión mitocondrial, desempeña un papel crítico en el desarrollo de la respuesta hipertrófica en el cardiomiocito.

9. DISCUSION

Todos los procesos celulares requieren energía y son llevados a cabo a través de vías dependientes de ATP, por esta razón alteraciones en el flujo energético provocan disfunción celular independiente del tipo de tejido afectado. Sin embargo, aquellos órganos que requieren una mayor demanda de ATP para mantener sus actividades biológicas, son más sensibles a cambios en el balance energético y por lo tanto, afectados en forma más prematura y/o intensa. El corazón es uno de estos órganos, debido a que el cardiomiocito requiere de grandes cantidades de energía para realizar procesos celulares altamente especializados y complejos como la función contráctil, el transporte iónico y la homeostasis intracelular de Ca^{2+} [64]. El músculo cardíaco sintetiza diariamente cerca de 30 kg de ATP [185], donde la oxidación de ácidos grasos y glucosa que ocurren en la mitocondria son la principal fuente de generación de ATP en el cardiomiocito sano, dando cuenta del 98 % del aporte energético versus el 2 % restante aportado por la glicólisis en condiciones aeróbicas normales [186]. Estos antecedentes, posicionan a la mitocondria como un organelo clave en la mantención de la función cardíaca.

La relación existente entre el metabolismo y la función del cardiomiocito presenta gran relevancia en cuadros patológicos que conducen al desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardíaca, debido a que estas condiciones se asocian con una caída progresiva de la función mitocondrial, disminuyendo la capacidad de este organelo para generar ATP. Esta reducción produce una desregulación secundaria de procesos críticos para la función del corazón, generándose un ciclo donde se produce un incremento en la demanda energética que no puede ser satisfecha, que a su vez disminuye la actividad cardíaca, agravando el cuadro patológico [64]. Por otro lado, distintas investigaciones han mostrado que fallas puntuales en la mitocondria alteran la función cardíaca, observándose que la reducción en la actividad de componentes del sistema de la fosforilación oxidativa, mutaciones en proteínas relacionadas con el transporte de sustratos mitocondriales (como el transportador de nucleótidos de adenina y proteínas transportadoras de ácidos grasos), o depleción del DNA mitocondrial, estimulan el desarrollo de un fenotipo hipertrófico [73, 74, 187, 188]. En directa relación con esta

evidencia, los cambios en la morfología mitocondrial están estrechamente asociados a la función del organelo, observándose que manipulaciones en la maquinaria proteica que gobierna los procesos de fusión o fisión mitocondrial, producen alteraciones en la homeostasis bioenergética celular [130, 159]. Actualmente existe un reducido número de publicaciones que hacen referencia a la participación de la dinámica mitocondrial en la generación y el desarrollo de patologías cardíacas, a pesar de que, a la luz de todos los antecedentes expuestos anteriormente, la relación entre ambos eventos es altamente probable. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo consistió en determinar si los cambios en la función y morfología mitocondrial se relacionan con el desarrollo de hipertrofia cardíaca fisiológica y/o patológica, así como también investigar la participación de proteínas claves en la regulación de la dinámica mitocondrial y las posibles vías transduccionales implicadas.

9.1. Cambios en la morfología mitocondrial durante el desarrollo de hipertrofia cardíaca

De acuerdo a resultados encontrados por *Schaper et al.* las mitocondrias ocupan aproximadamente el 30 % del volumen cardíaco [189], donde se ubican principalmente en una distribución longitudinal, altamente empaquetadas entre las miofibrillas, usualmente entre las zonas demarcadas por dos bandas Z, sin sobrepasar la longitud sarcomérica. *Vendelin et al.* caracterizaron cuantitativamente la distribución mitocondrial en el músculo cardíaco, utilizando microscopía confocal y cardiomiocitos de rata adulta [190]. De esta forma determinaron la posición mitocondrial relativa en este tipo celular. Los resultados mostraron que en el cardiomiocito adulto, las mitocondrias se distribuyen siguiendo un patrón altamente estructurado, adoptando una conformación denominada de “tipo cristalina” [190]. Frente a esta evidencia, inmediatamente surge como interrogante si en este ambiente de alta estructuración tienen cabida los procesos de fusión y fisión mitocondrial, Al respecto, *Beraud et al.* mediante el uso de sondas fluorescentes y microscopía confocal, investigaron los movimientos e interconectividad eléctrica de las mitocondrias en cardiomiocitos de rata adulta [163]. Ellos encontraron que en condiciones fisiológicas, las mitocondrias cardíacas presentan pequeños movimientos que no superan

el diámetro mitocondrial promedio y se comportan como unidades eléctricamente independientes, descartando la ocurrencia de eventos de dinámica mitocondrial [163]. En este mismo trabajo concluyen que los movimientos mitocondriales de alta frecuencia y baja amplitud se producen por cambios en el estado energético mitocondrial, debido a que se ha mostrado que la mitocondria puede existir en un estado condensado, asociado a una velocidad respiratoria mayor, donde se produce una expansión de los compartimentos formados por las crestas mitocondriales y una contracción del contenido matricial, o en un estado ortodoxo, caracterizado por una matriz mitocondrial expandida y una velocidad de consumo de oxígeno menor [191].

La evidencia hasta ahora discutida indica ausencia de dinámica mitocondrial en el cardiomiocito adulto, sin embargo, diversos estudios han demostrado que en condiciones patológicas, las células cardíacas acumulan poblaciones de mitocondrias anormalmente grandes o pequeñas. Por ejemplo, mediante microscopía electrónica, se observó fragmentación mitocondrial en cardiomiocitos de ratón adulto, sometidos a periodos de isquemia y reperfusión [166], por otro lado, en cardiomiocitos de pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática, fueron encontradas mitocondrias de gran tamaño, que usualmente presentaban crestas mitocondriales con estructuras circulares concéntricas [192]. Esto indica que bajo condiciones de estrés, las mitocondrias no permanecen absolutamente estáticas en el cardiomiocito adulto.

Pocas evidencias existen respecto a la morfología que adoptan las mitocondrias en el crecimiento hipertrófico. Sin embargo como ya se ha mencionado previamente, en modelos patológicos de remodelado cardíaco post isquemia o en la insuficiencia cardíaca se ha encontrado un fenotipo mitocondrial fragmentado [165, 166]. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos durante ésta tesis, donde se observó que NE fragmenta la red mitocondrial de cardiomiocitos de ratas neonatas a partir de las 24 h de exposición (**Figura 3**). Estos resultados se confirmaron por inmunofluorescencia indirecta al documentar que aquellas con fenotipo hipertrófico presentaban simultáneamente mitocondrias fragmentadas (**Figura 7**). Es posible que este cambio morfológico se deba a un incremento en la estructuración sarcomérica que experimentan los cardiomiocitos neonatos durante el desarrollo del fenotipo hipertrófico, debido a que las mitocondrias se

ven obligadas a agruparse en torno a las miofibrillas de manera similar a la arquitectura final que adoptan en el cardiomiocito adulto, sin embargo, al estimular las células con un agonista que produce “hipertrofia fisiológica” como IGF-1, no se modificó la morfología mitocondrial (**Figura 4**), a pesar que se produce un incremento en la sarcomerización de manera similar al observado en cardiomiocitos estimulados con NE (**Figuras 19 y 23**). En base a estas observaciones se puede postular que sólo el desarrollo de la hipertrofia patológica se asocia a fragmentación de la red mitocondrial en el cardiomiocito. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser testada en futuras investigaciones.

Interesantemente, *Communal et al.* observaron que la exposición de cardiomiocitos adultos en cultivo a NE (10 μ M por 24 h), incrementó significativamente la cantidad de células apoptóticas, a través de la activación de receptor β adrenérgico y proteína Gs, debido a que esta apoptosis fue inhibida al utilizar el antagonista β adrenérgico propanolol pero no como el antagonista adrenérgico α 1 prazosín. Además, este efecto se reprodujo cuando las células se trataron con isoprotenerol (agonista β adrenérgico) y forskolina [193]. En un trabajo reciente, se observó que el tratamiento de cardiomiocitos de ratas neonatas con NE (10 μ M por 48 h) incrementó significativamente el porcentaje de células apoptóticas en aproximadamente un 11 % [183], resultado cercano al encontrado en este trabajo, donde se observó un aumento del 8 % de cardiomiocitos apoptóticos respecto al control (**Figura 5**). Estos antecedentes son de gran interés debido a que diversas investigaciones han descrito fragmentación de la red mitocondrial durante la inducción del proceso apoptótico [137, 194, 195]. Al respecto nuestro Laboratorio fue pionero al informar la existencia de fragmentación mitocondrial asociada a la fase temprana de la apoptosis inducida por ceramidas [178]. También es importante recordar que hay diversos antecedentes que vinculan la muerte del cardiomiocito por apoptosis con la transición de hipertrofia patológica a insuficiencia cardíaca. Sin embargo, el análisis de nuestros resultados, mostró que el porcentaje de cardiomiocitos que presentaron fragmentación de la red mitocondrial frente al estímulo adrenérgico alcanzó un 39 % a las 48 h de estímulo respecto al control, valor que es considerablemente mayor que la cantidad de células apoptóticas observadas. Futuros estudios deberán clarificar si la fragmentación de la red mitocondrial inducida por NE se vincula con la apoptosis del cardiomiocito.

La morfología mitocondrial depende de los niveles y actividad de las proteínas relacionadas a la regulación de los procesos de dinámica que ocurren en este organelo, observándose que una disminución en la masa de las proteínas que gobiernan la fusión mitocondrial, produce fragmentación de la red por un predominio de los eventos de fisión y por el contrario, una disminución en los niveles de las proteínas reguladoras de la fisión mitocondrial genera agregación de las mitocondrias [120, 121, 162]. Al respecto, *Chen et al.* encontraron que los niveles de la proteína de fusión OPA1 están significativamente disminuidos en corazón de ratas con insuficiencia cardíaca, sin cambios en los niveles de las otras proteínas relacionadas a dinámica mitocondrial, observándose, además, una disminución para OPA1 en corazones humanos con cardiomiopatía isquémica, junto con un aumento en los niveles de Mfn1, Mfn2 y Drp-1, mientras que en corazones de pacientes con cardiomiopatía dilatada, la proteína OPA1 no mostró cambios, pero se encontró un aumento en los niveles de Mfn1, Mfn2 y Drp-1 [165]. Estos antecedentes indican, que posiblemente los cambios en la expresión de las proteínas relacionadas a los procesos de dinámica mitocondrial dependen del modelo hipertrófico utilizado, por lo tanto, para determinar si en nuestro modelo se encontraban alguna de estas alteraciones, se cuantificó los niveles de las proteínas de fusión OPA1 y Mfn2, y de las proteínas de fisión Fis-1 y Drp-1 por Western blot en extractos totales. Los resultados mostrados en la **Figura 12**, revelan que ninguno de los estímulos prohipertróficos utilizados genera cambios significativos en la masa de las proteínas estudiadas. Estos hallazgos se contraponen a lo esperado, por lo menos en los cardiomiocitos estimulados con NE, donde la fragmentación mitocondrial observada podría deberse a una disminución en las proteínas asociadas a fusión o un aumento en las proteínas relacionadas a fisión mitocondrial. Sin embargo, los modelos utilizados por *Chen et al.* están relacionados principalmente al desarrollo de insuficiencia cardíaca, lo que probablemente indique una modulación tardía en los niveles de estas proteínas, debido a que la insuficiencia cardíaca corresponde a un cuadro más avanzado del remodelamiento cardíaco [165]. Por otro lado, en uno de los primeros trabajos donde se relacionó dinámica mitocondrial e hipertrofia cardíaca, *Fang et al.* observaron que en distintos modelos de hipertrofia cardíaca in vivo y en cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas estimulados con el agonista adrenérgico

fenilefrina, un modelo de hipertrofia muy cercano al nuestro, se producía una disminución en los niveles del mRNA de Mfn2 de aproximadamente el 40 % [171]. Sin embargo, estos investigadores no determinaron los niveles proteicos de Mfn2 ni tampoco investigaron el desarrollo de posibles cambios en la morfología mitocondrial.

Una posible explicación para los cambios morfológicos de la red mitocondrial encontrados en este trabajo, es que independiente de los niveles proteicos, se produzca una modificación en la actividad de las proteínas involucradas. Para resolver esta posibilidad, nuestra atención se centró principalmente en el estudio de dos proteínas, cuyas actividades son ampliamente reguladas mediante modificaciones post-traduccionales. La primera de éstas es OPA1, que como ya hemos mencionado, existe como formas largas y cortas en la célula, observándose que durante procesos que generan una caída en el potencial de membrana mitocondrial, se produce acumulación de las formas cortas de la proteína y finalmente fragmentación mitocondrial [139, 140]. Precisamente, uno de los resultados encontrados en este trabajo muestra que durante la inducción del poseso hipertrófico por exposición a NE, se observó una caída significativa del potencial de membrana mitocondrial a las 48 h de exposición (**Figura 8**), por lo tanto, mediante Western blot, se determinaron los niveles de las distintas isoformas de la proteína. Los resultados no mostraron cambios entre las las formas largas y cortas de OPA1 respecto al control (**Figura 13**), posiblemente debido a que la disminución en el potencial de membrana mitocondrial provocada por NE no es suficiente para generar su proteólisis. Para comprender mejor este concepto, es necesario recordar que en ciertos casos, se ha propuesto al proceso de fisión como un mecanismo gatillado con el propósito de eliminar aquel material mitocondrial que ha experimentado un nivel de daño tal, que no pueda ser reparado o complementado mediante fusión para su reutilización y por lo tanto deberá ser degradado para su reciclaje [161]. Además, se debe destacar que en los trabajos donde observaron proteólisis de OPA1 mediada por disminución del potencial, utilizaron el agente desacoplante CCCP, que produce ruptura total de la gradiente protónica y por ende una caída brusca del potencial de membrana mitocondrial, obteniéndose un organelo totalmente despolarizado [140, 141]. En directa relación con este efecto, nuestra investigación determinó una disminución aproximada del 89 % y 23 %

en el potencial de membrana mitocondrial al incubar los cardiomiocitos con CCCP y NE, respectivamente (**Figura 8**).

Un evento de gran importancia para el inicio del proceso de fisión mitocondrial, es la migración de Drp-1 desde su fracción citosólica hacia la membrana mitocondrial, proceso a su vez regulado por diferentes modificaciones post-traduccionales entre las cuales se incluyen fosforilaciones, desfosforilaciones, ubiquitinación y sumoilación [196, 197]. De manera interesante, mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta y de fraccionamiento subcelular, se encontró un aumento de la colocalización entre Drp-1 y la proteína integral de membrana mitocondrial Fis-1 y un incremento en los niveles de Drp-1 en fracción enriquecida en mitocondrias en cardiomiocitos estimulados con NE (**Figura 14**). Estos resultados indican que la fragmentación de la red mitocondrial producida por NE en el cardiomiocito, es a través de un mecanismo que implica la migración de Drp-1 desde citosol a mitocondria. Se debe destacar que el importante papel que cumple Drp-1 en el desarrollo de patologías que afectan el tejido cardíaco ya ha sido reportada en otros trabajos, es así como *Ashrafian et al.* observaron que en ratones transgénicos con una mutación en la porción media de esta proteína (mutación que altera la interacción entre los monómeros de Drp-1), se desarrolla una notable respuesta hipertrófica, con adelgazamiento de paredes ventriculares y auriculares, con presencia de fibrosis intersticial y una disminución importante en la función contráctil [167]. Otra investigación determinó que durante periodos de isquemia cardíaca en ratón, se induce fisión mitocondrial en forma dependiente de la acción de Drp-1, observándose que al utilizar un inhibidor farmacológico para esta proteína, se previene la fragmentación de la red mitocondrial y disminuye el porcentaje de muerte celular, lo que se relacionó con una menor apertura del PTPM y con una preservación del potencial de membrana mitocondrial post-isquemia [166]. Todos estos antecedentes muestran que Drp-1 desempeña una función clave a nivel cardíaco, postulándose como un interesante blanco terapéutico.

9.2. Diferencias metabólicas en modelos de hipertrofia fisiológica y patológica

Es interesante destacar las diferencias en los resultados encontrados, donde el estímulo prohipertrófico patológico (NE) produjo fragmentación de la red mitocondrial, mientras que el estímulo fisiológico (IGF-1) no generó cambios en la morfología de este organelo. Esto puede estar en directa relación con las diferencias reportadas, principalmente a nivel metabólico, entre ambos tipos de hipertrofia. Como se ha descrito anteriormente, la hipertrofia patológica y fisiológica han sido asociadas a distintos perfiles en la utilización de sustratos, observándose una disminución en la oxidación de ácidos grasos y un incremento en la utilización de glucosa en el proceso patológico, similar a lo que ocurre en la etapa fetal, mientras que en la hipertrofia fisiológica se produce un aumento en la oxidación de ambos sustratos [9]. *Rimbaud et al.* determinaron cambios en el estado energético de modelos fisiológicos (sometidas a un incremento en la actividad física) y patológicos (ratas espontáneamente hipertensas) de hipertrofia cardíaca, observando que el estímulo fisiológico aumentó la utilización mitocondrial de ácidos grasos y la expresión de factores claves de la β -oxidación como PGC-1 α y en sus blancos río abajo acil-coA deshidrogenasa de cadena media (MCAD) y carnitina palmitoíl transferasa 1 (CPT1). Además estos cambios se relacionaron con un incremento en la capacidad respiratoria, sin modificaciones en el contenido de DNA mitocondrial, mientras que el estímulo patológico generó una disminución en el proceso de β -oxidación [198]. En otro estudio, los niveles de las enzimas fosfofructoquinasa y lactato deshidrogenasa, reguladores claves de la glicólisis, estaban incrementados en la hipertrofia patológica inducida por hipertensión arterial pero no en la hipertrofia fisiológica estimulada por actividad física [199]. Todas estas variaciones en la expresión de proteínas relacionadas a la actividad mitocondrial producen distintas consecuencias a nivel cardíaco, observándose que la hipertrofia cardíaca generada por estímulos fisiológicos, produce cambios adaptativos benéficos en el corazón. Un ejemplo claro son los hallazgos de una investigación focalizada a determinar la estructura y función cardíaca en un grupo de pacientes sometidos a entrenamiento físico, donde sus principales

resultados mostraron que en estos pacientes se incrementa el volumen ventricular izquierdo al final de la diástole, disminuye la frecuencia cardíaca en reposo y aumenta el consumo máximo de oxígeno, generándose una mejor adaptación al incremento en la demanda cardíaca frente al ejercicio y en condición de reposo [200]. En otra investigación se utilizó un modelo de ratón transgénico que sobreexpresaba el receptor de IGF-1 exclusivamente en el corazón. Estos ratones desarrollaron hipertrofia cardíaca, sin señales histopatológicas, incrementando su función cardíaca desde los 3 meses de edad, y manteniéndola hasta los 12 - 16 meses [26]. Por otro lado, el desarrollo y progresión de hipertrofia cardíaca patológica se asocia con un deterioro general de la función metabólica del corazón, donde se han observado deficiencias en la cadena transportadora de electrones y en la síntesis y metabolismo de ATP, además de los ya mencionados cambios a nivel de la utilización de sustrato [57]. En modelos caninos de insuficiencia cardíaca e hipertrofia generada por bandeo de la arteria aorta ascendente, se observó una caída significativa en las actividades de los complejos III y V de la fosforilación oxidativa, y una disminución en el contenido de ATP, fosfocreatinaa y en la relación ATP/fosfocreatinaa [201, 202], Igualmente en pacientes con cardiomiopatía dilatada, se detectó una reducción severa en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, asociada a una disminución en los niveles de ATP y fosfo-creatinaa [203]. La pérdida de la función cardíaca y mitocondrial que se produce en el desarrollo de hipertrofia patológica, podría estar estrechamente relacionada al cambio de sustrato metabólico utilizado por la mitocondria, debido a que la disminución en los niveles y actividad de las proteínas mitocondriales que forman parte de la maquinaria responsable de la importación y oxidación de ácidos grasos, provoca una acumulación de estos en el corazón, que no es un órgano diseñado para el almacenaje de sustratos, generándose procesos de lipoperoxidación y toxicidad cardíaca [9, 204].

En la mitocondria, nutrientes como glucosa, ácidos grasos y aminoácidos son transformados mediante el metabolismo intermediario en sus equivalentes reducidos NADH y FADH₂, que son moléculas que poseen un par de electrones con un elevado potencial de transferencia. Gracias a esta característica, ambas moléculas son oxidadas en los complejos proteicos de la fosforilación oxidativa. El flujo de electrones a través de

los complejos I, III y IV de la fosforilación oxidativa, provoca un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, produciéndose un gradiente de pH y un potencial electroquímico transmembranal o **potencial de membrana mitocondrial**, este potencial electroquímico se considera como la fuerza motriz en la **generación de ATP**, debido a que los protones son reingresados a la matriz mitocondrial mediante la acción de la ATP sintasa, formando ATP a partir de ADP y Pi. En el complejo IV se genera el último paso de protones hacia el espacio intermembrana, utilizándose el oxígeno como aceptor final de electrones para generar H₂O, por lo tanto la **velocidad de consumo de oxígeno** es directamente proporcional al potencial electroquímico generado por el flujo protónico a través de la membrana. Todos estos procesos reflejan la función de la mitocondria y por lo tanto son utilizados como parámetros para el estudio del metabolismo mitocondrial.

Para determinar si en nuestros modelos se generaban cambios en la actividad mitocondrial, se determinaron los distintos parámetros metabólicos mencionados, observándose que los cardiomiocitos tratados con NE presentaron una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, en el contenido total de ATPi y en la velocidad de consumo de oxígeno, todos estos cambios a las 48 h de exposición (**Figuras 8, 10 y 11**), mientras que las células estimuladas con IGF-1 no mostraron diferencias significativas respecto al control.

Considerando los resultados obtenidos, se destacan las siguientes observaciones:

1. Solamente los cardiomiocitos sometidos al estímulo prohipertrófico patológico mostraron una disminución en la actividad mitocondrial, lo que concuerda plenamente con los reportes relacionados a las diferencias metabólicas encontradas en modelos patológicos y fisiológicos de hipertrofia cardíaca anteriormente descritos.
2. Al analizar los resultados desde un punto de vista temporal, se aprecia que la exposición a NE induce en primer lugar modificaciones en la morfología de la red mitocondrial, desplazando el equilibrio hacia la fisión desde las 24 h, para luego dar paso a los respectivos cambios metabólicos encontrados a las 48 h de estímulo.

Dos interrogantes surgen de estas observaciones, ¿es la fisión mitocondrial la responsable de la disminución en la actividad del organelo? y ¿cómo la fragmentación de las mitocondrias produce tal efecto?. El hecho de que existe una relación entre los procesos de dinámica mitocondrial y la función del organelo ha sido respaldado por diversas investigaciones, sin embargo, aún no se ha establecido de forma clara la dirección en que esta relación ocurre, es decir, cuales son los cambios morfológicos que favorecen un mejor funcionamiento de la mitocondria, debido a que perturbaciones en proteínas asociadas tanto a fisión como a fusión mitocondrial han mostrado un deterioro en el estado energético [130, 159]. También se debe considerar, que en la gran mayoría de las investigaciones, se han utilizado modelos transgénicos y herramientas adenovirales, que producen una disminución marcada en la actividad de las proteínas involucradas, generándose un desplazamiento extremo en el equilibrio morfológico, por lo tanto, se necesitarán nuevas investigaciones, probablemente con modelos de estudio menos drásticos, para identificar claramente esta relación. Por otro lado, en células musculares se ha propuesto un modelo en el cual las mitocondrias se comportan como verdaderos cables energéticos, donde el oxígeno y sustratos respiratorios provenientes de un capilar difunden a través de la membrana plasmática para ser consumidos en las mitocondrias subsarcolemales, éstas a su vez generan una diferencia de potencial que, mediante filamentos mitocondriales, difunde hacia las mitocondrias intermiofibrilares, por lo tanto, una red mitocondrial más interconectada, permitiría un mayor flujo energético, mejorando la actividad de las mitocondrias ubicadas hacia el interior de la célula [205]. Sumado a esto, se debe recordar que a través del proceso de fusión se puede complementar material genético mitocondrial dañado y compartir sustratos matriciales, por lo tanto, una red mitocondrial fisiónada, no posee estos mecanismos de intercooperatividad, haciendo a estos organelos más propensos a un desgaste de su función.

9.3. Relación entre vías transduccionales asociadas a hipertrofia cardíaca y a dinámica mitocondrial

El aporte que realiza la mitocondria en la función cardíaca no se limita solamente a su rol como organelo proveedor de ATP, debido a que también forma parte integral de los eventos y señalizaciones que tienen lugar frente a distintas condiciones de estrés como hipoxia, isquemia/reperfusión y estrés oxidativo entre otras [206]. En el desarrollo del proceso hipertrófico la mitocondria también desempeña un importante papel, donde la relación más documentada al respecto es a nivel metabólico, produciéndose modificaciones en las diferentes etapas que dan cuenta de la función mitocondrial, sin embargo, la relación entre los eventos que regulan la dinámica mitocondrial y las vías transduccionales asociadas al proceso hipertrófico ha sido escasamente estudiada, encontrándose un número muy reducido de publicaciones al respecto.

Como ya se ha mencionado en la sección 4.1.2, se han identificado una gran cantidad de vías transduccionales involucradas en la manifestación del fenotipo hipertrófico, una de éstas es la vía de señalización MAPK y especialmente la vía Ras/Raf/MEK/ERK1/2, que es activada durante el estrés mecánico y mediante ligandos de receptores acoplados a proteína G [9]. Aún no se conoce completamente cuál es el papel que desempeña ERK1/2 en la hipertrofia cardíaca, pero se ha descrito su activación en respuesta a agonistas que desencadenan la respuesta patológica como endotelina 1, angiotensina II y NE, observándose que su activación es esencial para el aumento en la síntesis proteica que ocurre durante la hipertrofia del cardiomiocito [207]. Distintas investigaciones han mostrado que Mfn2 exhibe efectos supresores sobre la proliferación de la musculatura lisa vascular mediante interacción con la proteína Ras, inhibiendo su actividad y determinándose que la disminución en los niveles de Mfn2 produce una sobreactivación de la proteína ERK1/2 [208, 209]. *Fang et al.* observaron una disminución en el mRNA de Mfn2 en distintos modelos de hipertrofia cardíaca, disminución que se acompañaba con un incremento en la fosforilación de ERK1/2 [171]. Estos resultados indican que la interacción entre Mfn2 y Ras, podría ocurrir también en células cardíacas, sin embargo en este trabajo no se determinaron los niveles proteicos de Mfn2 ni se estableció

una relación directa entre esta proteína y la vía Ras/Raf/MEK/ERK1/2. Por otro lado, un estudio reciente determinó que Mfn2 al fosforilarse en el residuo de serina 442 mediante la acción de la proteína PKA, disminuye sus efectos antiproliferativos [136]. Esta interacción entre PKA y Mfn2 es interesante debido al importante papel que desempeña PKA en el proceso hipertrófico, regulando la fuerza y frecuencia contractil mediante el influjo y recaptación del Ca^{2+} , ya que sus principales blancos río abajo corresponden a canales de Ca^{2+} tipo L y fosfolamban [37].

La homeostasis del Ca^{2+} es un factor clave en la actividad cardíaca, además también participa en la activación de importantes cascadas transduccionales relacionadas al crecimiento hipertrófico. La mitocondria participa activamente en la regulación de los niveles del Ca^{2+} intracelular, siendo de gran importancia para esta actividad la interacción de este organelo con el retículo sarcoplásmico [210]. En este contexto, *De Brito et al.* determinaron que Mfn2 es una de las proteínas responsables de la interacción retículo endoplásmico - mitocondria, observando que la disminución en los niveles de esta proteína produce ruptura de las uniones entre estos dos organelos y pérdida de la eficiencia en la recaptación del Ca^{2+} mitocondrial [144]. De ésta manera Mfn2 al estar implicada en la homeostásis del Ca^{2+} , se encuentra vinculada al proceso hipertrófico, aunque sea en forma indirecta.

Una de las proteínas dependientes de Ca^{2+} más investigada en hipertrofia cardíaca es la fosfatasa calcineurina, la cual cumple un papel crítico en el crecimiento de tipo patológico, siendo activada, entre otros estímulos, mediante un incremento en el tono adrenérgico. Los ratones transgénicos que expresan una forma constitutivamente activa de calcineurina en corazón, desarrollan un marcado fenotipo hipertrófico que rápidamente progresa a cardiomiopatía dilatada, con signos de fibrosis intersticial e insuficiencia cardíaca congestiva [43]. *Cereghetti et al.* utilizaron distintos estímulos para producir la despolarización de la red mitocondrial en células HeLa, ellos observaron que esta despolarización incrementó los niveles del Ca^{2+} citosólico, lo cual induce la activación de la fosfatasa calcineurina que, a su vez, interactúa con la proteína de fisión mitocondrial Drp-1, produciendo su desfosforilación en serina 637, induciendo fragmentación de la red mitocondrial mediante un incremento en la actividad de Drp-1 [154]. Otro estudio

estableció que este mismo sitio es fosforilado por la proteína PKA, inhibiendo la actividad GTPasa de Drp-1 y por lo tanto disminuyendo la fisión mitocondrial [153].

Estos resultados son de gran interés para el presente trabajo, por esta razón se evaluó la participación de la fosfatasa calcineurina en la fragmentación mitocondrial mediada por NE, determinándose, como primera aproximación, la presencia de cambios en el estado de fosforilación de Drp-1 para el residuo de serina 637, constatándose una disminución significativa a las 48 h (**Figura 16**). Sin embargo, a pesar que se aprecia cierta tendencia a una disminución en la fosforilación para las 24 h de tratamiento, los resultados no mostraron diferencias significativas, probablemente debido a los bajos niveles basales de fosforilación encontrados para Drp-1. Por otro lado, en una investigación independiente se determinó un segundo sitio de fosforilación para Drp-1 en serina 656, que además, también es blanco de las proteínas PKA y calcineurina, observándose que esta modificación es controlada por los niveles citosólicos de Ca^{2+} y por el tono simpático, debido a que la activación de los canales de Ca^{2+} tipo L y la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares genera una rápida desfosforilación de este residuo en células PC12, mientras que en tejido cardíaco de ratones sometidos a entrenamiento físico mediante natación por 15 min y a inyección intraperitoneal del agonista β -adrenérgico isoproterenol, se incrementa esta fosforilación [211]. La existencia de dos sitios de fosforilación para Drp-1, que modulan su función como proteína de fisión mitocondrial y que además ambos sitios sean blanco del eje PKA-calcineurina, pareciera generar una actividad regulatoria redundante, sin embargo, una posible explicación es que exista una relación espacio-temporal donde la modificación de uno de los residuos regule el estado del segundo sitio [212].

Para confirmar la participación de calcineurina en nuestro modelo, se utilizaron herramientas adenovirales, encontrándose que la inhibición de calcineurina disminuye en forma significativa los cambios morfológicos de la red mitocondrial producidos por NE, mientras que la sobreexpresión de la subunidad catalítica constitutivamente activa por si sola produce fisión mitocondrial (**Figura 17**). Estos resultados confirman la participación de calcineurina en los cambios morfológicos de la red mitocondrial que ocurren en el cardiomiocito durante la inducción del proceso hipertrófico mediado por NE.

Como se muestra en la **Figura 26**, nuestros resultados y los antecedentes planteados en esta sección, indican al menos cuatro diferentes puntos de convergencia entre las vías transduccionales asociadas a hipertrofia cardíaca y las proteínas moduladoras de los procesos de dinámica mitocondrial, observándose en un primer nivel la regulación del estado de fosforilación de Drp-1 a través de las acciones contrapuestas de las proteínas PKA y calcineurina, acciones que involucran una disminución y un aumento en la migración de la proteína Drp-1 a la membrana mitocondrial, respectivamente.

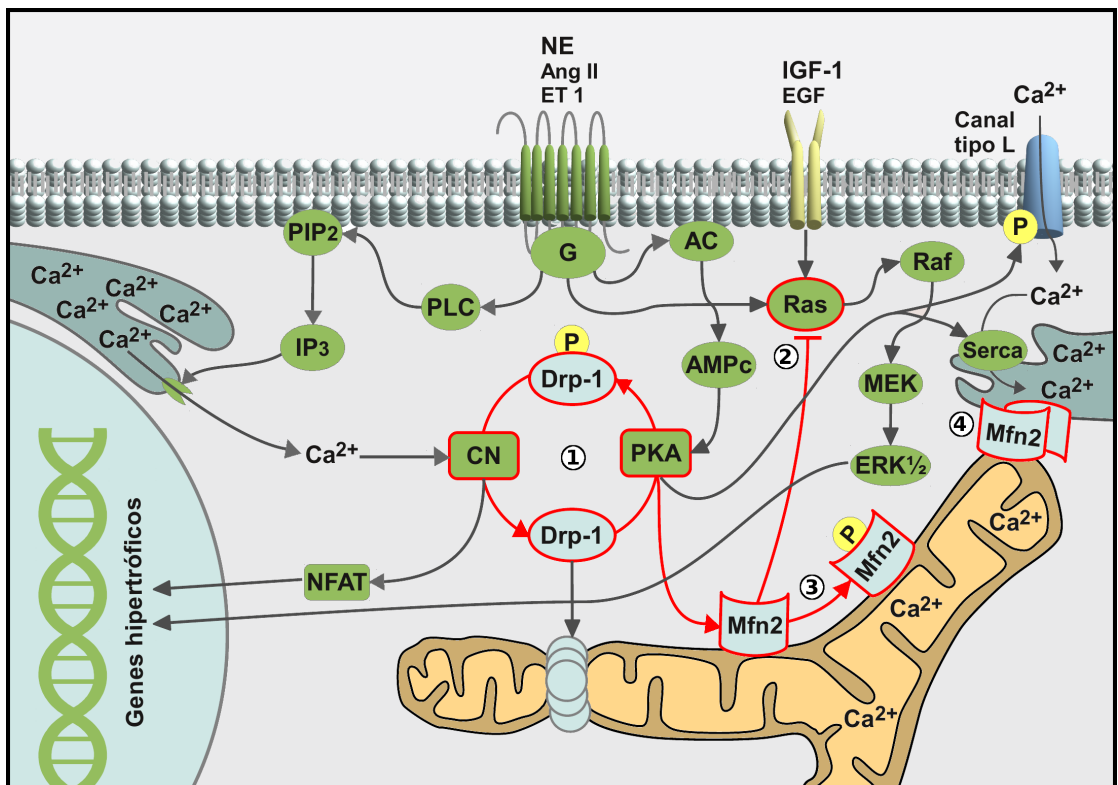


Figura 26: **Relación entre proteínas moduladoras de la dinámica mitocondrial y vías transduccionales asociadas a hipertrofia cardíaca**

La figura muestra en forma esquemática, distintos puntos de relación entre cascadas transduccionales cuya participación en el proceso hipertrofico ha sido ampliamente respaldado, y proteínas claves para la dinámica mitocondrial. En rojo se destacan las proteínas directamente implicadas. 1) Participación del eje PKA - calcineurina en la fosforilación y actividad de la proteína Drp-1; 2) Regulación de la proteína Ras mediante la interacción inhibitoria con Mfn2; 3) Fosforilación de Mfn2 por PKA e inhibición de su interacción con Ras; 4) Participación de Mfn2 en el acercamiento entre retículo sarcoplásmico y mitocondria. Ang II: angiotensina II; ET 1: endotelina 1; EGF: factor de crecimiento epidermal; G: proteína G heterotrimérica; AC: adenilato ciclasa; PLC: fosfolipasa C.

El punto 2 muestra la modulación en la actividad de la proteína Ras mediante la interacción inhibitoria con la proteína Mfn2. A su vez, como se aprecia en el punto 3, esta interacción es inhibida por la fosforilación de Mfn2 mediada por PKA. El cuarto nivel de comunicación entre ambas vías ha sido asignado al acercamiento entre retículo endoplásmico y mitocondria a través de la acción de la proteína Mfn2. Este punto se ha incluido debido a la importancia que tiene la comunicación entre estos dos organelos para la homeostásis del Ca^{2+} y por lo tanto para el crecimiento hipertrófico.

En la gran mayoría de los casos, los estímulos hipertróficos asociados a las proteínas de dinámica mitocondrial, corresponden a aquellos que desencadenan la respuesta patológica, sin embargo, nuevas investigaciones podrían completar este esquema y probablemente demostrar la participación de otros estímulos y proteínas en la interacción de ambos procesos.

9.4. Participación de las proteínas Mfn2 y Drp-1 en el desarrollo de hipertrofia cardíaca

En distintas oportunidades se han mencionado los cambios deletéreos en la función mitocondrial que se producen durante el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica, además, también existe la relación inversa, puesto que diferentes condiciones que generan un deterioro en la función mitocondrial producen un fenotipo hipertrófico y diversas patologías en el corazón. Dentro de este contexto, también se ha discutido que en distintos estados patológicos que afectan al músculo cardíaco se observan cambios en la morfología mitocondrial, sin embargo, hasta ahora no se ha planteado en qué forma los eventos de dinámica mitocondrial podrían afectar la respuesta hipertrófica.

Si tomamos en cuenta todos los antecedentes que muestran una disminución en el metabolismo de la célula durante la modulación de la dinámica mitocondrial, no resulta incongruente pensar que los cambios en la actividad de las proteínas que gobiernan los procesos de fusión o fisión mitocondrial produzcan serias consecuencias a nivel cardíaco. Para investigar esta posibilidad, cardiomiocitos de ratas neonatas se transdujeron con un adenovirus antisentido para la proteína Mfn2, produciendo fragmentación de la red mitocondrial. Luego de 48 h post-transducción, se observó

que estas células expresaban el fenotipo hipertrófico determinado como reexpresión de proteínas asociadas al programa genético fetal e incremento en el área celular y en la sarcomerización (**Figuras 19 - 21**). Estos resultados concuerdan con los observados por *Papanicolaou et al.* quienes utilizaron un modelo de ratón transgénico, cuya expresión de Mfn2 en corazón es inhibida [168]. Ellos encontraron que estos ratones manifiestan el fenotipo hipertrófico, con elevados niveles del transcrito del péptido atrial natriurético (ANP o ANF) y con un incremento significativo en el área celular del cardiomiocito, todo esto asociado a un modesto deterioro en la función cardíaca [168]. En otra investigación, *Yu et al.* mostraron que al sobreexpresar Mfn2 en cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas, disminuye la respuesta hipertrófica dependiente de Ang II, resultados que fueron replicados al utilizar un modelo *in vivo*, concluyéndose que esta proteína cumple un papel importante en el proceso hipertrófico [213].

El motivo por el cual se induce la respuesta hipertrófica en cardiomiocitos que presentan disminución en los niveles de Mfn2 es una interrogante aún sin resolver, sin embargo, para abordar este problema hay que considerar que Mfn2 participa en variados procesos celulares además de su rol como proteína de fusión. Al respecto, una explicación puede surgir de las investigaciones realizadas por *De Brito et al.* donde, como se ha mencionado anteriormente, determinaron una interacción directa entre Mfn2 y Ras, interacción que resultaba en la inhibición de la vía Ras/Raf/MEK/ERK1/2 [208]. Además, la disminución de Mfn2 en células MEF por si sola incrementó la fosforilación de ERK1/2 y precisamente se ha observado que la activación de ERK1/2 en corazón es suficiente para generar la respuesta hipertrófica [214]. Una segunda respuesta para este fenómeno podría encontrarse en la participación que tiene Mfn2 como proteína de unión entre mitocondria y retículo endoplásmico, determinándose que un silenciamiento de ésta proteína en células MEF o HeLa, produce la pérdida de la interacción entre ambos organelos, reduciendo la eficiencia en la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria, generándose un incremento en la concentración citosólica de este catión [144]. Si estos resultados se extrapolan a células cardíacas, el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} , producto del desacoplamiento entre mitocondria y retículo sarcoplásmico, podría participar en la activación de vías transduccionales

asociadas a hipertrofia como calcineurina o CAMK II. Además, es importante destacar que el flujo de Ca^{2+} entre ambos organelos desempeña un rol crucial en el metabolismo bioenergético, debido a que concentraciones de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial son necesarias para el correcto funcionamiento de la maquinaria enzimática que regula la síntesis de ATP [215]. Por ejemplo, se ha determinado que las enzimas deshidrogenasas que participan en el ciclo de Krebs son extremadamente sensibles a fluctuaciones en la concentración de Ca^{2+} , uno de estos casos es la piruvato deshidrogenasa (PDH), que es inhibida por eventos de fosforilación mediados por quinasas y es activada por fosfatasas dependientes de Ca^{2+} [216]. En el caso de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa, el Ca^{2+} se une directamente produciendo alteraciones en las cinéticas de sustratos y metabolitos inhibitorios, incrementando la actividad [215, 217]. La activación de estas enzimas trae como consecuencia un aumento en la producción de NADH, que es el donador primario de electrones en la cadena transportadora, observándose que el aumento de la razón NADH/NAD^+ lleva a un incremento lineal en la velocidad de consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de corazón [218]. Además, las concentraciones de Ca^{2+} intramitocondrial también regulan otros blancos importantes en la fosforilación oxidativa como el complejo F1/F0 ATPasa y proteínas relacionadas al transporte de sustratos como la translocasa de nucleótidos de adenina [219]. Por otro lado, también se deben considerar los efectos que presenta Mfn2 sobre el metabolismo celular, debido a que una disminución en los niveles de esta proteína en células musculares produce una pérdida en la oxidación de glucosa y ácidos grasos con una caída del potencial de membrana mitocondrial, mientras que su sobreexpresión incrementa la actividad de la mitocondria, observándose que estos efectos son independientes de la actividad de Mfn2 como proteína de fusión mitocondrial, debido a que los mismos resultados se reprodujeron al sobreexpresar una proteína mutada, sin actividad fusogénica [122]. Sumado a esta evidencia, los defectos en el proceso de fusión mitocondrial, por disminución de cualquiera de las proteínas que lo regulan (Mfn1, Mfn2 o OPA1), se asocia a pérdida en la actividad de este organelo [130]. Por lo tanto, es posible que en los cardiomiocitos transducidos con el adenovirus AsMfn2, la respuesta hipertrófica se produzca como mecanismo compensatorio, frente a

la disminución en la capacidad oxidativa mitocondrial.

En otros experimentos, nuestros resultados mostraron que la disminución en la actividad de la proteína de fisión mitocondrial Drp-1, mediante el uso de un adenovirus que expresa un dominante negativo para ésta proteína (K38A), inesperadamente previene el desarrollo de hipertrofia en cardiomiocitos estimulados con IGF-1 y NE (**Figuras 23 - 25**). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la mantención de una red mitocondrial fusionada impide la generación de la respuesta hipertrófica, tanto por estímulos de carácter fisiológico como patológico. La razón de este fenómeno quizás pueda encontrarse en los antecedentes descritos anteriormente, donde los procesos de fusión mitocondrial se han asociado a una mayor cooperatividad entre estos organelos, facilitando la difusión del potencial de membrana mitocondrial y complementando componentes matriciales, lo que daría como resultado una red mitocondrial más preparada frente al incremento en la demanda energética [117, 205]. Sin embargo se requieren nuevas investigaciones dirigidas a la determinación de los posibles eventos metabólicos y cascadas transduccionales responsables, para establecer claramente de qué forma la fusión de la red mitocondrial, mediada por una disminución en la actividad de Drp-1, previene el desarrollo de hipertrofia en el cardiomiocito. Por otro lado, estos resultados muestran que los eventos de dinámica mitocondrial desempeñan un papel crítico en la hipertrofia del cardiomiocito, observándose que los eventos de fusión y fisión mitocondrial presentan efectos opuestos en el desarrollo de este proceso.

9.5. Proyecciones

Innegable evidencia epidemiológica ha determinado que la hipertrofia cardíaca constituye un factor de riesgo independiente para cualquier causa de muerte cardiovascular [220, 221], por lo tanto es necesario estudiar los mecanismos que regulan éste proceso, para descubrir nuevas estrategias que prevengan o mitiguen progresión a cuadros más severos como insuficiencia cardíaca y cardiomiopatía dilatada. Diversos estudios han respaldado la existencia una estrecha relación entre el desarrollo de hipertrofia cardíaca y la función mitocondrial. En una novedosa investigación, *McDermott et al.* han identificado a endonucleasa G (EndoG), enzima previamente

asociada al proceso apoptótico, como un nuevo punto de unión entre hipertrofia cardíaca y mitocondria, observándose que la inhibición de EndoG induce el fenotipo hipertrófico en cultivo de cardiomiocitos, asociado a una importante disminución en la actividad metabólica, debido a que ésta endonucleasa es fundamental para los procesos mitocondriales [222].

En la actualidad, la dinámica mitocondrial es blanco de intensas investigaciones, sobretodo en lo que respecta a modelos celulares que presentan una alta dependencia de este organelo. Es así como cada vez aparecen más publicaciones que hacen referencia a éste proceso en tejido cardíaco, a tal punto que hoy en día ya se dispone de un inhibidor farmacológico para la proteína Drp-1, que ha demostrado su eficacia al atenuar los efectos deletéreos en un modelo *in vivo* de isquemia-reperfusión [166].

El presente estudio mostró por primera vez una sólida relación entre los eventos de dinámica mitocondrial y el desarrollo del proceso hipertrófico en el cardiomiocito, comprobándose que el estímulo adrenérgico asociado a la generación de la hipertrofia patológica, produce fisión de la red mitocondrial en forma dependiente de la migración de la proteína de fisión Drp-1 a través de un mecanismo que involucra la participación de la fosfatasa calcineurina, observándose una disminución en distintos parámetros metabólicos. Además, mediante el uso de herramientas adenovirales, se observó que la fragmentación de la red mitocondrial, mediada por una disminución en los niveles de Mfn2, induce la respuesta hipertrófica en el cardiomiocito, mientras que la fusión, producto de una disminución en la actividad de Drp-1, previene esta respuesta frente a distintos estímulos.

Una reciente investigación ha determinado la existencia de un nuevo componente en la relación entre hipertrofia cardíaca y dinámica mitocondrial, éste corresponde a un micro RNA (miR-499) que inhibe la expresión de las isoformas α y β de la subunidad catalítica de calcineurina, impidiendo la desfosforilación de Drp-1 y por lo tanto, disminuyendo la fragmentación mitocondrial [223]. Estos resultados son de gran interés debido a que este micro RNA se proyecta como una nueva herramienta terapéutica, ya que, al igual que el inhibidor farmacológico de Drp-1, previene los cambios desfavorables que se producen durante el proceso isquémico, observándose una menor área de infarto en corazones de

ratones transgénicos que presentan un aumento en la expresión de miR-499. Además, de acuerdo a nuestros resultados, ambos compuestos podrían prevenir de manera temprana el desarrollo del cuadro hipertrófico, impidiendo su evolución a un cambio más profundo en el remodelamiento cardíaco, y evitando un compromiso mayor en la función de este órgano.

Los resultados encontrados durante la realización de esta tesis aportan nuevos conocimientos a la regulación del proceso hipertrófico, pero también generan nuevas interrogantes. Es por esta razón que futuras investigaciones deberán determinar los mecanismos por los cuales las proteínas asociadas a la dinámica mitocondrial modulan la respuesta hipertrófica en el cardiomiocito y también de qué forma esta intervención modifica el estado energético de estas células.

La **Figura 26** resume los principales resultados de la presente investigación, donde se esquematizan los cambios celulares inducidos por los estímulos hipertroficados y/o por el uso de herramientas adenovirales, observándose a las mitocondrias como estructuras de color verde, mientras que la actina polimerizada, cuyo incremento en la organización corresponde a una mayor sarcomerización, se representa mediante líneas de color rojo. Es interesante destacar el hecho que solamente el estímulo hipertrófico patológico produzca fragmentación mitocondrial asociada a pérdida de la función del organelo, aportando un nuevo nivel de diferenciación entre la hipertrofia patológica y fisiológica, haciéndose necesario el uso de modelos *in vivo* para corroborar estos resultados e identificar finalmente a los cambios en la morfología mitocondrial, como un nuevo parámetro de diferenciación entre el proceso patológico y la respuesta adaptativa.

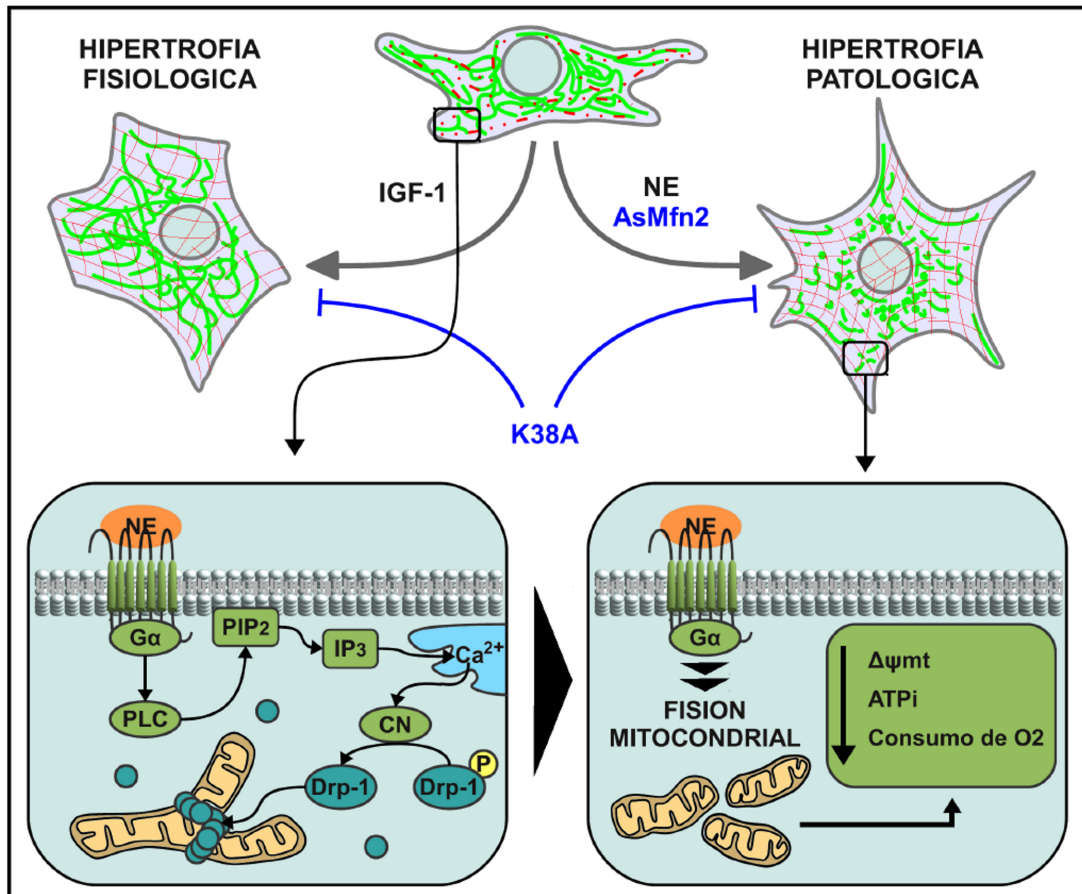


Figura 27: **Modelo final**

Esquema que ilustra una visión general de los resultados obtenidos. En la parte superior se representan los cambios que sufren los cardiomiocitos al ser tratados con NE, IGF-1 o con las herramientas adenovirales K38A y AsMfn2. Las estructuras de color verde claro representan a la red mitocondrial, y las líneas rojas representan la organización sarcomérica. Abajo se muestra el mecanismo propuesto para la fragmentación de la red mitocondrial inducida por NE, observándose la participación de la fosfatasa calcineurina en la desfosforilación y activación de la proteína de fisión mitocondrial Drp-1. Además, en el cuadro inferior derecho se indican los cambios en los parámetros metabólicos observados. $\Delta\psi_{mt}$: potencial de membrana mitocondrial; ATP_i: ATP intracelular.

10. CONCLUSIONES

1. El estímulo prohipertrófico norepinefrina, asociado al desarrollo del proceso patológico, fragmentó de la red mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas, determinada por un incremento en el número de mitocondrias por célula, disminución del volumen mitocondrial promedio y mayor porcentaje de células con morfología mitocondrial fisionada. Todos estos cambios se observaron desde las 24 h de tratamiento, sin modificaciones en el contenido mitocondrial total. Mientras que el estímulo prohipertrófico IGF-1, relacionado a la repuesta hipertrófica fisiológica, no cambió significativamente estos parámetros.
2. Los cambios morfológicos en la red mitocondrial previamente descritos, se asocian a una posterior pérdida en la función mitocondrial, observándose a las 48 h de exposición a norepinefrina, una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, en el contenido de ATPi y en la velocidad de consumo de oxígeno, además de un aumento en la producción de ROS.
3. La fragmentación mitocondrial generada por norepinefrina, se produce a través de un mecanismo que involucra la migración de Drp-1 a mitocondria y la participación de la fosfatasa calcineurina, debido a que en cardiomiocitos que expresan la subunidad catalítica activada de esta enzima, se reproduce el fenotipo mitocondrial fragmentado, mientras que en las células que expresan el péptido inhibitorio de calcineurina CAIN, no se observaron cambios morfológicos en las mitocondrias frente al estímulo adrenérgico.

4. La disminución en los niveles de Mfn2, mediante el uso de un adenovirus antisentido para esta proteína, fragmentó la red mitocondrial e indujo la respuesta hipertrofica, observándose un incremento en el área celular, en la sarcomerización del cardiomiocito y en los biomarcadores hipertróficos SKA y β -MHC, mientras que en cardiomiocitos cuya red mitocondrial ha sido fusionada, mediante transducción con un adenovirus dominante negativo para Drp-1, se previene el incremento en la sarcomerización y en el área celular mediada por norepinefrina.

5. Todos estos resultados indican una relación bidireccional entre la hipertrofia del cardiomiocito y la dinámica mitocondrial, debido a que la inducción de la respuesta hipertrófica patológica produce cambios en la morfología de estos organelos, mientras que la modulación en los niveles o actividad de proteínas asociadas a los procesos de fusión y fisión mitocondrial, produce modificaciones significativas en el desarrollo del proceso hipertrófico. Por otro lado, solamente la inducción de hipertrofia patológica generó alteraciones en la morfología y actividad de la red mitocondrial, pudiendo constituir este evento como un nuevo parámetro de diferenciación entre la hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica.

Nota: los números que aparecen al final de cada referencia, en la siguiente sección, corresponden a las páginas donde dicha referencia ha sido citada.

Referencias

- [1] van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoom LE, Schrier PI, van der Laarse A (2001) The role of angiotensin ii, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 218:113–124. 20
- [2] Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, Eulderink F (1991) Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. a study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J* 12:488–494. 20
- [3] Mima T, Ueno H, Fischman DA, Williams LT, Mikawa T (1995) Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:467–471. 20
- [4] Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR (2007) Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 87:521–544. 20
- [5] Gupta S, Das B, Sen S (2007) Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 9:623–652. 20, 21
- [6] Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA (2004) Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109:1580–1589. 20
- [7] Lee YI, Cho JY, Kim MH, Kim KB, Lee DJ, Lee KS (2006) Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. *Eur J Appl Physiol* 97:216–224. 20
- [8] Diwan A, Dorn GW (2007) Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* 22:56–64. 21
- [9] Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR (2010) Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 128:191–227. 21, 26, 102, 103, 106
- [10] Komuro I (2001) Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Jpn Circ J* 65:353–358. 22, 23, 29
- [11] Mann DL, Kent RL, Cooper G (1989) Load regulation of the properties of adult feline cardiocytes: growth induction by cellular deformation. *Circ Res* 64:1079–1090. 22
- [12] Komuro I, Kato Y, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y (1991) Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. possible role of protein kinase c activation. *J Biol Chem* 266:1265–1268. 22

- [13] Hannigan GE, Coles JG, Dedhar S (2007) Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease. *Circ Res* 100:1408–1414. 22
- [14] Ross RS, Borg TK (2001) Integrins and the myocardium. *Circ Res* 88:1112–1119. 22
- [15] Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Nagai R, Aikawa R, Uozumi H, Yazaki Y (1998) Role of ion channels and exchangers in mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 82:430–437. 22
- [16] Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR (2002) The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111:943–955. 22
- [17] Ruwhof C, van der Laarse A (2000) Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 47:23–37. 22, 23, 30
- [18] Zhou N, Li L, Wu J, Gong H, Niu Y, Sun A, Ge J, Zou Y (2010) Mechanical stress-evoked but angiotensin ii-independent activation of angiotensin ii type 1 receptor induces cardiac hypertrophy through calcineurin pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 397:263–269. 23
- [19] Molkenin JD, Dorn GW (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63:391–426. 23
- [20] Sakamoto M, Minamino T, Toko H, Kayama Y, Zou Y, Sano M, Takaki E, Aoyagi T, Tojo K, Tajima N, Nakai A, Aburatani H, Komuro I (2006) Upregulation of heat shock transcription factor 1 plays a critical role in adaptive cardiac hypertrophy. *Circ Res* 99:1411–8. 23
- [21] Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1986) All members of the mhc multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231:597–600. 23
- [22] Danzi S, Klein I (2002) Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease. *Thyroid* 12:467–72.
- [23] Nishiyama A, Kambe F, Kamiya K, Seo H, Toyama J (1998) Effects of thyroid status on expression of voltage-gated potassium channels in rat left ventricle. *Cardiovasc Res* 40:343–51. 23
- [24] Koziris LP, Hickson RC, Chatterton RT, Groseth RT, Christie JM, Goldflies DG, Unterman TG (1999) Serum levels of total and free igf-i and igfbp-3 are increased and maintained in long-term training. *J Appl Physiol* 86:1436–42. 24

- [25] Reiss K, Cheng W, Ferber A, Kajstura J, Li P, Li B, Olivetti G, Homcy CJ, Baserga R, Anversa P (1996) Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8630–5. 24
- [26] McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, Schinke M, Kong S, Sherwood MC, Brown J, Riggi L, Kang PM, Izumo S (2004) The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem* 279:4782–93. 24, 103
- [27] Kim J, Wende AR, Sena S, Theobald HA, Soto J, Sloan C, Wayment BE, Litwin SE, Holzenberger M, LeRoith D, Abel ED (2008) Insulin-like growth factor i receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol* 22:2531–43. 24
- [28] Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 253:239–54. 24
- [29] McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, Izumo S (2003) Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12355–12360. 24
- [30] McMullen J, Izumo S (2006) Role of the insulin-like growth factor 1 (igf1)/phosphoinositide-3-kinase (pi3k) pathway mediating physiological cardiac hypertrophy. *Heart failure: molecules, mechanisms and therapeutic targets* pp 90–117. 24
- [31] McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, Mollica JP, Zhang L, Zhang Y, Shioi T, Buerger A, Izumo S, Jay PY, Jennings GL (2007) Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:612–617. 25
- [32] Zhao XS, Pan W, Bekeredjian R, Shohet RV (2006) Endogenous endothelin-1 is required for cardiomyocyte survival in vivo. *Circulation* 114:830–837. 25
- [33] Jiang QS, Huang XN, Yang GZ, Dai ZK, Zhou QX, Shi JS, Wu Q (2005) Cardiac hypertrophy induced by prostaglandin f(2alpha) may be mediated by calcineurin signal transduction pathway in rats. *Sheng Li Xue Bao* 57:742–748. 25
- [34] Kim S, Iwao H (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin ii-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52:11–34. 25
- [35] Barki-Harrington L, Perrino C, Rockman HA (2004) Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 63:391–402. 25

- [36] Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, Graham RM (2008) Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res* 77:452–62. 25
- [37] Brodde OE, Michel MC, Zerkowski HR (1995) Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 30:570–84. 25, 107
- [38] Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different g proteins by protein kinase a. *Nature* 390:88–91. 26
- [39] Bristow M, Port JD (1998) Beta-adrenergic blockade in chronic heart failure. *Scand Cardiovasc J Suppl* 47:45–55. 26
- [40] Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA, Lefkowitz RJ (1995) Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ark inhibitor. *Science* 268:1350–3. 26
- [41] Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM (1997) Expression of protein kinase c beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest* 100:2189–2195. 26
- [42] Dorn GW, Force T (2005) Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115:527–537. 26, 27
- [43] Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215–228. 27, 29, 81, 107
- [44] Shibasaki F, Hallin U, Uchino H (2002) Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem* 131:1–15. 27
- [45] Akazawa H, Komuro I (2003) Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92:1079–1088. 27, 29
- [46] Liang Q, Windt LJD, Witt SA, Kimball TR, Markham BE, Molkenkin JD (2001) The transcription factors gata4 and gata6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276:30245–30253. 29
- [47] Kolodziejczyk SM, Wang L, Balazsi K, DeRepentigny Y, Kothary R, Megeney LA (1999) Mef2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol* 9:1203–1206. 29
- [48] Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD (1997) Bmk1/erk5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor mef2c. *EMBO J* 16:7054–7066. 29

- [49] Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M (2000) Gata-dependent recruitment of mef2 proteins to target promoters. *EMBO J* 19:2046–2055. 29
- [50] Wilkins BJ, Molkentin JD (2004) Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1178–91. 29, 81
- [51] Morimoto T, Hasegawa K, Wada H, Kakita T, Kaburagi S, Yanazume T, Sasayama S (2001) Calcineurin-gata4 pathway is involved in beta-adrenergic agonist-responsive endothelin-1 transcription in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276:34983–9. 29
- [52] Pollack PS (1995) Proto-oncogenes and the cardiovascular system. *Chest* 107:826–835. 30
- [53] Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1988) Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:339–343. 30
- [54] Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S (1991) Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 5:3037–3046. 30, 86
- [55] Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM (1997) Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med* 75:901–920. 30, 31, 32
- [56] Huss JM, Kelly DP (2004) Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res* 95:568–578. 31
- [57] Neubauer S (2007) The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356:1140–1151. 31, 32, 34, 35, 103
- [58] Finck BN (2007) The ppar regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovasc Res* 73:269–277. 31, 32
- [59] Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP (1996) Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 94:2837–2842. 32
- [60] Gilde AJ, van der Lee KAJM, Willemsen PHM, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor (ppar) alpha and pparbeta/delta, but not ppargamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res* 92:518–524. 32
- [61] Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguère V, Kelly DP (2004) Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 24:9079–9091. 32

- [62] Gardner JD, Murray DB, Voloshenyuk TG, Brower GL, Bradley JM, Janicki JS (2010) Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:H497–H504. 32
- [63] van Eickels M, Grohé C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA (2001) 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 104:1419–1423. 32
- [64] Huss JM, Kelly DP (2005) Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* 115:547–555. 32, 95
- [65] Bernardi P, Petronilli V, Lisa FD, Forte M (2001) A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* 26:112–117. 33
- [66] Newmeyer DD, Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112:481–490.
- [67] Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776. 33
- [68] Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004) Calcium, atp, and ros: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C817–C833. 33
- [69] Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Virgilio FD, Pozzan T (2003) Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22:8619–8627.
- [70] Rouslin W, Erickson JL, Solaro RJ (1986) Effects of oligomycin and acidosis on rates of atp depletion in ischemic heart muscle. *Am J Physiol* 250:H503–H508.
- [71] Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335–344. 33
- [72] Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL, Herman B (1999) Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* 31:305–319. 33
- [73] Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC (1997) A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 16:226–234. 33, 95
- [74] Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998) Mitochondrial transcription factor a is necessary for mtdna maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18:231–236. 34, 95
- [75] Marin-Garcia J, Goldenthal MJ (2002) Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review. *J Card Fail* 8:347–361. 34, 64

- [76] Morrissey R, Czer L, Shah P (2011) Chronic heart failure: Current evidence, challenges to therapy, and future directions. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 11:153–171. 34
- [77] Marin-Garcia J, Goldenthal MJ (2008) Mitochondrial centrality in heart failure. *Heart Fail Rev* 13:137–150. 34
- [78] Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH, Pinz I, Schultz V, Tornheim K, Tian R (2004) Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. *Hypertension* 44:662–667. 34
- [79] Osorio JC, Stanley WC, Linke A, Castellari M, Diep QN, Panchal AR, Hintze TH, Lopaschuk GD, Recchia FA (2002) Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid x receptor-alpha in pacing-induced heart failure. *Circulation* 106:606–612. 34
- [80] Beer M, Seyfarth T, Sandstede J, Landschutz W, Lipke C, Kostler H, von Kienlin M, Harre K, Hahn D, Neubauer S (2002) Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with ³¹p-sloop magnetic resonance spectroscopy. *J Am Coll Cardiol* 40:1267–1274. 34
- [81] Ye Y, Gong G, Ochiai K, Liu J, Zhang J (2001) High-energy phosphate metabolism and creatine kinase in failing hearts: a new porcine model. *Circulation* 103:1570–1576.
- [82] Weiss RG, Gerstenblith G, Bottomley PA (2005) Atp flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:808–813. 34
- [83] Gao L, Laude K, Cai H (2008) Mitochondrial pathophysiology, reactive oxygen species, and cardiovascular diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 38:137–155. 35
- [84] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2008) Oxidative stress and mitochondrial dna damage in heart failure. *Circ J* 72 Suppl A:A31–A37. 35
- [85] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61:372–385. 35, 36
- [86] Halestrap AP (2009) Mitochondria and reperfusion injury of the heart—a holey death but not beyond salvation. *J Bioenerg Biomembr* 41:113–121. 35, 36
- [87] Yellon DM, Downey JM (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 83:1113–1151. 36
- [88] Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM, Zhou ZN (2003) Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating bcl-2/bax expression. *Cell Res* 13:385–391. 36

- [89] Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, Wilcox JN, Thourani V, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2000) Preconditioning decreases bax expression, pmn accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* 45:661–670. 36
- [90] Chen Q, Camara AKS, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnfsky EJ (2007) Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C137–C147. 36
- [91] Sack MN (2009) Type 2 diabetes, mitochondrial biology and the heart. *J Mol Cell Cardiol* 46:842–849. 36
- [92] Wang J, Song Y, Wang Q, Kralik PM, Epstein PN (2006) Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. *Rev Diabet Stud* 3:108–117. 36
- [93] Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S, Youker KA, Taegtmeyer H (2002) Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. *Diabetes* 51:2587–2595. 37
- [94] Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP (2002) The cardiac phenotype induced by pparalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 109:121–130.
- [95] Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG (1997) Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34:25–33. 37
- [96] Shen X, Zheng S, Thongboonkerd V, Xu M, Pierce WM, Klein JB, Epstein PN (2004) Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E896–E905. 37
- [97] Su X, Han X, Mancuso DJ, Abendschein DR, Gross RW (2005) Accumulation of long-chain acylcarnitine and 3-hydroxy acylcarnitine molecular species in diabetic myocardium: identification of alterations in mitochondrial fatty acid processing in diabetic myocardium by shotgun lipidomics. *Biochemistry* 44:5234–5245. 37
- [98] Liang Q, Carlson EC, Donthi RV, Kralik PM, Shen X, Epstein PN (2002) Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51:174–181. 37
- [99] Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Matsusaka H, Inoue N, Ohta Y, Yokota T, Sunagawa K, Tsutsui H (2006) Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2237–H2245.
- [100] Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN (2006) Protection of cardiac mitochondria by overexpression of mnsod reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 55:798–805. 37

- [101] Davidson SM, Duchon MR (2007) Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circ Res* 100:1128–1141. 38
- [102] Dworakowski, Alom-Ruiz SP, Shah AM (2008) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol Rep* 60:21–28.
- [103] Madamanchi NR, Runge MS (2007) Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 100:460–473. 38
- [104] Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, Leverve X (2005) Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes* 54:2179–2187. 38
- [105] Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 345:50–54. 38
- [106] Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424–C1437. 38
- [107] McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF (1999) Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 34:539–545. 38
- [108] Ward NC, Croft KD (2006) Hypertension and oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:872–876.
- [109] Chan SHH, Wu KLH, Chang AYW, Tai MH, Chan JYH (2009) Oxidative impairment of mitochondrial electron transport chain complexes in rostral ventrolateral medulla contributes to neurogenic hypertension. *Hypertension* 53:217–227. 38
- [110] Postnov IV (2001) [the role of mitochondrial calcium overload and energy deficiency in pathogenesis of arterial hypertension]. *Arkh Patol* 63:3–10. 38
- [111] Chen L, Tian X, Song L (1995) Biochemical and biophysical characteristics of mitochondria in the hypertrophic hearts from hypertensive rats. *Chin Med J (Engl)* 108:361–366. 38
- [112] Logan DC (2006) The mitochondrial compartment. *J Exp Bot* 57:1225–1243. 39
- [113] Lehman JJ, Kelly DP (2002) Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Fail Rev* 7:175–185. 39
- [114] Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnóczky G (2006) Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* 174:915–921. 39

- [115] Zarain-Herzberg A (2006) Regulation of the sarcoplasmic reticulum ca^{2+} -atpase expression in the hypertrophic and failing heart. *Can J Physiol Pharmacol* 84:509–521. 39
- [116] Andersson SGE, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG (2003) On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:165–77; discussion 177–9. 39, 40
- [117] Bereiter-Hahn J, Voth M (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27:198–219. 39, 40, 43, 44, 78, 113
- [118] Okamoto K, Shaw JM (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39:503–536. 39, 40, 44, 45
- [119] Boldogh I, Vojtov N, Karmon S, Pon LA (1998) Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, mmm1p and mdm10p. *J Cell Biol* 141:1371–1381. 40
- [120] Chen H, Chan DC (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2:R283–R289. 40, 41, 99
- [121] Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:79–99. 40, 99
- [122] Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A (2005) The charcot-marie-tooth type 2a gene product, mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of oxphos system. *Hum Mol Genet* 14:1405–1415. 40, 43, 47, 56, 64, 112
- [123] de Brito OM, Scorrano L (2009) Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of ras. *Mitochondrion* 9:222–226. 44
- [124] Campello S, Scorrano L (2010) Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep* 11:678–684. 40
- [125] Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM, Battaloglu E (2004) Mutations in the mitochondrial gtpase mitofusin 2 cause charcot-marie-tooth neuropathy type 2a. *Nat Genet* 36:449–451. 40
- [126] Thiselton D, Alexander C, Taanman J, Brooks S, Rosenberg T, Eiberg H, Andreasson S, Regemorter NV, Munier F, Moore A, et al. (2002) A comprehensive survey of mutations in the opa1 gene in patients with autosomal dominant optic atrophy. *Investigative ophthalmology & visual science* 43:1715. 41

- [127] Marchbank N, Craig J, Leek J, Toohey M, Churchill A, Markham A, Mackey D, Toomes C, Inglehearn C (2002) Deletion of the opa1 gene in a dominant optic atrophy family: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease. *Journal of Medical Genetics* 39:e47. 41
- [128] Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the opa1 gene. *Hum Genet* 109:584–591. 41
- [129] Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of opa1. *EMBO J* 25:2966–2977. 41, 42
- [130] Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280:26185–26192. 41, 43, 47, 64, 96, 105, 112
- [131] Meeusen SL, Nunnari J (2005) How mitochondria fuse. *Curr Opin Cell Biol* 17:389–394. 41, 44
- [132] Cipolat S, Brito OD, Zilio BD, Scorrano L (2004) Opa1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15927. 41
- [133] Hales KG, Fuller MT (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted gtpase. *Cell* 90:121–129. 41
- [134] Eura Y, Ishihara N, Oka T, Mihara K (2006) Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (mfn) protein function. *Journal of cell science* 119:4913. 41
- [135] Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S (2006) March-v is a novel mitofusin 2- and drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* 7:1019–1022. 42, 46
- [136] Zhou W, Chen K, Cao W, Zeng J, Liao H, Zhao L, Guo X (2010) Mutation of the protein kinase a phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2. *Atherosclerosis* 211:216–223. 42, 107
- [137] Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ (2006) Role of bax and bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443:658–662. 42, 46, 98
- [138] Delivani P, Adrain C, Taylor RC, Duriez PJ, Martin SJ (2006) Role for ced-9 and egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol Cell* 21:761–773. 42
- [139] Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan D (2007) Opa1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mrna splicing, membrane potential, and yme1l. *The Journal of cell biology* 178:749. 42, 100

- [140] Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, Blik AVD (2009) Inducible proteolytic inactivation of opa1 mediated by the oma1 protease in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 187:959. 43, 77, 100
- [141] Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou J, Westermann B, Rugarli E, Langer T (2009) Regulation of opa1 processing and mitochondrial fusion by m-aaa protease isoenzymes and oma1. *The Journal of cell biology* 187:1023. 43, 77, 100
- [142] Cartoni R, Léger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Dériaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP (2005) Mitofusins 1/2 and erralpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 567:349–358. 43
- [143] Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacín M, Zorzano A (2006) Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes* 55:1783–1791. 44
- [144] Brito OD, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456:605–610. 44, 107, 111
- [145] Merkwirth C, Langer T (2008) Mitofusin 2 builds a bridge between er and mitochondria. *Cell* 135:1165–1167. 44
- [146] Olichon A, Guillou E, Delettre C, Landes T, Arnauné-Pelloquin L, Emorine LJ, Mills V, Daloyau M, Hamel C, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G, Belenguer P (2006) Mitochondrial dynamics and disease, opa1. *Biochim Biophys Acta* 1763:500–509. 44, 47
- [147] Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (2003) The mitochondrial protein hfis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein dlp1. *Mol Cell Biol* 23:5409–20. 45
- [148] Mannella CA (2006) Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 1763:542–548. 45
- [149] Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191:1141–58. 45
- [150] Jofuku A, Ishihara N, Mihara K (2005) Analysis of functional domains of rat mitochondrial fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochemical and biophysical research communications* 333:650–659. 45
- [151] Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related gtpase drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282:11521–11529. 45, 46

- [152] Han X, Lu Y, Li S, Kaitsuka T, Sato Y, Tomizawa K, Nairn A, Takei K, Matsui H, Matsushita M (2008) Cam kinase i alpha-induced phosphorylation of drp1 regulates mitochondrial morphology. *The Journal of Cell Biology* 182:573. 45
- [153] Chang C, Blackstone C (2007) Cyclic amp-dependent protein kinase phosphorylation of drp1 regulates its gtpase activity and mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry* 282:21583. 46, 108
- [154] Cereghetti G, Stangherlin A, de Brito OM, Chang C, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L (2008) Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15803–15808. 46, 81, 107
- [155] Karbowski M, Neutzner A, Youle R (2007) The mitochondrial e3 ubiquitin ligase march5 is required for drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* 178:71–84. 46
- [156] Harder Z, Zunino R, McBride H (2004) Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* 14:340–345. 46
- [157] Zunino R, Schauss A, Rippstein P, Andrade-Navarro M, McBride H (2007) The sumo protease senp5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* 120:1178–1188. 46
- [158] Wasiak S, Zunino R, McBride H (2007) Bax/bak promote sumoylation of drp1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *The Journal of cell biology* 177:439. 46
- [159] Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science* 120:838. 47, 96, 105
- [160] Parone P, Cruz SD, Tondera D, Mattenberger Y, James D, Maechler P, Barja F, Martinou J (2008) Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial dna. *PLoS One* 3:e3257. 47
- [161] Twig G, Elorza A, Molina A, Mohamed H, Wikstrom J, Walzer G, Stiles L, Haigh S, Katz S, Las G, et al. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* 27:433–446. 47, 100
- [162] Kuzmicic J, del Campo A, López-Crisosto C, Morales P, Pennanen C, Bravo-Sagua R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro P, Verdejo H, et al. (2011) Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 48, 99
- [163] Beraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov A, Ronot X, Tourneur Y, Saks V (2009) Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating hl-1 cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41:195–214. 48, 96, 97

- [164] Parra V, Verdejo H, del Campo A, Pennanen C, Kuzmicic J, Iglewski M, Hill J, Rothermel B, Lavandero S (2011) The complex interplay between mitochondrial dynamics and cardiac metabolism. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43:47–51. 48
- [165] Chen L, Gong Q, Stice J, Knowlton A (2009) Mitochondrial opa1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* 84:91–99. 50, 97, 99
- [166] Ong S, Subrayan S, Lim S, Yellon D, Davidson S, Hausenloy D (2010) Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 121:2012–2022. 50, 51, 97, 101, 114
- [167] Ashrafian H, Docherty L, Leo V, Towison C, Neilan M, Steeples V, Lygate C, Hough T, Townsend S, Williams D, et al. (2010) A mutation in the mitochondrial fission gene dnm1l leads to cardiomyopathy. *PLoS Genetics* 6:e1001000. 50, 101
- [168] Papanicolaou K, Khairallah R, Ngoh G, Chikando A, Luptak I, O'Shea K, Riley D, Lugus J, Colucci W, Lederer W, et al. (2011) Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Molecular and Cellular Biology* 31:1309. 50, 51, 111
- [169] James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC (2003) hfs1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278:36373–36379. 50
- [170] Lee Y, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators fis1, drp1, and opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15:5001–5011. 50
- [171] Fang L, Moore XL, Gao XM, Dart AM, Lim YL, Du XJ (2007) Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Sci* 80:2154–2160. 51, 64, 77, 100, 106
- [172] Galvez A, Ulloa J, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros L, Lavandero S (2003) Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278:38484. 56
- [173] Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12:2245–2256. 56
- [174] Taigen T, Windt LD, Lim H, Molkentin J (2000) Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:1196. 56
- [175] Muñoz J, Collao A, Chiong M, Maldonado C, Adasme T, Carrasco L, Ocaranza P, Bravo R, Gonzalez L, et al. (2009) The transcription factor mef2c mediates cardiomyocyte hypertrophy induced by igf-1 signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 388:155–160. 57, 63

- [176] Ardehali H, O'Rourke B, Marban E (2005) Cardioprotective role of the mitochondrial atp-binding cassette protein 1. *Circulation research* pp 01–RES. 60
- [177] Munoz J, Chiong M, García L, Troncoso R, Toro B, Pedrozo Z, Diaz-Elizondo J, Salas D, Parra V, et al. (2010) Iron induces protection and necrosis in cultured cardiomyocytes: Role of reactive oxygen species and nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 48:526–534. 60
- [178] Parra V, Eisner V, Chiong M, Criollo A, Moraga F, Garcia A, Hartel S, Jaimovich E, Zorzano A, Hidalgo C, Lavandero S (2008) Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc Res* 77:387–397. 60, 62, 78, 98
- [179] Copaja M, Venegas D, Aránguiz P, Canales J, Vivar R, Catalán M, Olmedo I, Rodríguez A, Chiong M, Leyton L, et al. (2011) Simvastatin induces apoptosis by a rho-dependent mechanism in cultured cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 60
- [180] Chiong M, Parra V, Eisner V, Ibarra C, Maldonado C, Criollo A, Bravo R, Quiroga C, Contreras A, Vicencio J, et al. (2010) Parallel activation of ca²⁺-induced survival and death pathways in cardiomyocytes by sorbitol-induced hyperosmotic stress. *Apoptosis* 15:887–903. 60
- [181] Villena J, Henriquez M, Torres V, Moraga F, Díaz-Elizondo J, Arredondo C, Chiong M, Olea-Azar C, Stutzin A, Lavandero S, et al. (2008) Ceramide-induced formation of ros and atp depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free Radical Biology and Medicine* 44:1146–1160. 61
- [182] Araya-Maturana R, Cardona W, Cassels B, Delgado-Castro T, Ferreira J, Miranda D, Pavani M, Pessoa-Mahana H, Soto-Delgado J, Weiss-López B (2006) Effects of 9, 10-dihydroxy-4, 4-dimethyl-5, 8-dihydro-1 (4h)-anthracenone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14:4664–4669. 61
- [183] Fu Y, Chi C, Yin S, Hwang B, Chiu Y, Hsu S (2004) Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes through a reactive oxygen species–tnf α –caspase signaling pathway. *Cardiovascular research* 62:558. 68, 98
- [184] Rothermel BA, Vega RB, Williams RS (2003) The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med* 13:15–21. 82
- [185] Ferrari R, Cargnoni A, Ceconi C (2006) Anti-ischaemic effect of ivabradine. *Pharmacol Res* 53:435–439. 95
- [186] Stanley W, Chandler M (2002) Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart failure reviews* 7:115–130. 95
- [187] Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla H, Wiegand V (1990) Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal* 11:509. 95

- [188] Lev D, Nissenkorn A, Leshinsky-Silver E, Sadeh M, Zeharia A, Garty B, Blieden L, Barash V, Lerman-Sagie T (2004) Clinical presentations of mitochondrial cardiomyopathies. *Pediatric cardiology* 25:443–450. 95
- [189] Schaper J, Meiser E, Stammer G (1985) Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circulation research* 56:377–391. 96
- [190] Vendelin M, Béraud N, Guerrero K, Andrienko T, Kuznetsov A, Olivares J, Kay L, Saks V (2005) Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a crystal-like pattern. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288:C757. 96
- [191] Hackenbrock C (1968) Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61:598. 97
- [192] Kanzaki Y, Terasaki F, Okabe M, Otsuka K, Katashima T, Fujita S, Ito T, Kitaura Y (2010) Giant mitochondria in the myocardium of a patient with mitochondrial cardiomyopathy. *Circulation* 121:831–832. 97
- [193] Communal C, Singh K, Pimentel D, Colucci W (1998) Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the β -adrenergic pathway. *Circulation* 98:1329–1334. 98
- [194] Karbowski M, Lee Y, Gaume B, Jeong S, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith C, Youle R (2002) Spatial and temporal association of bax with mitochondrial fission sites, drp1, and mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159:931–938. 98
- [195] Desagher S, Martinou J (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10:369–377. 98
- [196] Hyde B, Twig G, Shirihai O (2010) *Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics* (Elsevier), Vol. 21, pp 575–581. 101
- [197] Han X, Tomizawa K, Fujimura A, Ohmori I, Nishiki T, Matsushita M, Matsui H (2011) Regulation of mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Acta Med Okayama* 65:1–10. 101
- [198] Rimbaud S, Sanchez H, Garnier A, Fortin D, Bigard X, Veksler V, Ventura-Clapier R (2009) Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46:952–959. 102
- [199] Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, Kakinuma Y, Matsuda M, Yamaguchi I (2003) Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertension Research* 26:829–838. 102

- [200] Adams T, Yanowitz F, Fisher A, Ridges J, Lovell K, Pryor T (1981) Noninvasive evaluation of exercise training in college-age men. *Circulation* 64:958–965. 103
- [201] Marín-García J, Goldenthal M, Moe G (2001) Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovascular research* 52:103. 103
- [202] Zhang J, Merkle H, Hendrich K, Garwood M, From A, Ugurbil K, Bache R (1993) Bioenergetic abnormalities associated with severe left ventricular hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation* 92:993. 103
- [203] Beer M, Seyfarth T, Sandstede J, Landschütz W, Lipke C, Köstler H, von Kienlin M, Harre K, Hahn D, Neubauer S (2002) Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with ³¹p-sloop magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American College of Cardiology* 40:1267–1274. 103
- [204] Chiu H, Kovacs A, Ford D, Hsu F, Garcia R, Herrero P, Saffitz J, Schaffer J (2001) A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 107:813–822. 103
- [205] Skulachev V (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in biochemical sciences* 26:23–29. 105, 113
- [206] Marín-García J, Goldenthal MJ (2004) Heart mitochondria signaling pathways: appraisal of an emerging field. *J Mol Med* 82:565–578. 106
- [207] Clerk A, Aggeli I, Stathopoulou K, Sugden P (2006) Peptide growth factors signal differentially through protein kinase c to extracellular signal-regulated kinases in neonatal cardiomyocytes. *Cellular signalling* 18:225–235. 106
- [208] Brito OD, Scorrano L (2009) Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of ras. *mitochondrion* 9:222–226. 106, 111
- [209] Chen KH, Guo X, Ma D, Guo Y, Li Q, Yang D, Li P, Qiu X, Wen S, Xiao RP, Tang J (2004) Dysregulation of hsg triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol* 6:872–883. 106
- [210] Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay F, Fogarty K, Lifshitz L, Tuft R, Pozzan T (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial ca²⁺ responses. *Science* 280:1763. 107
- [211] Cribbs J, Strack S (2007) Reversible phosphorylation of drp1 by cyclic amp-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO reports* 8:939–944. 108
- [212] Jahani-Asl A, Slack R (2007) The phosphorylation state of drp1 determines cell fate. *EMBO reports* 8:912–913. 108

- [213] Yu H, Guo Y, Mi L, Wang X, Li L, Gao W (2011) Mitofusin 2 inhibits angiotensin ii-induced myocardial hypertrophy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 16:205. 111
- [214] Bueno O, Windt LD, Tymitz K, Witt S, Kimball T, Klevitsky R, Hewett T, Jones S, Lefer D, Peng C, et al. (2000) The mek1–erk1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal* 19:6341–6350. 111
- [215] Balaban R (2009) The role of ca²⁺ signaling in the coordination of mitochondrial atp production with cardiac work. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1787:1334–1341. 112
- [216] Denton R, McCormack J, Rutter G, Burnett P, Edgell N, Moule S, Diggie T (1996) The hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase complex. *Advances in Enzyme Regulation* 36:183–198. 112
- [217] Wan B, LaNoue K, Cheung J, Scaduto R (1989) Regulation of citric acid cycle by calcium. *Journal of Biological Chemistry* 264:13430. 112
- [218] Mootha V, Arai A, Balaban R (1997) Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 272:H769–H775. 112
- [219] Liu T, O'Rourke B (2009) Regulation of mitochondrial ca²⁺ and its effects on energetics and redox balance in normal and failing heart. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41:127–132. 112
- [220] Levy D, Garrison R, Savage D, Kannel W, Castelli W (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the framingham heart study. *New England Journal of Medicine* 322:1561–1566. 113
- [221] Vakili B, Okin P, Devereux R (2001) Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *American heart journal* 141:334–341. 113
- [222] McDermott-Roe C, Ye J, Ahmed R, Sun X, Serafín A, Ware J, Bottolo L, Muckett P, Cañas X, Zhang J, et al. (2011) Endonuclease g is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function. *Nature* 478:114–118. 114
- [223] Wang J, Jiao J, Li Q, Long B, Wang K, Liu J, Li Y, Li P (2010) mir-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nature medicine* 17:71–78. 114