

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“PARTICIPACIÓN DEL PORO DE TRANSICIÓN DE
PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (mPTP) EN
PRECONDICIONAMIENTO POR TAQUICARDIA”**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

Patrocinante

Dra. María Antonieta
Valenzuela Pedevila
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Directores de Tesis

Dra. Paulina Donoso Laurent
Programa de Fisiología
Dra. Gina Sánchez Vergara
Programa de Fisiopatología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

CAROLINA ISABEL FERNÁNDEZ PÉREZ

2009

1

“A mis primas Daniela y Pacita”

AGRADECIMIENTOS

A las Doctoras Paulina Donoso y Gina Sánchez por acogerme en su laboratorio y permitir que hiciera mi tesis con ellas, por su tiempo y dedicación a la realización de este trabajo. Agradecimientos especiales a la Dra. Gina por su por enseñarme su amplia experiencia experimental y a la Dra. Paulina por sus correcciones de escritura que permitieron que este trabajo quedara muy bien escrito.

A mis compañeros de laboratorio, Zully y Ernesto, por su ayuda constante, por hacer más ameno el día cuando los experimentos no resultaban, por las largas charlas de temas varios (desde actualidad hasta los resultados de los experimentos del día). Agradezco a Zully por su acogida y por su preocupación constante, tanto en la parte experimental como personal.

A Luis, por su tiempo y sus conocimientos, siempre dispuesto a ayudar y a revisar mis cálculos para preparar soluciones.

A las chicas del Lab de la Dra. Hidalgo, Pao Fernández, Caro Molina, Carol, Pao Llanos y Pao Haeger, por sus constantes sugerencias para mejorar este trabajo. Agradecimientos especiales a Pao Fernández por su confianza y amistad.

A la Dra. María Antonieta Valenzuela por la confianza al aceptar patrocinar este trabajo y a las Dras. Ana María Kettlun y Lucía Collados por permitirme ser su ayudante alumno y conocer un área que me encanta, la docencia.

A Álvaro, por sus comentarios siempre importantes en la realización y escritura de este trabajo, por su comprensión y apoyo.

A mis amigos Italo, Marce y Nacho por darme ánimo siempre, por su comprensión y por las largas charlas en compañía de un café.

A mis amigas de la vida, Caro Duarte y Caro Bown, por desearme lo mejor siempre.

A mi familia, por su apoyo constante, en especial a mi hermano, siempre dispuesto a escuchar mis resultados aunque no entendiera nada de lo que yo le hablaba.

A mis primas Daniela y Pacita, por darme fuerzas para continuar día a día.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por los proyectos Fondecyt 1080497, 1080481 y Centro de Estudios Moleculares de la Célula Fondap 5010006.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS	vii
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Daño producido por Isquemia-Reperusión.....	1
1.2. Precondicionamiento Cardíaco.....	2
1.2.1. Precondicionamiento Isquémico.....	2
1.2.2. Precondicionamiento por Taquicardia.....	3
1.3. Mitocondrias.....	3
1.3.1. Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial (mPTP).....	4
1.4. Mecanismos Moleculares que median el Precondicionamiento Isquémico.....	6
1.4.1. Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial y Cardioprotección.....	6
1.4.2. ROS y Cardioprotección.....	9
1.4.3. S-glutationilación de proteínas.....	9
1.5. HIPÓTESIS	11
1.6. OBJETIVO GENERAL.....	11
1.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. Reactivos.....	12
2.2. Diseño Experimental.....	14
2.3. Obtención de mitocondrias por centrifugación diferencial.....	15
2.4. Medición de proteínas.....	16
2.5. Western blot.....	16
2.5.1. Teñido de membranas.....	20

2.5.2. Deshibridización de membranas.	20
2.6. Cambio de Volumen Mitocondrial.	21
2.7. Inmunoprecipitación.	21
2.8. Medición de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).....	22
3. RESULTADOS	24
3.1. Preparación de una fracción enriquecida en mitocondrias.	24
3.2. Contenido relativo de las proteínas CypD, ANT y VDAC en corazones de animales sometidos a taquicardia y animales controles.....	24
3.3. Cambio de volumen mitocondrial inducido por ión calcio.....	27
3.3.1. Cambio de volumen mitocondrial por sobrecarga de ión calcio en mitocondrias de animales controles y taquicárdicos.....	29
3.3.2. Cambio de volumen mitocondrial en condiciones reductoras y oxidantes.	31
3.4. Modificación redox de proteínas mitocondriales.....	33
3.4.1. Inmunoprecipitación de proteínas S-glutationiladas.	35
3.5. Glutatión mitocondrial	36
4. DISCUSIÓN.....	38
5. CONCLUSIONES.....	43
6. REFERENCIAS	44

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Esquema de la estructura potencial del mPTP.....	5
Figura 2: Precondicionamiento isquémico inhibe la apertura del mPTP durante la reperfusión.....	8
Figura 3: Protocolo de Taquicardia precondicionante	15
Figura 4: Esquema de la preparación mitocondrial.....	17
Figura 5: Perfil electroforético y “Western blot” de la fracción mitocondrial.....	25
Figura 6: Contenido relativo de las proteínas CypD, ANT y VDAC	26
Figura 7: Cambio de volumen mitocondrial inducido por ión calcio	28
Figura 8: Cambio de volumen mitocondrial por sobrecarga de ión calcio en mitocondrias de animales controles y taquicárdicos	30
Figura 9: Cambio de volumen mitocondrial en condiciones reductoras y oxidantes.....	32
Figura 10: Proteínas S-glutationiladas en controles y taquicárdicos.....	34
Figura 11: Inmunoprecipitación de proteínas S-glutationiladas.....	35
Figura 12: Razón GSH/GSSG en mitocondrias provenientes de animales controles y taquicárdicos.....	37
Figura 13: Esquema del modelo actual para la formación del mPTP.....	40
Tabla 1: Protocolo para dos geles Tris-acetato 7 % y 15 % de poliacrilamida.....	18
Tabla 2: Protocolo para dos geles en gradiente Tris-acetato 3,5 - 8 % de poliacrilamida ..	18

ABREVIATURAS

ADP: Adenosina difosfato

Akt: Proteína quinasa B

ANT: Transportador de Nucleótidos de Adenina

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albúmina Sérica de Bovino

C: animales controles

CsA: Ciclosporina A

CypD: Ciclofilina D

DTT: Ditiotreitól

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GSK3 β : Quinasa de la Glicógeno sintasa 3 β

HSP70 mitocondrial: Proteína de shock térmico de 70 kDa mitocondrial

IgG: Inmunoglobulina de tipo G

kDa: Kilo Dalton

min: minutos

Mit: mitocondrias

mK_{ATP}: Canal de Potasio mitocondrial dependiente de ATP

mPTP: Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial

mtCK: Creatina quinasa mitocondrial

NEM: N-Etilmaleimida

PBR: Receptor Periférico de Benzodiazepinas mitocondrial

PiC: transportador de fosfato mitocondrial

PI3K: Quinasa de 3-fosfatidilinositol

PKC: Proteína quinasa C

RS: Retículo Sarcoplásmico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RyR2: Receptor de Ryanodina tipo 2

seg: segundos

St: estándar de peso molecular

T: animales sometidos a preconditionamiento por taquicardia

VDAC: Canal Aniónico Sensible a Potencial

RESUMEN

El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) es una estructura que se forma en la mitocondria y que comunica la matriz mitocondrial directamente con el citoplasma. Se han propuesto como componentes estructurales del mPTP a tres proteínas, el canal aniónico sensible a potencial (VDAC) ubicado en la membrana externa mitocondrial, el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en la membrana interna y Ciclofilina D (CypD) en la matriz mitocondrial. El mPTP se puede abrir tanto por aumentos de ión calcio como de especies reactivas de oxígeno (ROS) al interior de la mitocondria.

Aperturas transitorias de este poro tienen por objetivo liberar el exceso de ión calcio que se acumula en la mitocondria, pero aperturas prolongadas pueden provocar la entrada masiva de agua a la mitocondria lo que lleva a muerte celular luego de una isquemia prolongada.

El corazón puede preconditionarse, esto es hacerse resistente al daño producido por isquemia - reperfusión. Existen diversos modos para preconditionar al corazón, y en todos ellos se ha determinado que existe un aumento en la producción de ROS, las que son determinantes para el desarrollo de la protección. El preconditionamiento por taquicardia consiste en episodios cortos de taquicardia realizados antes de una isquemia prolongada, lo que protege del daño producido por isquemia - reperfusión.

Diversos modelos de preconditionamiento sugieren que el mecanismo de protección involucra la inhibición de la apertura del mPTP. El objetivo principal de este trabajo es demostrar que el preconditionamiento por taquicardia provoca un retardo en el ensamblaje del mPTP y que los ROS, por medio de modificaciones oxidativas de proteínas mitocondriales, median este efecto. Para ello se evaluó el cambio de volumen mitocondrial por sobrecarga de ión calcio de mitocondrias provenientes de corazones de animales controles y animales preconditionados por taquicardia. Se encontró que el cambio de volumen mitocondrial es más lento en las mitocondrias de los animales sometidos a taquicardia, lo que indica que ésta produce un retardo en la apertura del mPTP. Además, se observó que en las mitocondrias de corazones de animales sometidos a taquicardia se encuentran disminuidas dos proteínas claves para la formación del mPTP, ANT y CypD, lo

que podría ser responsable del retardo en el ensamblaje del mPTP. Además la taquicardia preconditionante produjo un aumento generalizado de una modificación postraducciona de tipo oxidativa, la *S*-glutacionilación, de proteínas mitocondriales.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que el mPTP participa en el mecanismo de preconditionamiento por taquicardia. El retardo observado en la apertura del mPTP se correlaciona con la disminución de las proteínas ANT y CypD en las mitocondrias de los corazones de los animales preconditionados. Además, los ROS podrían estar mediando este efecto a través de la *S*-glutacionilación de proteínas.

ABSTRACT

Role of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in tachycardia preconditioning.

Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) is a multiprotein complex that communicates directly the mitochondrial matrix with the cytoplasm. It has been proposed that mPTP is structurally formed by three proteins: the voltage-dependent anion channel (VDAC), located in the outer mitochondrial membrane, the adenine nucleotide translocator (ANT), located in the inner mitochondrial membrane, and Cyclophilin D (CypD) located in the mitochondrial matrix. Increases in either calcium or reactive oxygen species (ROS) inside the mitochondria can induce the opening of mPTP.

Transitory openings of this pore may be necessary to release calcium excesses accumulated inside the mitochondria, but long openings could provoke the massive entrance of water into the mitochondria and this is believed to be the cause of cell death after a sustained ischemia.

The heart can be preconditioned, i.e. it can increase its resistance to the damage produced by ischemia-reperfusion. There are several protocols for heart preconditioning. Tachycardia preconditioning includes several short episodes of tachycardia before a sustained ischemia, which protect against the damage produced for ischemia-reperfusion. An increase in ROS production during the preconditioning maneuver is determinant for the development of the protection in all protocols of preconditioning.

Several preconditioning models suggest that the protective mechanism involve the inhibition of mPTP opening. The main objective of this work is to show that tachycardia preconditioning produces a delay in mPTP assembly and that ROS, through oxidative modifications of mitochondrial proteins, mediate this effect. To answer this question we evaluated the volume change induced by calcium overload in mitochondria isolated from control and tachycardia preconditioned hearts. The results showed that the change in volume is slower in mitochondria from animals subjected to tachycardia, indicating that the mPTP opening is delayed. Furthermore, we observed a decrease in two proteins necessary

to mPTP assembly, ANT and CypD. The decrease in the content of these two proteins could be responsible of the delay in mPTP assembly and the decrease in volume change. Besides, tachycardia preconditioning produced an increase in S-glutathionylation of mitochondrial proteins. S-glutathionylation is an oxidative post-transductional modification that could alter protein function.

According to the results obtained in this thesis, it is possible to conclude that mPTP has a role in the tachycardia preconditioning mechanism. The preconditioning protocol would delay the mPTP opening, which correlates with the diminishing of ANT and CypD proteins in mitochondria from hearts of preconditioned animals. Besides, ROS could be mediating this effect through protein S-glutathionylation.

1. INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica es, según la Organización Mundial de la Salud, la principal causa de muerte en el mundo. En Chile las últimas estadísticas son del año 2005 y ese año un 28,2 % de las muertes registradas fueron por enfermedades del sistema circulatorio, siendo la principal causa de muerte tanto en hombres (26,6 %) como en mujeres (30,0 %). Dentro de este grupo las muertes por infarto agudo del miocardio alcanzaron un 24,1 %, siendo superadas sólo por las enfermedades cerebrovasculares (31,6 %) (Estadísticas Vitales. Informe 2005, INE). Dada la gran incidencia de esta patología se torna imprescindible buscar mecanismos que ayuden a disminuir estas muertes por infartos.

1.1. Daño producido por Isquemia-Reperfusión.

Un infarto del corazón se produce cuando hay una oclusión de una arteria coronaria y, por lo tanto, hay una zona del miocardio que queda sin irrigación sanguínea. Esto produce un desbalance entre el aporte de oxígeno y nutrientes que llegan al corazón y las necesidades de éste, lo que se conoce como isquemia del miocardio. Con la reperfusión se reestablece el aporte de oxígeno y nutrientes disponibles para su consumo.

La reperfusión temprana y exitosa ya sea por el uso de terapias trombolíticas o por intervención coronaria es la estrategia más efectiva para reducir el área del miocardio infartada y para mejorar el resultado clínico. Sin embargo este proceso de restablecer el flujo de sangre por la arteria ocluida produce daño del miocardio, produciendo la muerte de cardiomiocitos que inmediatamente antes de la reperfusión eran viables (Yellon y Hausenloy, 2007).

Como se mencionó anteriormente en la isquemia hay disminución en el aporte de oxígeno y nutrientes al miocardio; esto provoca varias alteraciones en el cardiomiocito: aumenta el ión calcio intracelular, disminuye la síntesis de ATP y el metabolismo que era aeróbico se transforma en metabolismo anaeróbico generando una disminución en el pH

citoplasmático. Con el restablecimiento del flujo sanguíneo se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), aumenta la concentración de sodio y de ión calcio intracelular, las mitocondrias comienzan a recaptar el exceso de ión calcio citosólico y éste se acumula en la matriz mitocondrial (Otani, 2008). El rápido restablecimiento del pH intracelular junto con la producción de ROS, el aumento de fosfato inorgánico y la baja carga adenínica llevan a alteraciones metabólicas a nivel mitocondrial (apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, disipación del potencial de membrana mitocondrias y permeabilización de las mitocondrias) que desencadenan en muerte de cardiomiocitos tanto por necrosis como por apoptosis (Murphy y Steenbergen, 2008).

1.2. Precondicionamiento Cardíaco.

El término precondicionamiento se refiere a maniobras que realizadas antes de un periodo de isquemia prolongada provocan una disminución en el tamaño del infarto en relación al área de riesgo, que es el área del miocardio que era irrigada por la arteria ocluida.

1.2.1. Precondicionamiento Isquémico.

El precondicionamiento isquémico fue descrito por Murry en 1986 y consiste en producir breves períodos de isquemia seguidos de perfusión antes de una isquemia prolongada. Esta maniobra precondicionante provoca una disminución significativa en el tamaño del infarto (Murry y cols., 1986). También se han visto otros efectos del precondicionamiento isquémico que tienen un rol benéfico para el corazón, entre ellos la disminución del número de arritmias ventriculares (Hagar y cols., 1991) y la disminución del remodelamiento ventricular (Cohen y cols., 2000), el mejoramiento de la función vascular endotelial (Thourani y cols., 1999) y la reducción de la apoptosis (Nakamura y cols., 2000).

1.2.2. Precondicionamiento por Taquicardia.

Domenech y cols. describieron el precondicionamiento por taquicardia, que es una maniobra de precondicionamiento no isquémica. Este consiste en breves periodos de estimulación eléctrica al doble de la frecuencia cardíaca basal, seguidos de breves periodos de estimulación eléctrica a frecuencia basal realizados antes de una isquemia prolongada. Esta maniobra precondicionante provoca un aumento en el consumo de oxígeno en el miocardio y una disminución significativa en el tamaño del infarto (Domenech y cols., 1998).

En la isquemia, como se mencionó anteriormente, aumenta la concentración de ión calcio intracelular. El retículo sarcoplásmico contribuye a este aumento ya que aumenta la liberación de ión calcio desde el retículo y disminuye su velocidad de recaptación desde el citoplasma, por lo que se produce una sobrecarga de ión calcio citosólica. La taquicardia precondicionante previene estos efectos dañinos de la isquemia sobre el retículo sarcoplásmico (Domenech y cols., 2003).

Otra maniobra precondicionante no isquémica, descrita en el mismo laboratorio, y que produce una protección similar es el precondicionamiento por ejercicio. En este precondicionamiento se alternan periodos de ejercicio y reposo antes de la isquemia prolongada (Domenech y cols., 2002).

1.3. Mitocondrias.

La mitocondria es el organelo donde ocurre la mayor síntesis de ATP por la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa, motivo por el que tienen particular importancia en las células. En los cardiomiocitos las mitocondrias ocupan entre un 30 – 40 % del volumen celular (Murphy y Steenbergen, 2007).

Además las mitocondrias son la principal fuente de ROS intracelular y tienen la capacidad de almacenar ión calcio. Si bien niveles descontrolados de ROS y una sobrecarga de ión

calcio pueden ser tóxicos para las células, en niveles regulados tanto el ión calcio como los ROS son factores importantes en la transducción de señales (Murphy y Steenbergen, 2007).

1.3.1. Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial (mPTP).

El poro de transición de permeabilidad mitocondrial es un poro que se forma en la mitocondria y que conecta directamente la matriz mitocondrial con el citoplasma. Este poro es un megacanal inespecífico que deja pasar moléculas de hasta 1,5 kDa y al parecer está formado por tres proteínas, el canal aniónico sensible a potencial (VDAC) que es una proteína de la membrana externa de la mitocondria, el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) que es de membrana interna y la proteína de matriz mitocondrial ciclofilina D (CypD) (Murphy y Steenbergen, 2007). Como se aprecia en la **Figura 1**, se ha descrito que varias proteínas se pueden unir al mPTP formando un complejo multiproteico. Entre ellas se encuentra la hexoquinasa, la creatina quinasa mitocondrial y proteínas de la familia Bcl2 (Grimm y Brdiczka, 2007).

Se sabe que el mPTP se abre por sobrecarga de ión calcio mitocondrial, por estrés oxidativo, por aumento del pH y por aumento de magnesio. Aperturas transitorias de este poro tienen como objetivo liberar el exceso de ión calcio que se acumula en la matriz mitocondrial pero son las aperturas prolongadas las que provocan permeabilización de las mitocondrias y liberación de factores proapoptóticos. Se ha vinculado al mPTP en muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis (Grimm y Brdiczka, 2007).

Canal aniónico sensible a potencial (VDAC): Es la proteína de mayor abundancia en la membrana externa de la mitocondria. Posee un peso molecular de 36 kDa y puede existir en distintos estados conformacionales de diferente selectividad y permeabilidad. Como su nombre lo indica es sensible al potencial de la membrana pero no es selectivo a iones, y puede transportar nucleótidos de adenina, ión calcio, entre otros metabolitos (Murphy y Steenbergen, 2007). En este momento su importancia en la formación del poro está en discusión.

Transportador de Nucleótidos de Adenina (ANT): Es una proteína de la membrana interna de la mitocondria, tiene un peso molecular de 32 kDa. Su función es transportar ADP y ATP a través de la membrana interna mitocondrial (Armstrong, 2006), se une a CypD cuando se ensambla el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Woodfield y cols., 1998).

Ciclofilina D (CypD): Esta proteína tiene un peso molecular de 17 kDa, se encuentra en la matriz mitocondrial y posee actividad peptidilpropil cis-trans isomerasa. Se postula como una proteína clave en la formación del mPTP (Amstrong, 2006).

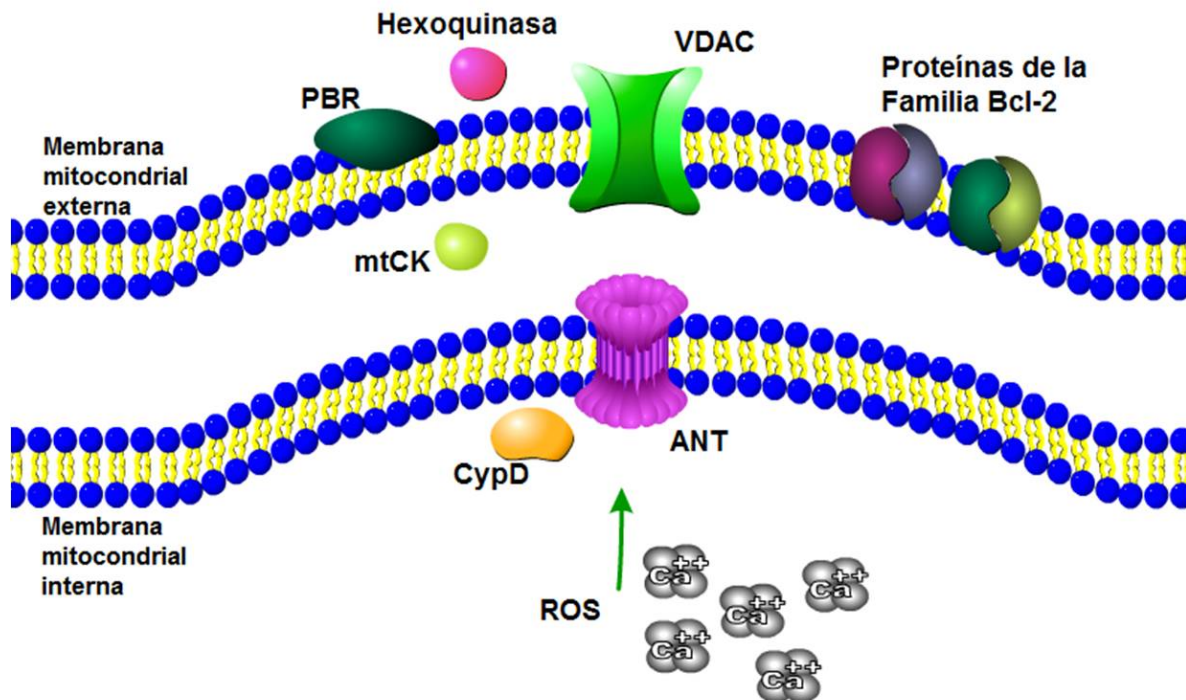


Figura 1: Esquema de la estructura potencial del mPTP. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) se formaría por el reclutamiento de las proteínas VDAC (membrana externa), ANT (membrana interna) y CypD (matriz mitocondrial). Aumentos de ión calcio y ROS inducen su apertura. Otras proteínas se pueden unir al mPTP, entre ellas se encuentra el receptor periférico de benzodiazepinas mitocondrial (PBR), la hexoquinasa, la creatina quinasa mitocondrial (mtCK) y proteínas de la familia Bcl-2.

1.4. Mecanismos Moleculares que median el Precondicionamiento Isquémico.

Los mecanismos moleculares que median el preconditionamiento no están del todo dilucidados. Se sabe que el preconditionamiento isquémico genera un aumento en los niveles de adenosina, bradiquininas y opioides los que se unen a sus receptores que están acoplados a proteína G, iniciando una cascada de transducción de señales que involucra a PI3K, Akt, GSK3 β y PKC entre otras moléculas. La activación de estas cascadas finalmente conduce a la activación del canal de potasio mitocondrial dependiente de ATP (mK_{ATP}) y a la inhibición de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Downey y cols., 2007).

Se postula que el preconditionamiento isquémico tiene distintos efectos benéficos para la mitocondria: disminuye la sobrecarga de ión calcio, disminuye el estrés oxidativo generado en la reperfusión, mantiene el potencial de membrana, mejora la función respiratoria, reduce la liberación de citocromo c y la apoptosis (Hausenloy y cols., 2004).

No hay datos que sustenten la participación del mPTP en el mecanismo de preconditionamiento por taquicardia.

1.4.1. Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial y Cardioprotección.

Se sabe que el mPTP permanece cerrado durante la isquemia y solo se abre en la reperfusión, momento en que se dan las condiciones óptimas para su apertura como aumento de ión calcio y de ROS (Griffiths y Halestrap, 1995).

Al usar inhibidores de la formación del mPTP, como ciclosporina A que se une a CypD y no permite que el mPTP se ensamble, se observa una mejoría en los parámetros hemodinámicos y una disminución en el tamaño del infarto en modelos de corazón aislado y perfundidos por el método de Langendorff (Halestrap y cols., 1997). Al usar un inhibidor de la actividad enzimática de CypD, Sangliferina A, también se obtiene una reducción en el tamaño del infarto (Hausenloy y cols., 2003). En este mismo modelo se ha demostrado que

el preconditionamiento isquémico retarda la apertura del mPTP durante la reperfusión (Javadov y cols., 2003), lo que se esquematiza en la **Figura 2**.

La evidencia más importante de la participación del mPTP en el daño por isquemia es que animales knock out para CypD, al ser sometidos a una isquemia prolongada tienen un tamaño de infarto similar a animales sometidos a preconditionamiento isquémico y en ellos no tienen efecto en la reducción del tamaño del infarto las maniobras cardioprotectoras (Lim y cols., 2007). Mitocondrias aisladas de estos ratones knock out para CypD son más resistentes al cambio de volumen inducido por ión calcio (Baines y cols., 2005)

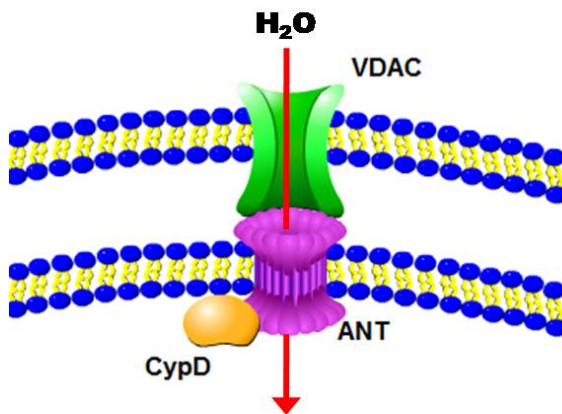
Por otro lado se ha demostrado que mitocondrias aisladas de animales sometidos a maniobras preconditionantes isquémicas tienen una mayor tolerancia a sobrecarga de ión calcio que mitocondrias de animales controles, los que solo fueron sometidos a una isquemia prolongada y luego a reperfusión. Esta mayor tolerancia a ión calcio indica que se está retardando la apertura o el ensamblaje del mPTP (Argaud y cols., 2005; Clarke y cols., 2008).

El mecanismo por el cual se retarda la apertura del mPTP no está claro, pero se propone que podría ser por regulación de los factores que influyen en su apertura como el nivel de ROS o la concentración de ión calcio mitocondrial, por modificación directa de las proteínas que lo forman o por una combinación de ambos (Hausenloy y cols., 2009).

A

Daño por Isquemia-Reperfusión

mPTP se abre durante la reperfusión → muerte celular



B

Protección por Precondicionamiento Isquémico

mPTP permanece cerrado durante la reperfusión → supervida celular

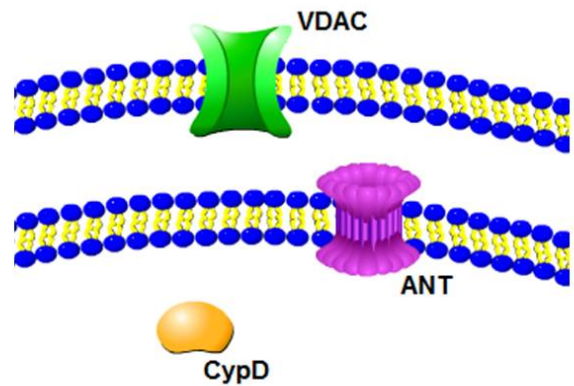


Figura 2: Precondicionamiento isquémico retarda la apertura del mPTP durante la reperfusión. A: Esquema de la apertura del mPTP durante la reperfusión lo que provoca la entrada de agua a la mitocondria y tiene como consecuencia la muerte celular. B: El mPTP permanece cerrado durante la reperfusión después de realizar maniobras de preconditionamiento isquémico, lo que protege de la muerte celular provocada por la reperfusión.

1.4.2. ROS y Cardioprotección.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son necesarias para que se desarrolle el mecanismo de cardioprotección (Hausenloy y cols., 2004). Está descrito que se puede inducir preconditionamiento cardíaco al someter al corazón, *in vitro*, a un bajo nivel de ROS y al usar antioxidantes en dosis elevadas se bloquea el efecto protector del preconditionamiento isquémico (Otani, 2008). En el mecanismo del preconditionamiento por taquicardia también es necesaria la generación de ROS ya que al usar apocinina, un inhibidor de la enzima NADPH oxidasa que produce ROS, se pierde el efecto cardioprotector en la disminución del tamaño del infarto (Sánchez y cols., 2008).

Con respecto a la mitocondria se sugiere que el efecto del preconditionamiento isquémico sería por atenuación del estrés oxidativo mitocondrial (Clarke y cols., 2008).

El óxido nítrico se ha descrito como un mediador importante en el fenómeno de preconditionamiento cardíaco, pero tampoco están claros los mecanismos moleculares que expliquen su participación (Jones y Bolli, 2006). El óxido nítrico puede nitrosilar proteínas y ésta modificación redox protege de otras modificaciones oxidativas. En preconditionamiento isquémico se tienen antecedentes de nitrosilación de proteínas relacionadas con el metabolismo mitocondrial, por lo que se ha propuesto que esta modificación redox podría explicar el rol del óxido nítrico en cardioprotección (Sun y cols., 2007).

1.4.3. S-glutationilación de proteínas.

La S-glutationilación de proteínas consiste en la unión covalente y reversible de un grupo glutationilo proveniente del glutatión (GSH), al grupo tiol de cisteínas. En su forma reducida el glutatión es el antioxidante que se encuentra en mayores concentraciones intracelulares (Hurd y cols., 2005).

El GSH mitocondrial es una forma importante de protección contra el daño oxidativo ya que puede reaccionar directamente con ROS o especies reactivas de nitrógeno (RNS) o también actuar como dador de electrones para enzimas antioxidantes (Hurd y cols., 2005).

Se ha propuesto que la *S*-glutathionilación es un mecanismo que protege a los grupos tioles de las proteínas de oxidaciones irreversibles, pero podría ser también un mecanismo de modificación post-traducciona que permita modificar la función o actividad de una proteína (Aracena y cols., 2003; Sánchez y cols., 2005). Datos de nuestro laboratorio muestran que en el caso del preconditionamiento por taquicardia, antes del periodo de isquemia prolongada, aumenta la *S*-glutathionilación del canal de calcio/receptor de ryanodina tipo 2, lo que modifica su actividad (Sánchez y cols., 2005). La inhibición de la enzima NADPH oxidasa produce una disminución de la *S*-glutathionilación del receptor de ryanodina tipo 2 (Sánchez y cols., 2008).

No hay evidencias de *S*-glutathionilación de las proteínas que forman el mPTP, pero dado su papel central en el preconditionamiento isquémico es importante investigar si esta modificación ocurre en el preconditionamiento por taquicardia y como se relaciona el cambio de actividad del mPTP con la generación de ROS.

1.5. HIPÓTESIS

Dados los antecedentes señalados se plantea la siguiente hipótesis:

El preconditionamiento por taquicardia provoca un retardo en el ensamblaje del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) median este efecto.

1.6. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el preconditionamiento por taquicardia provoca un retardo en el ensamblaje del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y que las especies reactivas de oxígeno (ROS) median este efecto.

1.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar en mitocondrias aisladas de corazones de animales controles y preconditionados por taquicardia:

- El contenido relativo de las proteínas que se ensamblan para formar el mPTP
- El cambio de volumen mitocondrial producido por la apertura del mPTP ante una sobrecarga de ión calcio.

Estudiar en mitocondrias aisladas de corazones de animales controles:

- Efecto de agentes redox, como DTT y H₂O₂, sobre la actividad del mPTP ante una sobrecarga de ión calcio.
- S-glutationilación de cisteínas de la proteína ANT.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos.

Affinity Bioreagents INC (ABR) Golden, CO, USA: anticuerpo anti-RyR (N° Cat.MA3-916)

AppliChem, Darmstadt, Alemania: Tritón X-100

Biological Industries, Kibbut Beit Haemek, Israel: reactivo de quimioluminiscencia EZ-ECL

BIO-RAD, Hercules, CA, USA: Acrilamida, N,N´Metilen-bis-acrilamida, azul de coomasie brillante R-250.

Calbiochem, Darmstadt, Alemania: Ditioneitol (DTT), anticuerpo anti-CypD (N° Cat. AP1035)

Fermentas, Burlington, Otario, Canadá: Marcador de peso molecular (N° Cat. SM0671)

Kodak, SJ Campos, Brasil: Revelador, Fijador

MERCK, Darmstadt, Alemania: NaCl, H₂O₂, HCl, Ácido acético, Sacarosa, Persulfato de Amonio, NaOH, KOH, metanol, etanol, glicina.

Promega, Madison, WI, USA: Tris-base, Urea.

Roche, Mannheim, Alemania: tabletas de inhibidores de proteasas COMPLETE

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA: anticuerpo anti-VDAC1 (N° Cat. sc-32064), anticuerpo anti-ANT (N° Cat. sc-9299), anticuerpo secundario anti-ratón (N° Cat. sc-2005), anticuerpo secundario anti-cabra (N° Cat. sc-2020), proteína A/G PLUS agarosa (N° Cat. sc-2003)

Sigma, St Louis, MO, USA: Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) , N-Etilmaleimida (NEM), 2-

Mercaptoetanol, Ácido etilenglicol-bis-(2-amino-etileter)- N, N, N', N'- tetra acético (EGTA), Ácido etilendiamintetraacético (EDTA), Tris-HCl, Albúmina sérica de bovino (BSA), Bis-Tris propano, dodecil sulfato de sodio (SDS).

Thermo Scientific, Rockford, IL, USA: Clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetil-amino-propil) carbodiimida (EDC), Films CL-XPosure™.

US Biological, Swampscott, MA, USA: Tricina.

Virogen, Watertown, MA, USA: anticuerpo anti-GSH (N° Cat.101-A-100)

Whatman, Dassel, Alemania: Membranas de PVDF tamaño de poro 0,2 µm.

Winkler, Santiago, Chile: Tween-20

2.2. Diseño Experimental.

Se utilizó el mismo protocolo experimental con el cual se demostró el efecto preconditionante de la taquicardia (Domenech y cols., 1998). Todos los experimentos de este trabajo fueron realizados en perros adultos de ambos sexos, entre 20 y 32 Kg de peso con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que se rige por la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicado por el Instituto Norteamericano de Salud (NIH). En 16 perros anestesiados se produjo un bloqueo de la conducción aurículo-ventricular por inyección de formaldehído bajo el septum intraventricular. La frecuencia cardíaca fue controlada con un estimulador eléctrico a través de electrodos implantados en el ventrículo derecho. Se implantó catéteres Sylastic en la raíz de la aorta y vena coronaria, un medidor de flujo y un lazo en la arteria coronaria descendente anterior alejada de la rama de la primera diagonal. Se instaló un sistema de “damping”, para evitar cambios bruscos en la presión de la aorta durante el experimento. Este consiste en un reservorio lleno con sangre termorregulada con agitación constante conectado al sistema circulatorio a través de un catéter en la arteria femoral y colocado a una altura que permita mantener una presión de 90 mm Hg en la raíz de la aorta (Domenech y cols., 1998).

C: grupo control (n = 10), el corazón fue extraído después de 70 min de anestesia en animales mantenidos a frecuencia cardíaca de 120 c/min.

T: grupo sometido a taquicardia (n = 6), el corazón fue extraído después de 5 períodos de taquicardia (210 c/min) de 5 minutos de duración, con interrupciones de 5 min de frecuencia basal (120 c/min).

De los corazones extraídos se aisló la pared del ventrículo izquierdo y se prepararon mitocondrias y se guardaron a -80°C .

Los animales utilizados en este trabajo corresponden a animales que son parte de un proyecto de preconditionamiento por taquicardia a los que se les controlan las variables hemodinámicas continuamente.

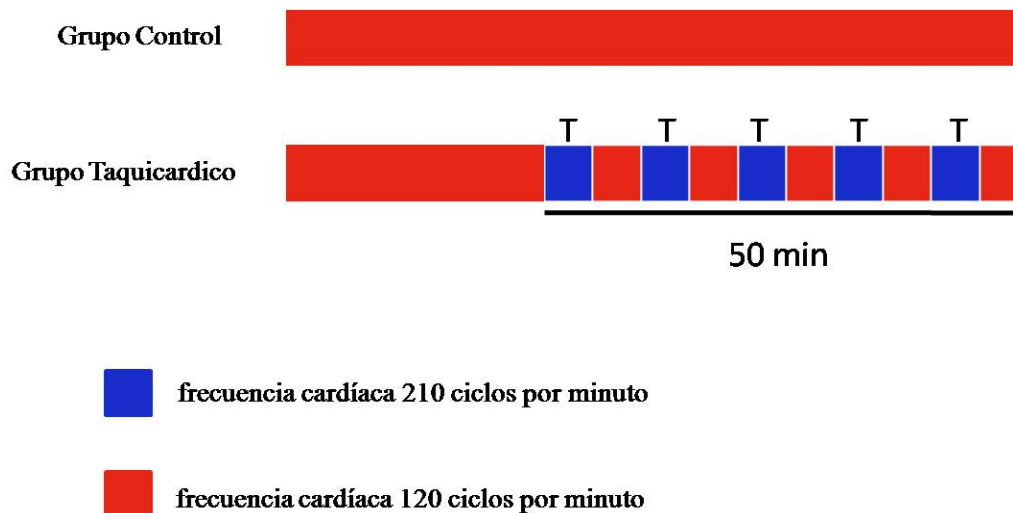


Figura 3: Protocolo de Taquicardia precondicionante. Esquema del desarrollo experimental del precondicionamiento por taquicardia, el grupo control se mantiene estimulado a frecuencia cardíaca basal (120 ciclos por minuto) y el grupo precondicionado por taquicardia es estimulado con cinco períodos de frecuencia cardíaca alta (210 ciclos por minuto) con intervalos de estimulación a frecuencia cardíaca basal.

2.3. Obtención de mitocondrias por centrifugación diferencial.

Las mitocondrias fueron aisladas de la pared del ventrículo izquierdo de los corazones de los distintos grupos experimentales. Se siguió el protocolo descrito por Carreira y cols. con algunas modificaciones (Carreira y cols., 2008).

Se pesó el ventrículo y se le agregó 3 veces el peso (gr) en volumen (mL) de un tampón A (sacarosa 300 mM, K-EGTA 500 mM, BSA 0,2 %, K-HEPES 10 mM, pH 7,4). Se homogenizó con un ultraturrax (Heidolph DIAX 600, 3 ciclos de 20500 rpm por 20 segundos con intervalos de 10 segundos), y este homogenizado se centrifugó 7 min a 600 x g a 4°C (en centrífuga BECKMAN modelo J2-HS con rotor JA20), se eliminó la pella y el sobrenadante se filtró por una gasa, luego se centrifugó 7 min a 12000 x g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pella se resuspendió en tampón B (Sacarosa 300 mM, K-EGTA 10 µM, K-HEPES 10 mM pH 7,4) y se centrifugó por 7 min a 12000 x g a 4 °C. Se

descartó el sobrenadante y la pella se resuspendió en tampón C (Sacarosa 300 mM, Na-EDTA 20 μ M, K-HEPES 10 mM pH 7,4), se repartió en alícuotas de 0,1 mL las que se guardaron a -80 °C. Todos los procedimientos se realizaron a 4 °C. Un esquema de esta preparación se muestra en la **Figura 4**.

2.4. Medición de proteínas.

La medición de proteínas se realizó por el método de Hartree (Hartree, 1972).

2.5. “Western blot”.

Las muestras fueron diluidas a una concentración de 1 mg/mL de proteínas con un tampón de carga no reductor con NEM 10 mM. En el caso de las electroforesis en condiciones reductoras se agregó DTT 200 mM.

Tampón de carga 2x: glicerol (87%) 17,4%, Tris Base 335 mM, SDS 4%; EDTA 1 mM a pH 8,0, Urea 8 M, Azul de bromofenol 0,02 % ajustado a pH 8,5 con HCl. Se agregó NEM 20 mM para condiciones no reductoras y DTT 400 mM para condiciones reductoras.

Las proteínas CypD, ANT y VDAC fueron separadas en geles Tris-acetato con un 15 % de poliacrilamida. Para HSP70 mitocondrial y SERCA se usó 7 % de poliacrilamida y para RyR se usó geles en gradiente entre 3,5 – 8 % de poliacrilamida. La electroforesis se corrió con un tampón de corrida Tris-Tricina (Tris-base 50 mM, Tricina 50 mM, SDS 0,1 %, pH 8,2), a voltaje constante de 80 voltios por 60 min para luego subir a 120 voltios hasta que la marca de 17 kDa del estándar se encontrara a 1 cm del borde del gel.

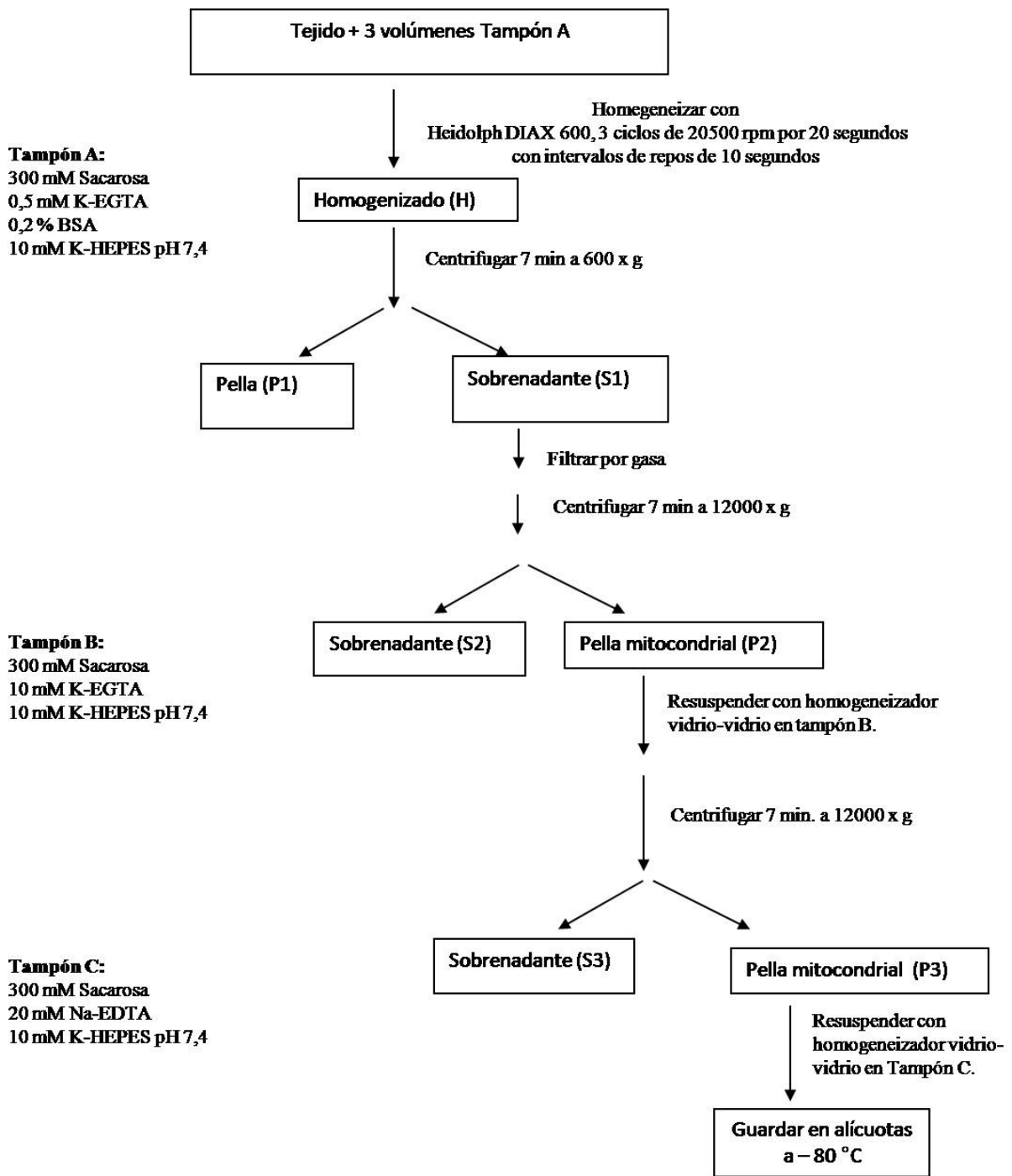


Figura 4: Esquema de la preparación de mitocondrias. Se muestra un esquema de la centrifugación diferencial para la obtención de mitocondrias desde el tejido cardíaco.

Tabla 1: Protocolo para dos geles Tris-acetato 7 % y 15 % de poliacrilamida.

Reactivos	Gel separador 7 %	Gel separador 15 %	Gel concentrador
Tampón 4x Tris-acetato (mL)	2,5	2,643	0,625
Acrilamida/ Bisacrilamida 30 % (mL)	2,333	5,285	0,375
Glicerol 87 % (mL)	2,3	1,427	0,375
Agua (mL)	2,821	1,155	1,105
TEMED (μ L)	8	10	2,5
Persulfato de Amonio 10 % (μ L)	38	50	20

Tabla 2: Protocolo para dos geles en gradiente Tris-acetato 3,5 - 8 % de poliacrilamida.

Reactivos	Gel separador 8 %	Gel separador 3,5 %	Gel concentrador
Tampón 4x Tris-acetato (mL)	1,25	1,25	0,625
Acrilamida/ Bisacrilamida 30 % (mL)	1,33	0,58	0,375
Glicerol 87 % (mL)	1,15	0,28	0,375
Agua (mL)	1,26	2,8	1,105

TEMED (μL)	3,8	3,8	2,5
Persulfato de Amonio 10 % (μL)	*	*	20

* Se repartieron 2,3 mL de cada solución en tubos aparte y se agregó persulfato de amonio 10 %

Tubo 3,5 %: 15 μL persulfato de amonio 10 %

Tubo 8 %: 30 μL persulfato de amonio 10 %

Posteriormente se mezclaron en un sistema lineal de formación de gradiente.

Tampón Tris-Acetato: Tris-base 0,5 M, ajustado a pH 7,0 con ácido acético 2,5 %.

Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF, con un tampón Tris-Tricina (Tricina 12,5 mM, Bis-Tris Propano 12,5 mM, EDTA 1 mM, queda a pH 8.0), con 10 % de Metanol. La electrotransferencia se realizó a 100 voltios por 45 min. en un baño con hielo. Para los “Western blot” de RyR la electrotransferencia se realizó a amperaje constante (350 miliamperios) por 2 horas.

Las membranas fueron bloqueadas por una hora a temperatura ambiente en agitación constante, con un tampón (TBS, Tris-base 20 mM, NaCl 140 mM pH 7,6) con un 5 % p/v de leche descremada y con 0,2 % Tween 20.

Posteriormente fueron incubadas con los distintos anticuerpos primarios por toda la noche a 4 °C y una hora a temperatura ambiente en agitación, se lavó con TBS-Tween 20 0,2 % por 15, 10 y 5 min a temperatura ambiente en agitación. En los “Western blot” para GSH las membranas fueron bloqueadas por toda la noche a 4 °C con una solución de BSA al 5 % p/v en TBS-Tween 20 0,2 % y el anticuerpo primario fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra según corresponda) durante 1 hora a

temperatura ambiente en agitación constante y se repitieron los lavados con TBS-Tween 20 0,2 %. Se reveló con reactivo de luminiscencia EZ-ECL.

La dilución de los anticuerpos primarios fue la siguiente: Anti-ANT (dilución 1:6000), Anti-VDAC (1:2000), Anti-CypD (1: 24000), Anti-GSH (1: 160000), Anti-HSP70 mitocondrial (1: 6000), Anti-SERCA2ATPasa (1: 300000, N° Cat. MA3-99), Anti-RyR (1:6000).

Se utilizaron distintos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa: Anti-IgG de cabra (N° Cat. sc-2020), Anti-IgG de ratón (N° Cat. sc-2005). Las bandas fueron detectadas por quimioluminiscencia y analizadas con el software Molecular Analyst versión 1.3 (Bio Rad, Hercules CA).

El resultado de la cuantificación de los animales taquicárdicos fue normalizado por el de los controles.

2.5.1. Teñido de membranas.

Las membranas electrotransferidas fueron teñidas con una solución de azul de Coomassie brillante R250 0,01 %, metanol 50 % y ácido acético 10 %, las membranas fueron incubadas en esta solución por 5 min a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente fueron desteñidas con una solución de metanol al 50 % y secadas a temperatura ambiente.

2.5.2. Deshibridización de membranas.

Las membranas fueron deshibridizadas incubando por 30 min a 50 °C agitando de vez en cuando en una solución de 2-mercaptoetanol 100 mM, Tris-HCl pH 6,7 62,5 mM y SDS 2 %, . Posteriormente fueron lavadas con TBS-Tween 20 0,2 % hasta sacar todo el 2-mercaptoetanol remanente, posteriormente fueron bloqueadas para continuar con la incubación con anticuerpos.

2.6. Cambio de Volumen Mitocondrial.

Se siguió el protocolo descrito por Kruglov y cols. (Kruglov y cols., 2007) con algunas modificaciones; en un espectrofotómetro, con agitación, a 37°C se colocó una cubeta con 1 mL de medio compuesto por: NaCl 125 mM, HEPES 10 mM, NaH₂PO₄ 2 mM pH 7,4; y se agregó 75 µg de proteínas (preincubadas por 1 min a 37°C). Se registró la dispersión de luz a 520 nm, por 300 segundos. A los 120 segundos se agregó 10 µL de CaCl₂ 100 mM. Esta concentración de ión calcio indujo la apertura del mPTP y por lo tanto una disminución de la dispersión de luz. Para verificar que el cambio de dispersión de luz correspondía a la apertura del mPTP se agregó 1 µL de ciclosporina A (CsA) 10 mM al inicio del registro, quedando una concentración de 10 µM en el medio de reacción.

En los experimentos con DTT o H₂O₂ se agregó 20 µL de DTT 1 M ó 10 µL de H₂O₂ 200 mM, al inicio del registro. Se registró el cambio de la dispersión de luz en el tiempo y esta curva se ajustó a una curva de decaimiento y se cuantificó la constante de velocidad ya que ésta es un índice de que tan rápido o lento es el cambio de volumen mitocondrial.

Las mitocondrias al aumentar de volumen son menos densas y esto provoca una disminución en la dispersión de la luz.

2.7. Inmunoprecipitación.

Se centrifugó 50 µL de proteína A/G durante 1 min a 14000 x g, se descartó el sobrenadante y la pella se ambientó con 50 µL de tampón de inmunoprecipitación (MOPS-Tris 100 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM ajustado a pH 8,0; Tritón X-100 al 1 %, Inhibidor de proteasas Complete 4 mg/mL, pH 7,0). Este procedimiento se repitió por 3 veces centrifugando 1 min a 14000 x g cada vez, descartando los sobrenadantes. La pella se resuspendió en 25 µL de tampón de inmunoprecipitación, se agregó 0,1µg del anticuerpo anti-GSH en 450 µL de tampón de inmunoprecipitación y se incubó por 1 hora en agitación

a temperatura ambiente, se centrifugó 1 min a 14000 x g, se descartó el sobrenadante y la pella se lavó con 50 μ L de tampón de inmunoprecipitación 3 veces centrifugando 1 min a 14000 x g cada vez descartando los sobrenadantes, se agregaron 20 μ L de tampón de inmunoprecipitación mas 5 μ L del reactivo entrecruzador clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetil-amino-propil) carbodiimida (EDC) 20 mM (quedando el EDC a una concentración final de 2 mM) y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en agitación, se centrifugó 1 min a 14000 x g, se descartó el sobrenadante y la pella se lavó con 50 μ L de tampón de inmunoprecipitación centrifugando 1 min a 14000 x g cada vez descartando los sobrenadantes, la pella se resuspendió en 25 μ L de tampón de inmunoprecipitación. Se preparó 1 mL de muestra de concentración 0,5 μ g/ μ L, y se incubaron con los 50 μ L de proteína A/G preparados anteriormente durante toda la noche, en agitación a 4 °C. Se centrifugó a 14000 x g por 1 min y se guardó el sobrenadante para cargarlo en el gel, la pella se lavó 2 veces con 50 μ L de tampón de inmunoprecipitación centrifugando 1 min a 14000 x g cada vez, descartando los sobrenadantes mientras que la pella se incubó con 40 μ L de tampón de inmunoprecipitación más 40 μ L de tampón de carga 2x no reductor, hirviéndose por 3 min, luego se enfrió en hielo, se centrifugó 1 min a 14000 x g y el sobrenadante se cargó en el gel para realizar posteriormente el Western blot.

2.8. Medición de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

La medición de GSH y de GSSG se realizó por el método de Griffith (Griffith, 1980), con algunas modificaciones. Es un método cinético que utiliza glutatión reductasa, 2-vinilpiridina y DTNB, y permite medir el glutatión total y el oxidado. El glutatión reducido se calcula por diferencia entre estos. Se mide el cambio de absorbancia a 412 nm, el cual es proporcional a la concentración de glutatión reducido, y se debe a la reacción entre DTNB y glutatión.

2.9. Análisis Estadístico.

Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm error estándar. Las concentraciones de glutatión y el contenido relativo de las proteínas realizadas por “Western blot” entre controles y taquicárdicos fueron analizados por un t-test no pareado. En los gráficos de cambio de volumen mitocondrial se realizó un test ANOVA para ver diferencias entre las distintas condiciones. La hipótesis de nulidad fue descartada con un $P < 0.05$

3. RESULTADOS

3.1. Preparación de una fracción enriquecida en mitocondrias.

La fracción de mitocondrias de animales controles preparada según lo descrito en materiales y metodos, está muy enriquecida en proteínas mitocondriales (HSP70, ANT y CypD) y no presenta trazas de proteínas que son típicas de retículo sarcoplásmico (RyR2 y SERCA 2a)

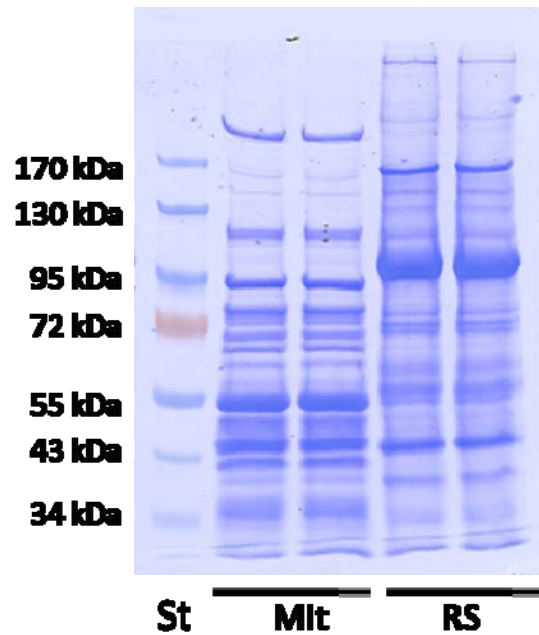
La **Figura 5A** muestra los patrones electroforéticos de esta preparación de mitocondrias (Mit) y de una preparación de retículo sarcoplasmático (RS) en una membrana de PVDF. Como se puede observar los patrones electroforéticos son muy distintos en las dos preparaciones. La **Figura 5B** muestra los Western blots en condiciones reductoras para las proteínas mitocondriales HSP70, ANT y CypD y para las proteínas de retículo sarcoplásmico RyR2 y SERCA 2a. Como se puede observar no hay detección de proteínas de RS en la fracción mitocondrial ni viceversa.

3.2. Contenido relativo de las proteínas CypD, ANT y VDAC en corazones de animales sometidos a taquicardia y animales controles.

Se determinó el efecto de la taquicardia sobre el contenido relativo de las proteínas mitocondriales que se han propuesto como componentes estructurales del mPTP: CypD, ANT y VDAC.

La **Figura 6A** muestra “Western blots” en condiciones reductoras, los que son representativos para las proteínas CypD, ANT y VDAC. La **Figura 6B** muestra la cuantificación de los Western blots. Las proteínas CypD y ANT están disminuidas significativamente en las muestras de animales taquicárdicos con respecto a los controles, CypD disminuye en un 29 %, mientras que ANT en un 19 %. El contenido relativo de la proteína VDAC no muestra diferencias entre controles y taquicárdicos.

A



B

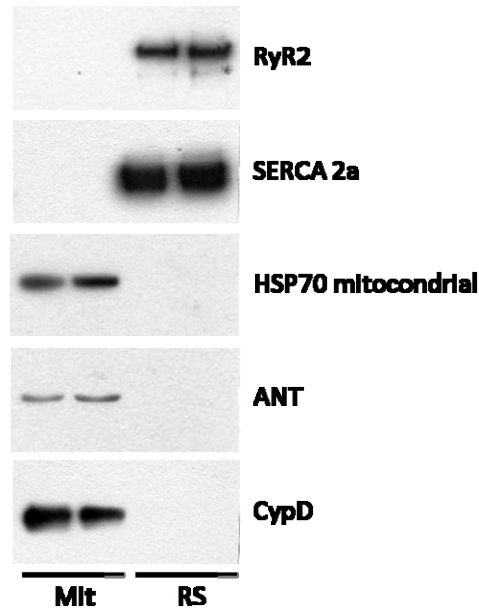


Figura 5: Perfil electroforético y “Western blot” de las proteínas de la fracción mitocondrial.

A: Membrana de PVDF teñida con azul de Coomassie después de haber sido incubada con los anticuerpos, se muestra el patrón electroforético de una preparación de mitocondrias (Mit) y de una enriquecida en retículo sarcoplásmico (RS) por duplicado. En el primer carril se muestra el estándar de peso molecular (St). **B:** “Western blot” en condiciones reductoras con anticuerpos anti-RyR2, anti-SERCA 2a, anti-HSP70 mitocondrial, anti-ANT y anti-CypD.

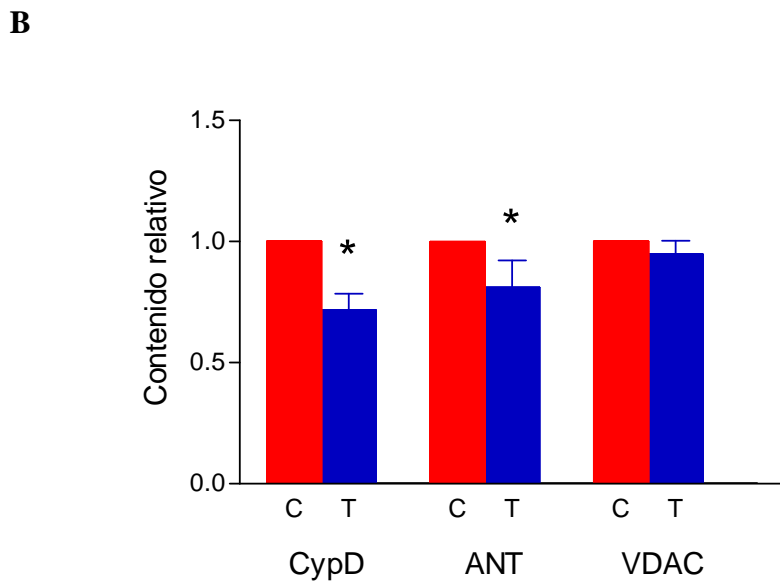
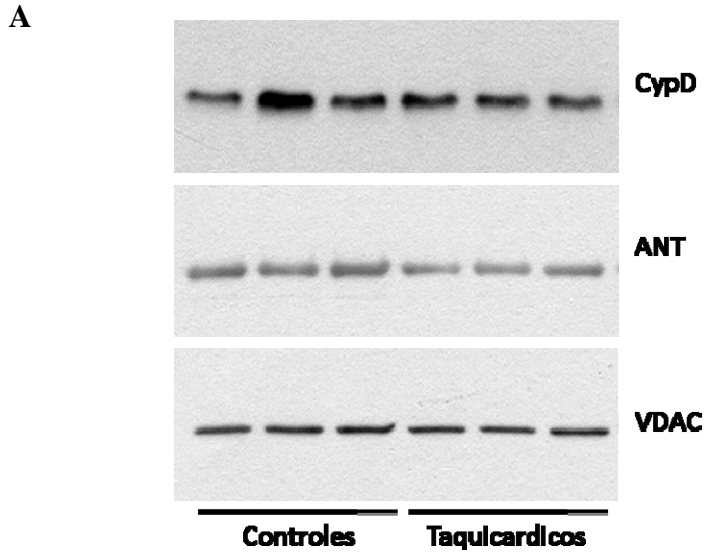


Figura 6: Contenido relativo de las proteínas CypD, ANT y VDAC.

A: Western blots representativos para las proteínas CypD, ANT y VDAC de preparaciones mitocondriales de animales controles y sometidos a taquicardia. Se muestran tres muestras de animales controles y tres de taquicárdicos. **B:** Cuantificación de los Western blots. Contenido relativo promedio de las densitometrías para CypD, ANT y VDAC normalizado por los controles de 7 animales controles y 4 taquicárdicos. * $P < 0.05$ C v/s T, t-test.

3.3. Cambio de volumen mitocondrial inducido por ión calcio.

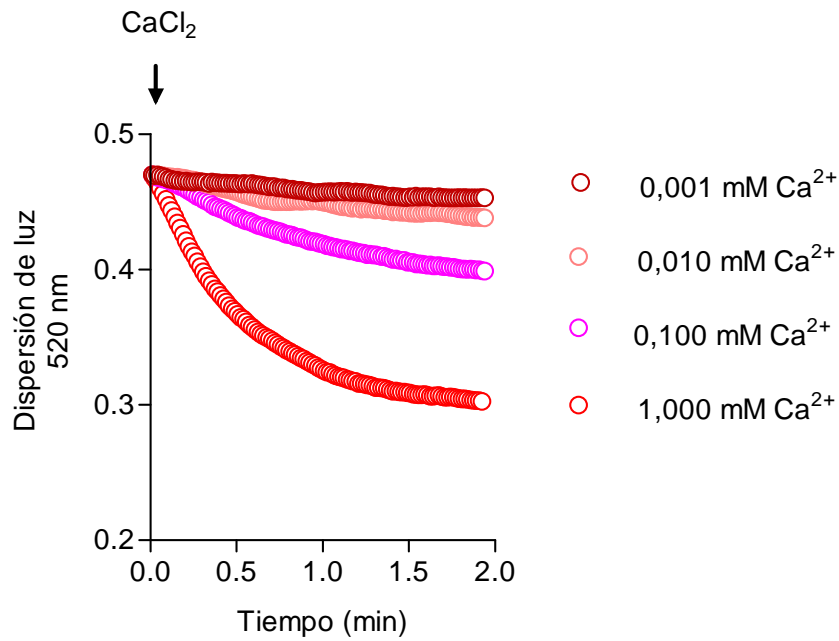
Para determinar la velocidad de apertura del mPTP, se determinó el cambio de volumen de mitocondrias de animales controles al agregar distintas concentraciones de ión calcio (0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM y 1 mM CaCl₂) midiendo la dispersión de la luz a 520 nm.

El curso temporal de la dispersión de luz en respuesta a la adición de CaCl₂ es un índice del cambio de volumen ya que tras la entrada del ión calcio se abre el mPTP con la consecuente entrada de agua a la mitocondria y aumento en su volumen lo que lleva a una disminución en la dispersión de luz.

En la **Figura 7A** se muestran curvas representativas de los cursos temporales de la disminución de la dispersión de luz tras agregar distintas concentraciones de cloruro de calcio a una suspensión de mitocondrias. En estos experimentos la dispersión de luz disminuye con una cinética que se ajusta a una función exponencial del tipo $A = A_0 e^{-kt} + B$ donde A corresponde a la dispersión de la luz a un tiempo dado, A₀ es el valor inicial, k es la constante de velocidad, t el tiempo y B es el plateau de la función. La constante de velocidad es una medida de que tan rápida es la disminución de dispersión de luz en el tiempo.

Las constantes de velocidad, k, del cambio de volumen mitocondrial en respuesta a la concentración de cloruro de calcio agregada se observan en la **Figura 7B**. De acuerdo a estos resultados se utilizó 1 mM de CaCl₂ para los siguientes experimentos ya que a esta concentración se produce un cambio de volumen adecuado para su cuantificación.

A



B

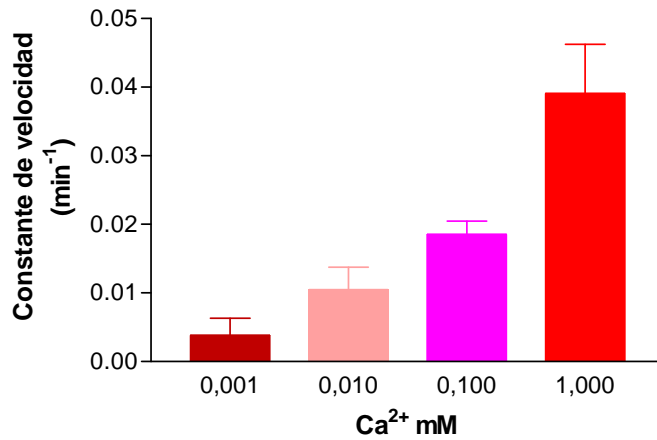


Figura 7: Cambio de volumen mitocondrial inducido por ión calcio.

A: Curvas representativas de los cursos temporales de la dispersión de la luz a 520 nm en el tiempo después de agregar distintas concentraciones de CaCl₂. **B:** Promedio de la constante de velocidad del cambio de volumen mitocondrial a las distintas concentraciones de cloruro de calcio. n = 3.

3.3.1. Cambio de volumen mitocondrial por sobrecarga de ión calcio en mitocondrias de animales controles y taquicárdicos.

El cambio de volumen mitocondrial inducido por cloruro de calcio (1 mM) en muestras provenientes de animales controles y sometidos a taquicardia se midió en presencia y ausencia del inhibidor de la formación del mPTP, Ciclosporina A (CsA), que se une a Ciclofilina D impidiendo el reclutamiento del resto de las proteínas necesarias para formarlo.

Como muestra la **Figura 8A** al agregar el cloruro de calcio al medio, en el caso de las mitocondrias de animales controles, se produjo una rápida caída en la dispersión de luz mientras que en las mitocondrias de animales taquicárdicos este cambio fue mas lento, como se aprecia en la **Figura 8B**. La cuantificación de estos resultados muestra que la constante de velocidad del cambio de volumen mitocondrial es 3 veces menor en animales sometidos a taquicardia que en controles (**Figura 8C**).

La adición de ciclosporina A (CsA) inhibió el cambio de volumen tanto en mitocondrias de animales controles como en las de animales sometidos a taquicardia. Como se observa en la **Figura 8C**, la constante de velocidad del cambio de volumen no muestra diferencias significativas entre los dos grupos tratados con CsA. En tanto que al comparar el grupo control con el grupo control tratado con CsA si se observan diferencias significativas, lo que no ocurre al comparar el grupo taquicárdico con el grupo taquicárdico tratado con CsA (**Figura 8C**). Estos resultados obtenidos en presencia de CsA comprueban que, efectivamente, el cambio de volumen mitocondrial se debe a la apertura del mPTP y que este disminuye significativamente en los animales sometidos a taquicardia. (**Figura 8C**).

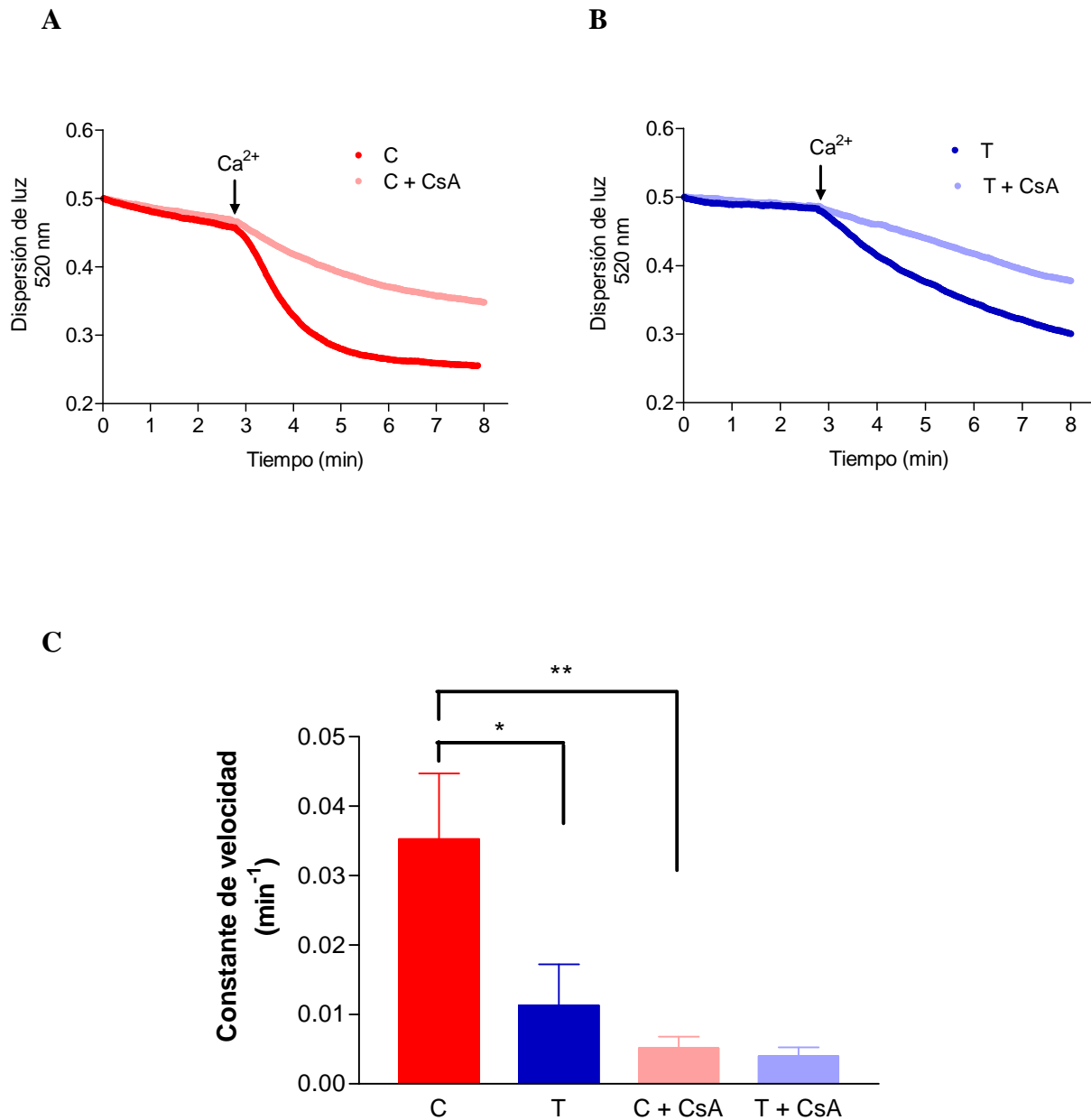


Figura 8: Cambio de volumen mitocondrial por sobrecarga de ión calcio en mitocondrias de animales controles y taquicárdicos.

A y B: Registro representativo del cambio de volumen mitocondrial, se muestran los cursos temporales de la dispersión de luz a 520 nm, en ausencia (línea oscura) y presencia (línea pálida) de Ciclosporina A (CsA) en mitocondria de animales controles (**A**) y de animales taquicárdicos (**B**). **C:** Promedio de la constante de velocidad del cambio de volumen mitocondrial inducido por sobrecarga de ión calcio, en controles (C) y en taquicárdicos (T). Controles n = 5, Taquicárdicos n = 4. * P < 0.05 C v/s T, ** P < 0.01 C v/s C + CsA, test ANOVA - Newman-Kleus.

3.3.2. Cambio de volumen mitocondrial en condiciones reductoras y oxidantes.

Para estudiar el efecto redox en el cambio de volumen por sobrecarga de ión calcio las mitocondria de animales controles se trataron en distintas condiciones; en condiciones nativas, incubadas con DTT (un agente reductor) o con H_2O_2 (un agente oxidante).

Cuando las mitocondrias son sometidas a sobrecarga de ión calcio (1 mM $CaCl_2$) en un ambiente reductor el cambio en la dispersión de luz es mucho más lento que cuando están en un ambiente oxidante, como se ve en la **Figura 9A**.

Al cuantificar la constante de velocidad del cambio de volumen mitocondrial, como se aprecia en la **Figura 9B** se encontró que en condiciones reductoras es menor que en condiciones nativas y en presencia de H_2O_2 el valor de esta constante aumenta, sin embargo estos cambios no son estadísticamente significativos, la diferencia significativa sólo se aprecia entre la condición con DTT y H_2O_2 . La ausencia de cambios significativos en los otros casos se puede explicar por la alta dispersión de los datos, por lo que para confirmar si hay diferencias reales en el valor de la constante de velocidad entre la condición nativa y las condiciones oxidante o reductora es necesario aumentar el número de experimentos.

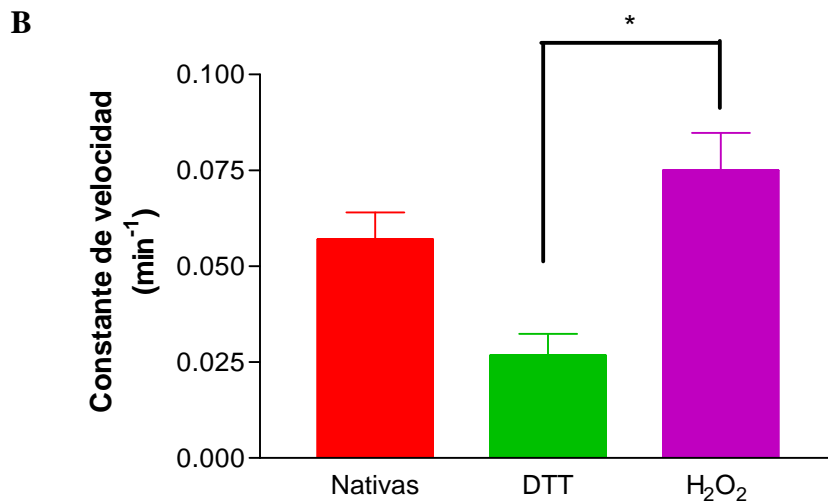
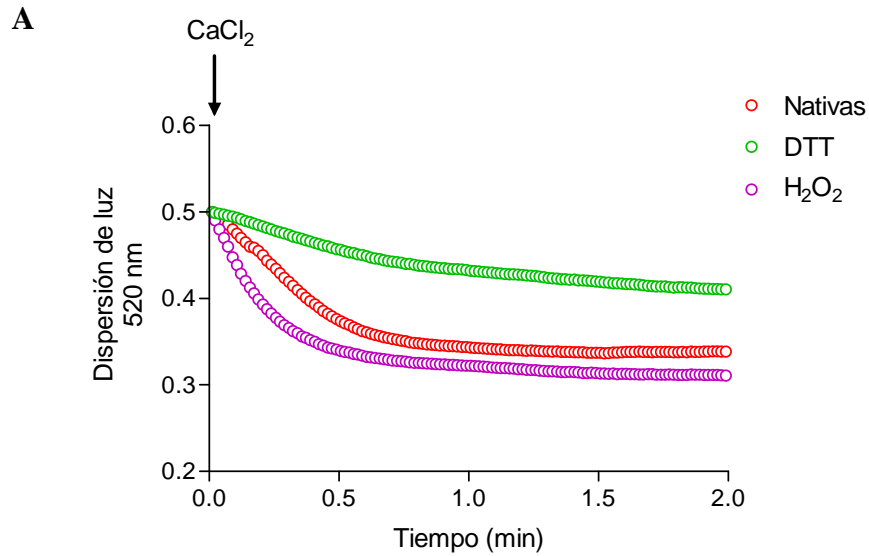


Figura 9: Cambio de volumen mitocondrial en condiciones reductoras y oxidantes.

A: Registro representativo del cambio de volumen mitocondrial por sobrecarga de ión calcio (registro de dispersión de luz a 520 nm) de mitocondrias controles en condiciones nativas, preincubadas con ditionitrosol (DTT) o con peróxido de hidrogeno (H₂O₂)

B: Promedio de la constante de velocidad del cambio de volumen mitocondrial inducido por sobrecarga de ión calcio, en mitocondrias nativas, pretratadas con DTT o con H₂O₂. n = 3. * P < 0.05 DTT v/s H₂O₂ test ANOVA - Tukey.

3.4. Modificación redox de proteínas mitocondriales.

El acondicionamiento por taquicardia aumenta en general la *S*-glutacionilación de proteínas mitocondriales, como se aprecia en la **Figura 10B**, que muestra un “Western blot” en condiciones no reductoras con anticuerpo anti-GSH. Los carriles correspondientes a las muestras provenientes de animales sometidos a taquicardia presentan más inmunoreacción frente al anticuerpo que las de animales controles. Para asegurarse que se están comparando cantidades equivalentes de proteínas se muestra una membrana de PVDF teñida con azul de Coomassie (**Figura 10A**) en la que no se aprecian diferencias en la carga de proteínas. En la **Figura 10C** y **10D** se muestran los gráficos correspondientes a la cuantificación de las bandas de 32 y 20 kDa respectivamente (flechas rojas en la **Figura 10B**). Se eligieron estas bandas ya que corresponden a los pesos moleculares en donde aparecen las proteínas ANT y CypD, sin embargo en este estudio no se puede descartar que en estas bandas migre más de una proteína y que éstas también se puedan *S*-glutacionilar. El acondicionamiento por taquicardia aumenta significativamente la *S*-glutacionilación de estas dos bandas.

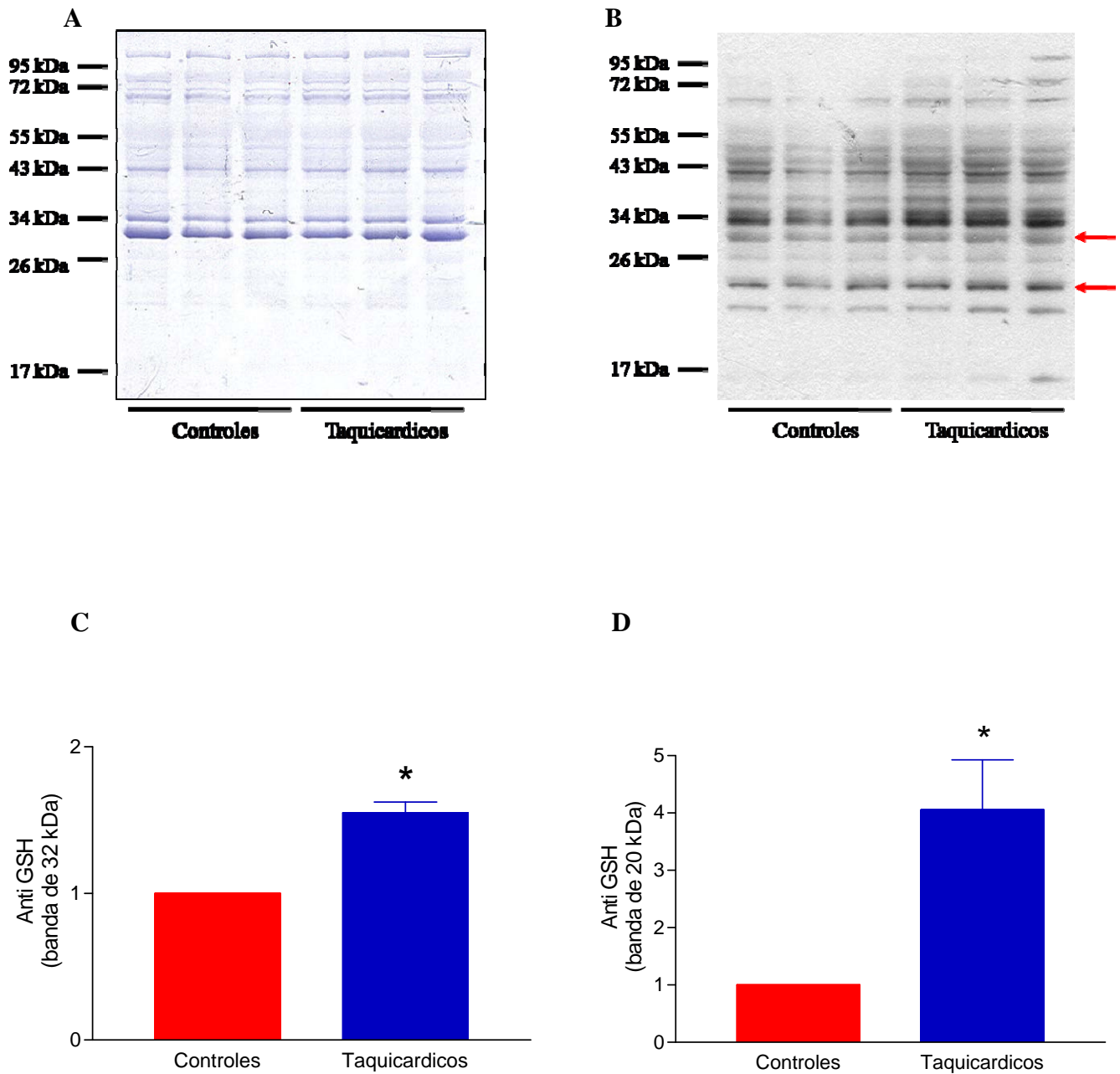


Figura 10: Proteínas S-glutationiladas en controles y taquicárdicos.

A: Membrana de PVDF teñida con azul de coomassie. **B:** “Western blot” con anticuerpo anti-GSH. Las flechas rojas indican las bandas que se cuantificaron. **C y D:** cuantificación de la S-glutationilación de las bandas de 32 y 20 kDa respectivamente. * $P < 0.05$ Controles v/s Taquicárdicos, t-test.

3.4.1. Inmunoprecipitación de proteínas S-glutationiladas.

Para estudiar si ANT se encuentra efectivamente S-glutationilada se realizó una inmunoprecipitación con anti-GSH de un solubilizado de fracción mitocondrial. El “Western blot” con anticuerpo anti-ANT de la fracción inmunoprecipitada con anti-GSH se muestra en la **Figura 11**. Este resultado muestra que efectivamente ANT se encuentra S-glutationilado.

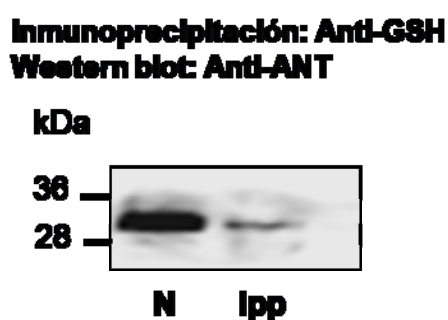


Figura 11: Inmunoprecipitación de proteínas S-glutationiladas.

Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GSH y “Western blot” con anticuerpo específico para ANT. N: fracción mitocondrial. Ipp: inmunoprecipitado.

3.5. Glutación mitocondrial

Debido el gran número de proteínas glutationiladas que aparecen en el “Western blot” se investigó si la taquicardia produce cambios en el contenido de glutación y/o en la relación GSH/GSSG mitocondrial. Para ello se midió el contenido de glutación total (**Figura 12A**), reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en mitocondrias de animales controles (n = 10) y taquicárdicos (n = 6). Como se muestra en la **Figura 12**, no se observan cambios significativos en ninguno de los parámetros medidos, sin embargo el glutación oxidado en los animales sometidos a taquicardia mostró una tendencia al aumento frente a los animales controles (**Figura 12B**), mientras que la razón GSH/GSSG tendió a disminuir en mitocondrias de animales sometidos a taquicardia (**Figura 12C**).

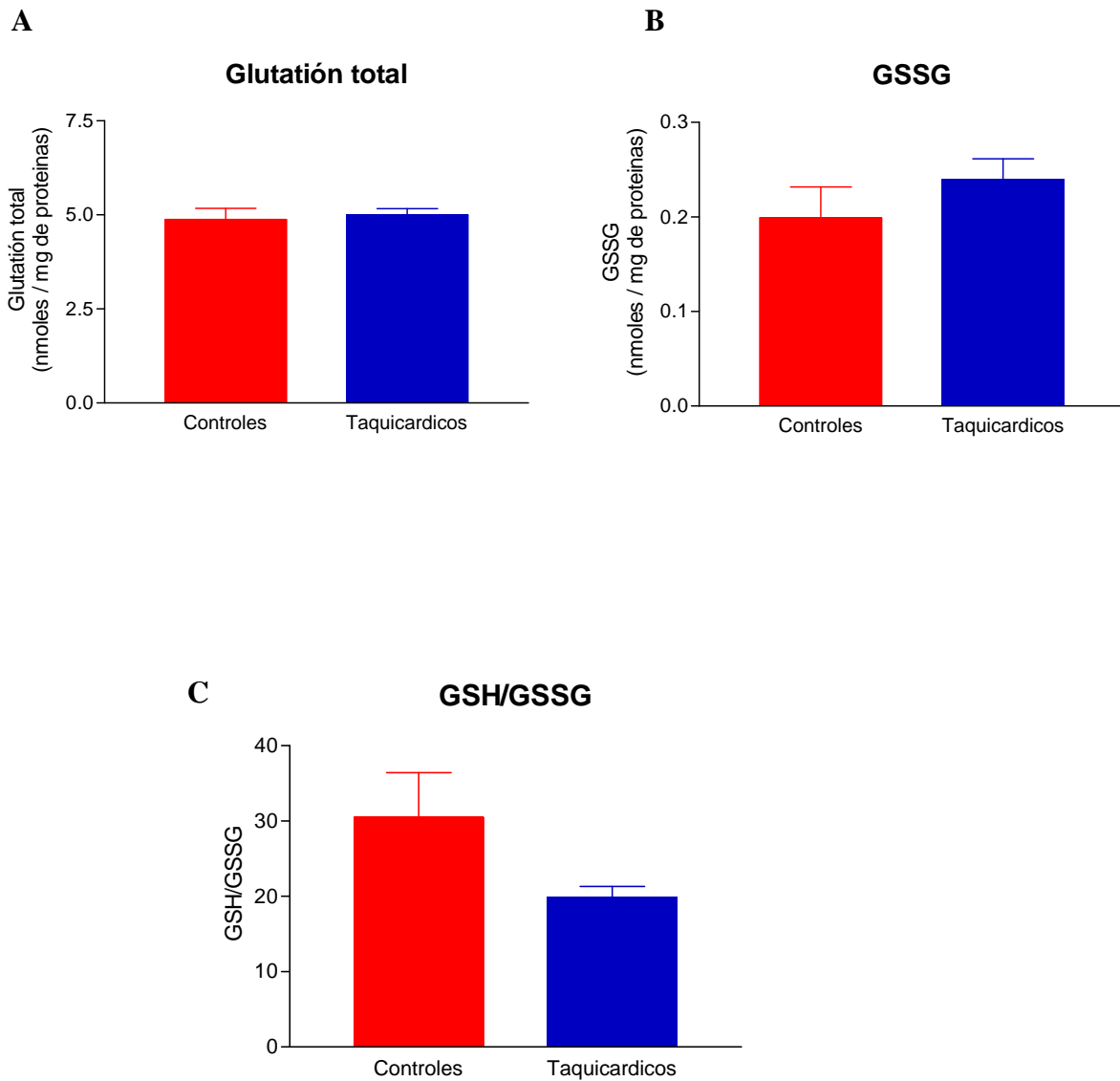


Figura 12: Razón GSH/GSSG en mitocondrias provenientes de animales controles y taquicárdicos.

A: Contenido de glutatión total, **B:** Contenido de glutatión oxidado (GSSG), **C:** Razón GSH/GSSG en mitocondrias de animales controles y sometidos a taquicardia. Controles n = 10, Taquicárdicos n = 6.

4. DISCUSIÓN

Los resultados de esta memoria apoyan la parte de la hipótesis que el acondicionamiento por taquicardia retrasa el ensamblaje del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), sin embargo para la segunda parte, que las especies reactivas de oxígeno podrían mediar este efecto, no se obtuvieron resultados concluyentes.

Respecto a la primera parte de la hipótesis, se demostró que el acondicionamiento por taquicardia retrasa la apertura del mPTP, puesto que el cambio de volumen mitocondrial en respuesta a la sobrecarga de ión calcio fue mucho menor en las mitocondrias de animales sometidos a acondicionamiento por taquicardia que en las de los animales controles (**Figura 8C**). Estos resultados señalan que las mitocondrias obtenidas de los corazones de animales sometidos a taquicardia son más resistentes a la apertura del mPTP inducida por alta concentración de ión calcio, lo que también puede ser interpretado como que a una misma concentración de ión calcio las mitocondrias de animales taquicárdicos presentan un menor aumento de volumen que las mitocondrias de animales controles, debido a un retraso en la apertura del mPTP. En estas preparaciones la CsA, inhibidor de la formación del poro, también inhibe la disminución de la dispersión de luz, lo que demuestra que los cambios medidos se deben efectivamente al aumento de volumen mitocondrial por cambios de permeabilidad del mPTP.

La participación del mPTP ha sido descrita ampliamente en acondicionamiento isquémico. Mitocondrias aisladas, tanto una vez terminado el periodo de isquemia prolongada como después de comenzada la reperfusión, muestran un menor cambio de volumen por sobrecarga de ión calcio en relación a los animales controles. En el acondicionamiento isquémico los cambios en la respuesta de las mitocondrias a sobrecarga de ión calcio solo se evidencian una vez terminado el periodo de isquemia prolongada (Clarke y cols., 2008). En cambio en esta memoria el retraso en la apertura del poro se observa ya al terminar el acondicionamiento. Esta diferencia en los resultados se puede explicar por razones experimentales, ya que los modelos utilizados son distintos. El acondicionamiento isquémico se basa en privaciones sucesivas de oxígeno y nutrientes en

tanto que el preconditionamiento por taquicardia se fundamenta en un aumento de la demanda metabólica. También es importante considerar que los experimentos de preconditionamiento isquémico fueron realizados en corazones de rata aislados y perfundidos por el sistema de perfusión de Langendorff, a diferencia del modelo utilizado para esta memoria en que la maniobra preconditionante no es en corazón aislado sino en el animal entero. A pesar de las diferencias en estos resultados y de haber sido realizados en un modelo distinto, hay concordancia con las conclusiones desprendidas de los resultados de este trabajo, lo que confirma la hipótesis de la participación del mPTP en preconditionamiento por taquicardia.

Los componentes estructurales del mPTP aún están en discusión. Lo más aceptado hasta ahora es que se forma por el reclutamiento de las proteínas VDAC, ANT y CypD pero cada vez hay más evidencias de que VDAC no sería indispensable y solo bastaría con ANT y CypD para que el mPTP se ensamble. El hecho que en mitocondrias de animales taquicárdicos se encuentran disminuidas estas dos proteínas (resultado mostrado en **Figura 6B**), que son claves para la formación del mPTP, significa que hay una menor cantidad disponible de estas dos proteínas para que se ensamble el mPTP y por lo tanto las mitocondrias tolerarán más ión calcio antes que éste se abra y la mitocondria aumente su volumen. El preconditionamiento por taquicardia es un proceso relativamente rápido, por lo que es difícil pensar en variaciones en la velocidad de síntesis de ANT y CypD, por lo que una opción para explicar esta disminución en el contenido de estas proteínas es que esté aumentada su degradación. Para confirmar o descartar esta alternativa se podrían buscar fragmentos de degradación que podrían ser reconocidos por los anticuerpos respectivos, para esto habría que realizar un “Western blot” en que el frente de corrida quede dentro del gel, para así no perder fragmentos pequeños que en los experimentos presentados en esta tesis no se han pesquisado, ya que para obtener una buena separación entre las proteínas ANT y VDAC, cuyos pesos moleculares son similares, es necesario que las proteínas menores a 17 kDa queden fuera del gel. Otra alternativa es utilizar inhibidores de la degradación proteica mitocondrial.

El hecho que la proteína de membrana externa VDAC no se encuentre disminuida concuerda con los últimos modelos propuestos para la formación del mPTP, que no consideran la participación de esta proteína. Actualmente se postula que el transportador de fosfato mitocondrial (PiC) interactuaría con ANT en la membrana interna de la mitocondria para producir la apertura del mPTP, y que la unión de CypD al dímero ANT-PiC induciría la apertura del mPTP, lo que se vería favorecido por un estado conformacional de ANT (Leung y Halestrap, 2008). En este trabajo no se investigó a la proteína PiC, pero el hecho que VDAC no varíe apoya este último modelo propuesto, en que las proteínas claves serían ANT y CypD. (Esquema en **Figura 13**)

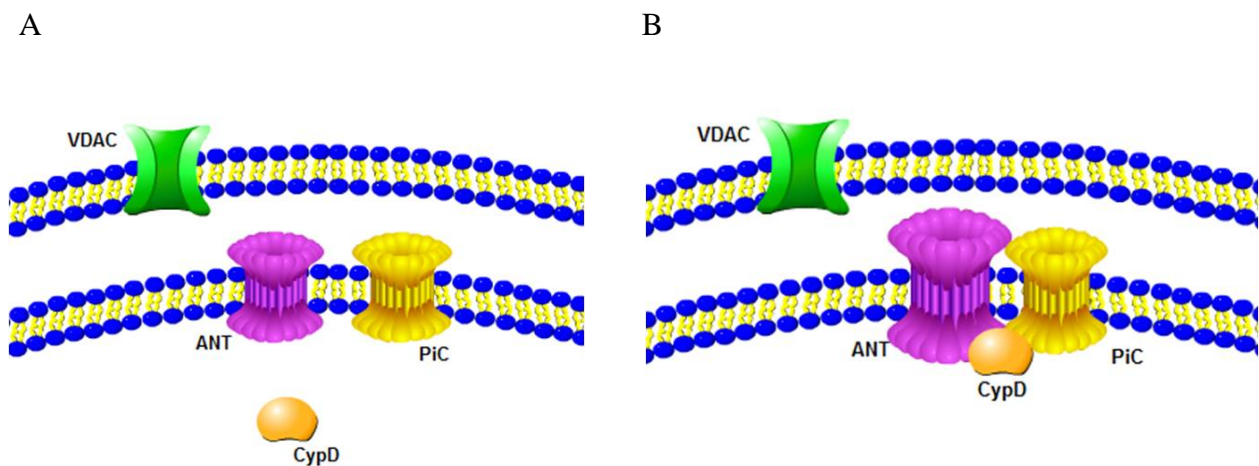


Figura 13: Esquema del modelo actual para la formación del mPTP. En este modelo la proteína VDAC no es esencial para la formación del poro, sino que los componentes del mPTP son las proteínas ANT, PiC y CypD (**mostrado en A**). El poro se formaría al reclutarse estas tres proteínas, esto se vería favorecido por un estado conformacional de ANT (**mostrado en B**).

El retardo en el ensamblaje del mPTP permite que las mitocondrias toleren más ión calcio. Esto es importante ya que la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial provoca muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis (Javadov y Karmazyn, 2007). Si las mitocondrias toleran más ión calcio antes que se permeabilicen hay menor probabilidad de que haya muerte celular.

Los resultados obtenidos en este trabajo también demuestran que la taquicardia produce un aumento generalizado de la *S*-glutacionilación de las proteínas mitocondriales. Especialmente, se encuentra aumentada la *S*-glutacionilación de proteínas cuyos PM corresponden a ANT y CypD (**Figura 10C y 10D**). Si bien no pudo determinarse que ANT y CypD sean las únicas proteínas presentes en estas bandas glutacioniladas, lo probable es que sí haya ocurrido un aumento en la *S*-glutacionilación de estas proteínas específicamente. La inmunoprecipitación de ANT comprueba que esta proteína efectivamente se glutacionila pero faltaría ver si existen diferencias en la *S*-glutacionilación de ANT y CypD entre controles y taquicárdicos.

Para responder esto se podría realizar una electroforesis en dos dimensiones donde la separación es por punto isoelectrico y por peso molecular, y la probabilidad de tener a estas proteínas separadas es mucho mayor. Otra alternativa sería hacer espectrometría de masa para ver a si las proteínas de los animales taquicárdicos presentan otras cisteínas con esta modificación post-traducciona; esta opción presenta la dificultad técnica de que las proteínas deben ser inmunoprecipitadas para realizar la espectrometría y hasta ahora esta técnica no se ha logrado estandarizar en nuestro laboratorio.

Los agentes oxidantes y reductores afectaron en forma diferente la apertura del mPTP (**Figura 9B**). En condiciones oxidantes la apertura del mPTP fue mucho mas rápida que en condiciones reductoras, lo que concuerda con lo descrito en literatura, que ROS inducen la apertura del mPTP. Al hacer un paralelo entre el comportamiento de las mitocondrias de animales taquicárdicos y los efectos de agentes redox, pareciera que el efecto producido por la taquicardia es semejante al de agentes reductores. Si la taquicardia aumentara la *S*-glutacionilación de las proteínas del poro y esa modificación (que corresponde a una oxidación) fuese la que retardara el ensamblaje y apertura del mPTP, se podría suponer que

la *S*-glutathionilación evitaría una oxidación irreversible de las proteínas mitocondriales, preservando la estructura y función mitocondrial. Estas u otras modificaciones oxidativas podrían ser las responsables de inducir la degradación de ANT y CypD, lo que explicaría la disminución que se observa de estas proteínas luego de taquicardia.

En resumen, los resultados obtenidos indican que el preconditionamiento por taquicardia provoca un retardo en la apertura del mPTP. Aunque la participación de los ROS no pudo ser confirmada directamente, es probable que modificaciones oxidativas de ANT y CypD sean las responsables de este retardo, ya sea por modificación de su actividad o por inducción de su degradación.

A futuro sería importante resolver si la taquicardia efectivamente aumenta la *S*-glutathionilación de estas proteínas, y si se producen otras modificaciones redox como la *S*-nitrosilación y si estas modificaciones oxidativas están relacionadas con la disminución en el contenido proteico de ANT y CypD.

Además cobra relevancia ver si el retardo en el ensamblaje del mPTP se mantiene finalizado el periodo de isquemia prolongada y una vez comenzada la reperfusión, aunque este punto presenta dificultades prácticas. El problema principal de hacerlo en este mismo modelo es que el protocolo completo es demasiado largo, considerando que para ver el cambio de volumen mitocondrial es necesario preparar las mitocondrias una vez obtenido el tejido ya que la opción de congelar las muestras se descarta por perjudicar los resultados experimentales.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió la participación del Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial (mPTP) en el acondicionamiento por taquicardia y la posible participación de ROS en el retraso en su apertura. Las conclusiones, a partir de los resultados obtenidos, son las siguientes:

En mitocondrias provenientes de corazones de animales sometidos a acondicionamiento por taquicardia se retrasa el ensamblaje del mPTP ya que éstas presentan más resistencia a la apertura del mPTP inducida por una alta concentración de ión calcio.

En mitocondrias aisladas de corazones de animales acondicionados por taquicardia se encuentran disminuidas dos proteínas claves para la formación del mPTP, Ciclofilina D (CypD) y el Transportador de Nucleótidos de Adenina (ANT). En tanto que la cantidad de proteínas del Canal Aniónico Sensible a Potencial (VDAC) no presenta variaciones con esta maniobra acondicionante.

Como conclusión general se demuestra que el mPTP participa en el mecanismo de acondicionamiento por taquicardia ya que tras esta maniobra acondicionante se retrasa su apertura, lo que correlaciona con la disminución de las proteínas ANT y CypD en las mitocondrias de los corazones de los animales tratados.

6. REFERENCIAS

Aracena P, Sanchez G, Donoso P, Hamilton SL, Hidalgo C (2003). S-glutathionylation decreases Mg²⁺ inhibition and S-nitrosylation enhances Ca²⁺ activation of RyR1 channels. *J Biol Chem* **278**: 42927-35.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005). Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* **111**: 194-7.

Armstrong JS (2006). The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion* **6**: 225-34.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA *et al* (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**: 658-62.

Carreira RS, Monteiro P, Kowaltowski AJ, Goncalves LM, Providencia LA (2008). Nicorandil protects cardiac mitochondria against permeability transition induced by ischemia-reperfusion. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 95-102.

Clarke SJ, Khaliulin I, Das M, Parker JE, Heesom KJ, Halestrap AP (2008). Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ Res* **102**: 1082-90.

Cohen MV, Yang XM, Neumann T, Heusch G, Downey JM (2000). Favorable remodeling enhances recovery of regional myocardial function in the weeks after infarction in ischemically preconditioned hearts. *Circulation* **102**: 579-83.

Domenech R, Macho P, Schwarze H, Sanchez G (2002). Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs. *Cardiovasc Res* **55**: 561-6.

Domenech RJ, Macho P, Velez D, Sanchez G, Liu X, Dhalla N (1998). Tachycardia preconditions infarct size in dogs: role of adenosine and protein kinase C. *Circulation* **97**: 786-94.

Domenech RJ, Sanchez G, Donoso P, Parra V, Macho P (2003). Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺ dynamics: a mechanism for preconditioning? *J Mol Cell Cardiol* **35**: 1429-37.

Downey JM, Davis AM, Cohen MV (2007). Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* **12**: 181-8.

Griffith OW (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **106**: 207-12.

Griffiths EJ, Halestrap AP (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* **307** (Pt 1): 93-8.

Grimm S, Brdiczka D (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* **12**: 841-55.

Hagar JM, Hale SL, Kloner RA (1991). Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res* **68**: 61-8.

Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM (1997). Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* **174**: 167-72.

Hartree EF (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* **48**: 422-7.

Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM (2003). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **60**: 617-25.

Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM (2009). The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol* **104**: 189-202.

Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchen MR (2004). Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: H841-9.

Hurd TR, Filipovska A, Costa NJ, Dahm CC, Murphy MP (2005). Disulphide formation on mitochondrial protein thiols. *Biochem Soc Trans* **33**: 1390-3.

Instituto Nacional de Estadísticas (INE), Estadísticas Vitales. Informe Anual 2005 (2008). Santiago, Chile. [en línea]
<http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/demografia_y_vitales/estadisticas_vitales/pdf/anuarios/vitales2005.rar> [consulta: 8 Abril 2009]

Javadov S, Karmazyn M (2007). Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* **20**: 1-22.

Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP (2003). Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* **549**: 513-24.

Jones SP, Bolli R (2006). The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **40**: 16-23.

Kruglov AG, Teplova VV, Saris NE (2007). The effect of the lipophilic cation lucigenin on mitochondria depends on the site of its reduction. *Biochem Pharmacol* **74**: 545-56.

Leung AW, Halestrap AP (2008). Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 946-52.

Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM (2007). Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* **75**: 530-5.

Murphy E, Steenbergen C (2007). Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol* **69**: 51-67.

Murphy E, Steenbergen C (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* **88**: 581-609.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**: 1124-36.

Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, Wilcox JN, Thourani V, Guyton RA *et al* (2000). Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* **45**: 661-70.

Otani H (2008). Ischemic preconditioning: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **10**: 207-47.

Sanchez G, Escobar M, Pedrozo Z, Macho P, Domenech R, Hartel S *et al* (2008). Exercise and tachycardia increase NADPH oxidase and ryanodine receptor-2 activity: possible role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* **77**: 380-6.

Sanchez G, Pedrozo Z, Domenech RJ, Hidalgo C, Donoso P (2005). Tachycardia increases NADPH oxidase activity and RyR2 S-glutathionylation in ventricular muscle. *J Mol Cell Cardiol* **39**: 982-91.

Sun J, Morgan M, Shen RF, Steenbergen C, Murphy E (2007). Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ Res* **101**: 1155-63.

Thourani VH, Nakamura M, Duarte IG, Bufkin BL, Zhao ZQ, Jordan JE *et al* (1999). Ischemic preconditioning attenuates postischemic coronary artery endothelial dysfunction in a model of minimally invasive direct coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* **117**: 383-9.

Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, Halestrap AP (1998). Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* **336** (Pt 2): 287-90.

Yellon DM, Hausenloy DJ (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* **357**: 1121-35.