

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**Regulación de la morfología mitocondrial del cardiomiocito  
por angiotensina-(1-9)**

**Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico por**

**PABLO ANDRES RIVERA MEJÍAS**

**Profesor Patrocinante**

**Directores de Memoria**

**Dr. Sergio Lavandero González**

**Dr. Sergio Lavandero González  
Dra. Valentina Parra Ortiz**

**Santiago – Chile  
2013**

*Dedicada a mis padres,  
Por su amor y esfuerzo diario*

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

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto FONDECYT 1120212 (SL)
- Anillo en Investigación y Tecnología ACT 1111 (SL)
- Proyecto MECESUP UCHO802 (SL)
- Proyecto FONDECYT 1100874 (MPO, MC)
- Proyecto FONDEF D1111122 (MPO, MC, SL).

La presente memoria ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

**A) Presentaciones a congresos:**

Pennanen C, **Rivera P**, Morales P, Parra V, Chiong M, Lavandero S. Role of mitochondrial dynamics on the pathophysiology of cardiomyocyte hypertrophy. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Sesión de Poster. Valdivia, Chile, 27-30 Septiembre 2011.

Sotomayor-Flores, C, Hechenleitner, J, **Rivera-Mejías, P**, López-Crisosto, C, Parra, V, Lavandero, S. Angiotensin (1-9): New pathways involved in the development of cardiac hypertrophy. XXXV Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular. Sesión de Poster. Puerto Varas, 2-5 Octubre 2012.

**Rivera-Mejías, P**, Pennanen, C, Sotomayor-Flores, C, López-Crisosto, C, Parra, V, Lavandero, S. Angiotensin-(1-9) counteracts mitochondrial fission induced by norepinephrine in cultured cardiomyocytes. XXXV Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular. Sesión de Poster. Puerto Varas, 2-5 Octubre 2012.

**Rivera-Mejías, P**, Pennanen, C, Sotomayor-Flores, C, López-Crisosto, C, Parra, V, Lavandero, S. Mitochondrial fission induced by norepinephrine in cultured cardiomyocytes is counteracted by angiotensin-(1-9) non involving changes in mitochondrial fusion proteins. XX Annual Meeting of the International Society for Heart Research Latin American Section. Sesión de Poster. Santiago, Chile, 25-26 Octubre 2012.

Sotomayor-Flores, C, Hechenleitner, J, **Rivera-Mejías, P**, López- Crisosto, C, Parra, V, Lavandero, S. Angiotensin (1–9) promotes mitochondrial calcium influx in cultured cardiomyocytes. XX Annual Meeting of the International Society for Heart Research Latin American Section. Sesión de Poster. Santiago, Chile, 25-26 Octubre 2012.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a mis directores de tesis. Al Profesor Sergio Lavandero, por la confianza depositada en mi para la realización de este proyecto y por la oportunidad ser parte de este excelente grupo de trabajo y a la Dra. Valentina Parra, por su experiencia entregada y además por la paciencia, energía y motivación que me permitieron llevar a puerto este trabajo.

Al grupo mitocondrias, por compartir sus conocimientos y experiencias, en especial a Christian Pennanen, por sus enseñanzas y su alegría diaria que entrega al laboratorio. A Cristian Sotomayor, por su compañerismo y motivación, por el trabajo en equipo que hemos logrado forjar y a Pablo Morales, por su apoyo y cooperación.

A todos los que conocí, en mayor o en menor medida, durante mi paso por la universidad. Sin dudas todos aportaron a mi desarrollo personal. En especial agradecer a los “descartes”, por los momentos vividos.

Agradecer a mis amigos de la vida, pues cada risa ha servido para levantar el ánimo en todo momento. A Rocío, pues junto a ti la vida y los desafíos se han vuelto más livianos, muchas gracias por ser mi compañera.

Finalmente, agradecerles a mis Padres, Sandra y Ricardo, por la tremenda paciencia, amor y apoyo que han depositado en mí. Este trabajo es fruto directo de su esfuerzo, pues en este país resulta difícil educar a un hijo, por lo que este paso no me hace sentir orgulloso, si no que tremendamente agradecido de su sacrificio y trabajo que han permitido este logro.

## ÍNDICE

	Páginas
ÍNDICE .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ABREVIACIONES .....	10
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1. Corazón y mitocondria .....	13
1.1.1. Función, metabolismo cardiaco .....	13
1.1.2. Dinámica mitocondrial .....	13
1.1.3. Fusión mitocondrial .....	14
1.1.4. Fisión mitocondrial .....	14
1.1.5. Dinámica y función mitocondrial .....	16
1.1.6. Fisiopatología cardiaca y dinámica mitocondrial .....	17
1.2. Hipertrofia cardiaca y mitocondria .....	19
1.2.1. Hipertrofia cardiaca .....	19
1.2.2. Mitocondria e hipertrofia cardiaca .....	20
1.2.3. Dinámica mitocondrial e hipertrofia cardiaca .....	21
1.3. Angiotensina-(1-9) e hipertrofia cardiaca.....	22
1.3.1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona .....	22
1.3.2. Angiotensina-(1-9).....	25
1.3.3. Angiotensina-(1-9) e hipertrofia cardiaca.....	25
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	28
3. OBJETIVO GENERAL.....	28
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
5.1. Reactivos .....	29
5.2. Modelo experimental.....	30
5.3. Cultivos primarios de ratas neonatas .....	30
5.4. Estímulos .....	31

5.5. Preparación de extractos celulares totales.....	31
5.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas .....	32
5.7. Western blot.....	32
5.8. Inmunofluorescencia indirecta .....	33
5.9. Visualización de la morfología mitocondrial.....	34
5.10. Análisis digital de imágenes.....	34
5.11. Análisis estadístico .....	35
6. RESULTADOS .....	36
6.1. Objetivo 1: Determinar si Angiotensina-(1-9) modula la dinámica mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos. ....	36
6.2. Objetivo 2: Determinar si Angiotensina-(1-9) previene la fisión mitocondrial inducida por norepinefrina.....	41
6.3. Objetivo 3: determinar la participación de las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial en el efecto de angiotensina-(1-9) sobre la morfología mitocondrial .....	43
7. DISCUSIÓN.....	47
7.1. Proteínas involucradas en la fusión mitocondrial inducida por Angiotensina-(1-9).....	50
7.2. Participación de los receptores MAS y AT2 en la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9) .....	52
8. PROYECCIONES.....	54
9. CONCLUSIONES .....	56
10. BIBLIOGRAFIA.....	57



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial de mamíferos	16
<b>Figura 2.</b> Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.....	24
<b>Figura 3.</b> Efecto de Angiotensina-(1-9) sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito.....	37
<b>Figura 4.</b> Participación del receptor MAS en la fusión mitocondrial mediada por Angiotensina-(1-9).....	39
<b>Figura 5.</b> Participación del receptor AT2 en la fusión mitocondrial mediada por Angiotensina-(1-9).....	40
<b>Figura 6.</b> Efecto de Angiotensina-(1-9) y Norepinefrina sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito. ....	42
<b>Figura 7.</b> Niveles de las proteínas OPA-1 y Mfn2 .....	44
<b>Figura 8.</b> Efecto de Angiotensina-(1-9) sobre la traslocación hacia la mitocondria y fosforilación de Drp1 .....	46
<b>Figura 9.</b> Modelo final .....	55

## ABREVIACIONES

Ang I	: Angiotensina I
Ang II	: Angiotensina II
Ang-(1-7)	: Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	: Angiotensina-(1-9)
AT2R	: Receptor de Angiotensina II tipo 2
ATP	: Adenosin trifosfato
ATPi	: Adenosin trifosfato intracelular
Drp1	: Proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo 1
Drp1 <sub>k38a</sub>	: Mutante con efecto dominante negativo de Drp-1
ECA	: Enzima convertidora de Angiotensina I
ECA2	: Enzima homóloga a convertidora de Angiotensina I
Fis1	: Proteína de la fisión mitocondrial
hMfn1	: Mitofusina 1 humana
hMf2	: Mitofusina 2 humana
IR	: isquemia y reperfusión
MARF	: Factor regulador de unión mitocondrial
mdivi-1	: Inhibidor de la división mitocondrial 1
Mff	: Factor de fisión mitocondrial
Mfn1/2	: Mitofusina 1 ó 2
mRNA	: RNA mensajero
miRNA	: Micro RNA
NE	: Norepinefrina
OPA1	: Proteína de la atrofia óptica tipo-1
PKA	: Proteína kinasa A
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
siRNA	: RNA pequeño de interferencia
SRAA	: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

## RESUMEN

La hipertrofia cardiaca es una respuesta adaptiva a distintos estímulos que incrementan la demanda contráctil e involucran un aumento en la masa y tamaño del corazón. Se distinguen dos tipos de hipertrofia: fisiológica, de carácter reversible; y patológica, irreversible y generada por distintos estímulos, entre ellos la norepinefrina (NE). Por otro lado, la mitocondria es el organelo responsable de generar la energía necesaria para la contracción del cardiomiocito, formando una red dinámica cuya morfología y función dependen de procesos de fusión y fisión, procesos que son afectados en la hipertrofia inducida por NE, produciéndose un fenotipo mitocondrial fisionado. Angiotensina (1-9), es un péptido del sistema renina-angiotensina-aldosterona no canónico, con propiedades anti-hipertróficas frente al estímulo NE. Por lo tanto, el objetivo de este estudio consistió en determinar si Angiotensina-(1-9) modula la dinámica mitocondrial del cardiomiocito y previene la fisión mitocondrial inducida por el estímulo pro-hipertrófico de NE. Los resultados mostraron que Angiotensina (1-9) 100  $\mu$ M promueve un aumento en la fusión mitocondrial a los tiempos 1, 3, 6 y 24 h, asociándose con una disminución en la migración de Drp1 hacia la mitocondria, sin modificar la masa de las proteínas relacionadas con la fusión, OPA1 y Mfn2. La preincubación por 6 h con Angiotensina (1-9) previno la fisión mitocondrial dependiente de NE (10  $\mu$ M por 24 h). La preincubación con el antagonista del receptor MAS A779 no afectó la fusión mitocondrial inducida por angiotensina-(1-9). La pre-incubación con el antagonista del receptor AT2 PD 123.319 bloqueó la fusión mitocondrial inducida por angiotensina-(1-9). Por lo tanto, angiotensina (1-9) modula la dinámica mitocondrial de cardiomiocitos neonatos vía receptor AT2, fusionando y previniendo la fisión producida por el estímulo pro-hipertrófico NE.

## SUMMARY

### **Cardiomyocyte mitochondrial morphology regulation by angiotensin-(1-9)**

Cardiac hypertrophy is an adaptive response to several stimuli that raises contractile myocardial demand and involves increases in mass and size. Heart hypertrophy is classified in; a) physiological one (reversible) and b) pathological which is irreversible and generated by stimuli, including norepinephrine (NE). On the other hand, mitochondria are the organelle responsible for the generation of the necessary energy for cardiomyocyte contraction, forming a dynamic network whose morphology and function depend on fusion and fission processes. We have previously shown that NE induces cardiac hypertrophy with a concomitant mitochondrial fission. Angiotensin (1-9) is a novel anti-hypertrophic peptide of the non-classical renin-angiotensin system. The aim of this study was to determine whether Angiotensin (1-9) modulates mitochondrial dynamics and prevents NE-induced mitochondrial fission. The results showed that treatment of cardiomyocytes with Angiotensin (1-9) (100  $\mu$ M for 1 to 24 h) produced fusion associated with an decrease in Drp1 migration to mitochondria, without changes in the levels of the fusion proteins Opa1 and Mfn2. Parallel, mitochondrial fission generated by NE 10  $\mu$ M 24 h was prevented by the pre-incubation (6 h) of cardiomyocytes with Angiotensin (1-9). Pre-incubation with MAS antagonist A779 did not affect the mitochondrial fusion induced by Angiotensin-(1-9). Pre-incubation with AT2 receptor antagonist PD 123.319 prevented mitochondrial fusion induced by Angiotensin-(1-9). In summary, Angiotensin-(1-9) modulates cardiomyocyte mitochondrial dynamics through AT2 receptor, fusing and preventing NE-induced mitochondrial fission.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Corazón y mitocondria

#### 1.1.1. Función, metabolismo cardiaco

El corazón es el responsable de bombear la sangre hacia nuestros tejidos, contrayéndose cerca de 100.000 veces por día. Este órgano está compuesto principalmente por dos tipos celulares, fibroblastos y cardiomiocitos, siendo estos últimos los responsables de la contracción cardiaca. El trabajo contráctil significa para el corazón una alta demanda de energía en forma de ATP, llegando a consumir cerca de 30 Kg por día de esta molécula, lo que equivale a 70 veces su peso (**Ferrari et al. 2006**). Por lo tanto, cualquier alteración en el proceso de generación de energía, trae como consecuencia alteraciones en el normal funcionamiento cardiaco. En un corazón adulto normal, entre el 70 y 90% de la síntesis total de ATP proviene de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. La oxidación de piruvato, proveniente de la glicolisis, aporta el restante 10-40% (**Stanley & Chandler, 2002**). Ambos procesos tienen lugar en la matriz mitocondrial, razón por la que este organelo es de vital importancia para el funcionamiento normal del corazón.

#### 1.1.2. Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son organelos de doble membrana, en cuya membrana interna se encuentran alojados los complejos de la cadena transportadora de electrones claves para la síntesis de ATP. Este organelo ocupa alrededor de un 30% del volumen total de los cardiomiocitos (**Barth, 1992**), formando una red dinámica interconectada cuya forma y función dependen del balance de procesos de fusión y fisión (**Chen & Chan, 2004**).

### 1.1.3. Fusión mitocondrial

En la fusión mitocondrial, membranas externas de mitocondrias adyacentes se fusionan, lo cual es seguido por la fusión de las membranas internas, dando como resultados la unión de membranas, de los espacios intermembrana y la matriz de ambas mitocondrias. En mamíferos, tres GTPasas de alta masa molecular son esenciales para la fusión mitocondrial (**Figura 1**). Mfn1 y Mfn2 son proteínas transmembrana ubicadas en la membrana externa mitocondrial (mediando su fusión) (**Hoppins et al. 2007**) y OPA1, ubicada en la membrana interna o en el espacio intermembrana (**Delettre et al., 2000**), la cual además de mediar la fusión de la membrana interna, cumple un rol en la mantención estructural de las crestas mitocondriales (**Olichon et al. 2003; Frezza et al. 2006**).

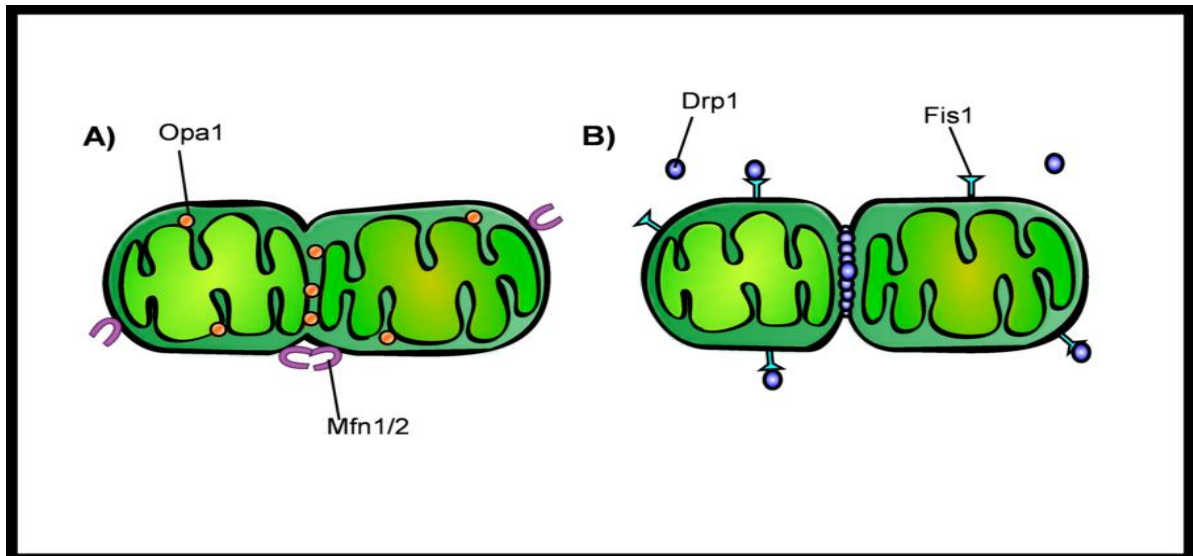
### 1.1.4. Fisión mitocondrial

Actualmente se han identificado distintas proteínas que participan en la fisión mitocondrial (**Figura 1**), entre ellas Drp1 (Dynamin-related protein), proteína GTPasa que juega un papel central en este proceso. Esta proteína, se encuentra principalmente en el citosol y se recluta a la membrana externa mitocondrial donde participaría en la constricción y corte de las membranas (**Chan, 2012**). La inhibición de Drp1, por expresión de una variante dominante negativa o utilización de RNA interferente (RNAi), genera elongación de la red mitocondrial (**Smirnova et al. 2001; Lee et al. 2004**).

Se han descrito una serie de proteínas que mediarían la unión de Drp1 a la membrana externa mitocondrial (ya que Drp1 carece de secuencias de destinación mitocondrial). Fis1 es una de las primeras proteínas descritas que median este paso. En levaduras, Dnm1 (homóloga de Drp1) requiere de la localización de Fis1 en la membrana mitocondrial para su reclutamiento (**Mozdy**

**et al. 2000**). Sin embargo, en mamíferos el rol de Fis1 es más controversial. Los primeros reportes en células Hela (células de carcinoma cervico-uterino) indicaban que la sobreexpresión de Fis1 provocaba fisión de la red mitocondrial (**Yoon & Krueger, 2003; Stojanovski et al. 2004**) y su *knock down* utilizando RNAi generaba elongación de la mitocondrias (**Lee et al. 2004; Stojanovski et al. 2004**). Sin embargo, más recientemente se reportó que el *knock down* de Fis1 en células Hela no alteró significativamente la morfología mitocondrial y en células de carcinoma humano HCT116 en las que el gen de Fis1 fue deletado no se observó alteración de la red mitocondrial o en el reclutamiento de Drp1 (**Otera et al. 2010**). El rol de Fis1 sobre la dinámica mitocondrial de mamíferos se mantiene controversial, pudiendo tener roles dependiendo del tipo celular, en los cuales proteínas recientemente descritas como Mff (mitochondrial fission factor) tendrían un papel más preponderante.

Por otra parte, distintas regulaciones post-traduccionales han sido descritas para Drp1, entre ellas sumoilación, S- nitrosilación, ubiquitinación y fosforilación (**Chang & Blackstone, 2010**), siendo esta última la más estudiada. Así por ejemplo, la fosforilación en Ser 616 por Cdk1/ciclina B durante la mitosis resulta en activación de la fisión dependiente de Drp1, evento importante para asegurar una distribución equitativa de mitocondrias en las células hijas (**Taguchi et al. 2007**). Otra fosforilación ampliamente estudiada es la del residuo Ser637 de la cadena polipeptídica, mediante la acción de la proteína quinasa A (PKA) lo que lleva a la inactivación de Drp1 favoreciendo la fusión (**Chang & Blackstone, 2007**) ; en cambio la desfosforilación por la fosfatasa calcineurina genera el efecto contrario (**Cereghetti et al. 2008**).



**Figura 1. Proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial de mamíferos**

**A)** Proteínas involucradas en la fusión mitocondrial. Las proteínas Mfn1/2 localizadas en la membrana externa mitocondrial interactúan hetero u homológamente con sus pares de mitocondrias adyacentes. Posteriormente, Opa1 que está anclada parcialmente a la membrana interna mitocondrial lleva a cabo la fusión de esta membrana. **B)** Proteínas involucradas en la fisión mitocondrial. Fis1 reclutaría en cierta forma a Drp1, que se encuentra en el citosol, hasta la membrana externa mitocondrial, para llevar a cabo la fisión.

### 1.1.5. Dinámica y función mitocondrial

Los cambios en la morfología mitocondrial no tan solo guardan relación con la forma y distribución de este organelo, sino que también existen evidencias que relacionan este proceso con el estado metabólico mitocondrial. Así, en células que carecían de Mfn1y Mfn2 o con un siRNA para OPA-1, junto con una fusión mitocondrial defectuosa, se produjo una disminución en la tasa de crecimiento celular, disminución de la respiración celular y disipación del potencial de membrana mitocondrial (**Chen et al. 2005**). En otro estudio, la utilización de un siRNA para Drp-1, junto con generar fusión de la red mitocondrial, disminuyó la respiración celular, la actividad del complejo IV de la fosforilación oxidativa y disminución del contenido de ATP intracelular (**Benard et al. 2007**). Estos datos si bien no permiten relacionar un fenotipo morfológico



en particular (fusión o fisión) con alteraciones en el metabolismo mitocondrial, si dan cuenta de la importancia de la dinámica mitocondrial en el funcionamiento de este organelo.

Como se describió inicialmente, el funcionamiento cardiaco es altamente dependiente del metabolismo mitocondrial, por lo que alteraciones en este organelo pueden conllevar al desarrollo y progresión de patologías cardiacas. Además, alteraciones en la dinámica mitocondrial se han relacionado con disfunción de este organelo, por lo que no es de extrañar que en distintas patologías que afectan al corazón, los procesos que controlan la morfología mitocondrial también se encuentren alterados.

#### **1.1.6. Fisiopatología cardiaca y dinámica mitocondrial**

En estudios realizados en células HL-1 (cardiomiocitos auriculares de ratón) sometidos a daño por isquemia/reperfusión se indujo fragmentación mitocondrial, evento prevenido en células que sobreexpresaban Drp<sub>K38A</sub> (proteína dominante negativo de Drp1) (Ong et al. 2010). En este mismo trabajo, la utilización del inhibidor farmacológico de Drp1, mdivi-1, junto con aumentar el número de células con mitocondrias elongadas, retardó la apertura del poro de transición mitocondrial y redujo la muerte celular inducida por isquemia y reperfusión tanto en células HL-1 como en cardiomiocitos de rata adulta, sugiriendo que la mantención de una red mitocondrial fusionada protege al cardiomiocito frente a ciertos tipos de daño. En estudios realizados en modelo de ratones con insuficiencia cardiaca post-isquemia también se observó una disminución en los niveles de OPA-1 junto con mitocondrias más pequeñas y desorganizadas en corazón. Además, en células H9c2 (mioblastos de rata neonata inmortalizados) sometidas a isquemia también se observó fragmentación de la red mitocondrial y disminución en los niveles de OPA-1. Sin

embargo, cuando se sobreexpresó OPA-1 en estas células, si bien redujo los niveles de fragmentación mitocondrial, no previno la muerte inducida por isquemia **(Chen et al. 2009)**. Otro estudio en ratones que sobreexpresaban el microRNA-499 (miR-499) mostró que estos animales eran menos susceptibles al daño cardíaco por isquemia/reperfusión y al remodelado post-infarto al miocardio, efectos mediados por una disminución en la actividad de calcineurina, menor desfosforilación del sitio inhibitorio de Drp1 y disminución de la fragmentación mitocondrial durante la isquemia. Junto con estos resultados, la disminución de Drp1 utilizando un siRNA disminuyó el área infartada posterior a la isquemia y reperfusión **(Wang et al. 2011)**, aportando otra evidencia que sugiere a Drp1 como un posible blanco cardioprotectivo.

Estudios recientes en *Drosophila melanogaster* transgénicas, donde se silenció la proteína MARF (ortóloga de mitofusinas en mamíferos) o OPA-1 específicamente en el tubo cardíaco de las moscas, dieron como resultados un cambio en la morfología mitocondrial de las células cardíacas (fragmentación mitocondrial, con un aumento en la heterogeneidad de tamaño y disminución del tamaño de las mitocondrias) junto con el desarrollo de cardiomiopatía dilatada. Interesantemente, la sobreexpresión de mitofusinas humanas (hMfn1 o hMfn2) en moscas deficientes de MARF previno el desarrollo de cardiomiopatía y la fragmentación mitocondrial **(Dorn et al. 2011)**. Estudios en ratones carentes de Mfn1 y Mfn2 cardíaca indujo letalidad embrionaria. Mientras que el *knock-out* condicional inducible por tamoxifeno de Mfn1 y Mfn2 cardíacas dio como resultado fragmentación mitocondrial, defectos en la respiración mitocondrial y desarrollo progresivo de cardiomiopatía dilatada **(Chen et al. 2011)**.

Los antecedentes anteriormente descritos, permiten establecer una relación clara entre el desarrollo de patologías cardíacas y la dinámica

mitocondrial, haciendo interesante el estudio de este proceso y su vinculación con otras alteraciones del funcionamiento cardiaco.

## **1.2. Hipertrofia cardiaca y mitocondria**

### **1.2.1. Hipertrofia cardiaca**

La hipertrofia cardiaca es un mecanismo por el cual el corazón responde a distintos estímulos o a alguna lesión, en un esfuerzo por adaptarse a un incremento en la demanda de trabajo contráctil e involucra aumentos en la masa y tamaño del corazón (**Mishra et al. 2010**). Se pueden diferenciar dos tipos de hipertrofia, una fisiológica que es reversible, producida principalmente en respuesta a ejercicio crónico o durante el embarazo, que se caracteriza por una morfología cardiaca normal (carente de fibrosis y apoptosis) y una función cardiaca normal o mejorada. Por otro lado, la hipertrofia cardiaca patológica es de carácter irreversible, ocurre en respuesta a cambios hemodinámicos crónicos, usualmente provocados por estados patológicos como hipertensión arterial o valvulopatías cardiacas y es considerada un factor de riesgo cardiovascular independiente, asociada a un aumento de fibrosis intersticial, muerte celular y disfunción cardiaca (**McMullen & Jennings, 2007**).

En la literatura actualmente se describen distintas vías o estímulos inductores de hipertrofia del cardiomiocito tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y catecolaminas como norepinefrina (NE), entre otras (**Heineke & Molkentin, 2006**). La NE interacciona con receptores adrenérgicos del cardiomiocito, integrantes de la familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. La interacción de NE con receptores de tipo  $\alpha$ 1-adrenérgico activa a la proteína  $G_{\alpha q/\alpha 11}$ , generando diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) mediante la acción de la fosfolipasa C tipo

$\beta$  (PLC- $\beta$ ). El IP3 incrementa la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico debido a su interacción con su receptor (IP3R) ubicado en el retículo sarcoplásmico. La estimulo crónica de NE produce hipertrofia cardiaca de tipo patológico (**Heineke & Molkentin, 2006; Thandapilly et al., 2011**).

### 1.2.2. Mitocondria e hipertrofia cardiaca

Distintos estudios han mostrado una disminución en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos durante la hipertrofia (**De las Fuentes et al. 2006; Doenst et al. 2010**), acompañado en parte por un aumento de la utilización de glucosa como sustrato (**Remondino et al. 2000**). Esto trae como consecuencia una disminución en la producción y contenido de ATP intracelular, evento acentuado en etapas de insuficiencia cardiaca, donde la disminución de la disponibilidad de esta molécula sería un factor importante en el progreso de hipertrofia hacia insuficiencia cardiaca (**Osterholt et al. 2012; Zhou et al. 2012**).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), junto con cumplir roles fisiológicos, se han asociado al desarrollo de diversas patologías, incluyendo la hipertrofia cardiaca (**Dai et al. 2011**). Por otra parte, la cadena transportadora de electrones (CTE) es una conocida fuente de ROS, razón por lo que se ha sugerido a la mitocondria como una de las principales generadoras de ROS en el corazón (**Sheeran & Pepe, 2006**). En un modelo de hipertrofia inducido por angiotensina II, este estímulo indujo aumento de ROS mitocondriales y daño de este organelo por disminución del DNA mitocondrial (mtDNA). Luego, la sobreexpresión de una catalasa con destinación mitocondrial disminuyó del daño al mtDNA y el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda (**Dai et al. 2011**).

### 1.2.3. Dinámica mitocondrial e hipertrofia cardiaca

Estudios recientes realizados en nuestro Laboratorio (**Pennanen, 2012**) en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata estimulados con NE por 24-48 h se observó que junto al desarrollo de hipertrofia, hubo fragmentación de la red mitocondrial, lo cual se evidenció por un aumento en el número total de mitocondrias y disminución del volumen mitocondrial promedio. Esta fisión además se asoció con incremento en la migración de Drp1 a la mitocondria, evaluado a través de un incremento en los niveles de Drp1 en la fracción mitocondrial y un aumento en la colocalización entre Drp1 y Fis1. Estos cambios morfológicos también se asociaron a una pérdida de la función mitocondrial (disminución del potencial de membrana, contenido de ATPi y en velocidad de consumo de oxígeno, junto con un aumento en la producción de ROS). Interesantemente, la disminución en los niveles de Mfn2, utilizando un adenovirus antisentido para esta proteína, fragmentó la red mitocondrial e indujo una respuesta hipertrófica determinada como un incremento en el área celular, la sarcomerización y la reexpresión de biomarcadores asociados al proceso. Por otra parte, cuando se utilizó un adenovirus que expresa una proteína dominante negativo para Drp1, se indujo fusión de la red mitocondrial y a la vez se previno la respuesta hipertrófica mediada por NE.

Estos resultados en su conjunto, revelan la importancia de la dinámica mitocondrial en el desarrollo de hipertrofia cardiaca, indicando una relación bi-direccional entre ambos procesos.

### 1.3. Angiotensina-(1-9) e hipertrofia cardiaca

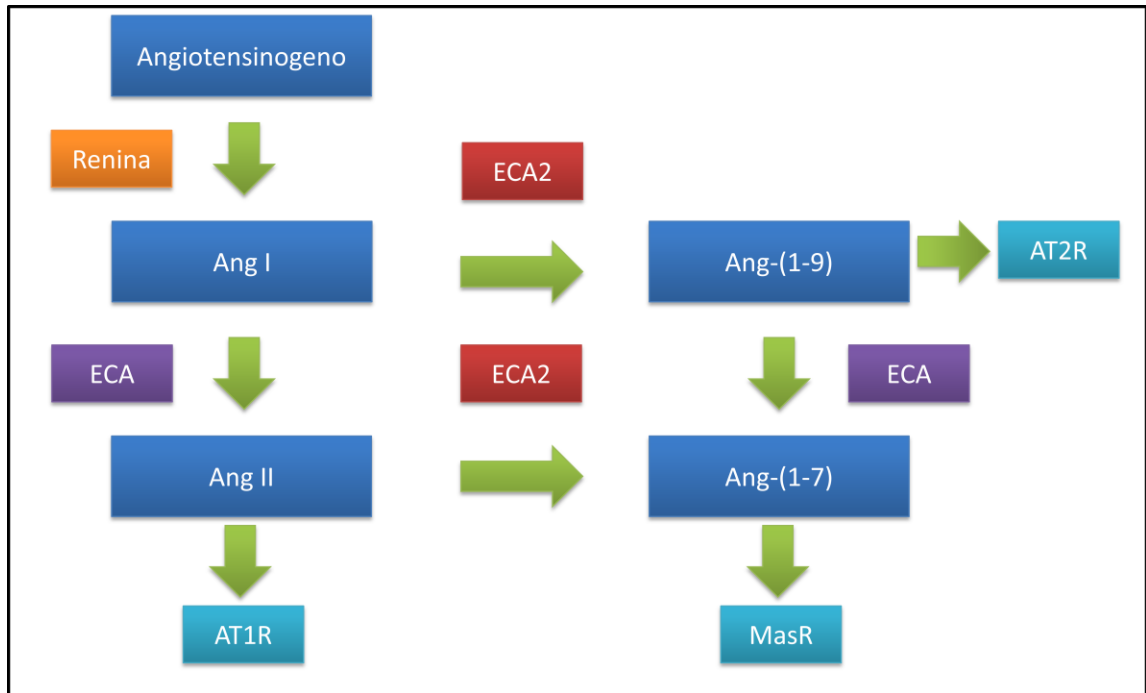
#### 1.3.1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) clásico está constituido por renina y la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), la primera encargada de hidrolizar el angiotensinógeno a angiotensina I (Ang I) y la segunda, encargada de la hidrólisis de Ang I a angiotensina II (Ang II). El descubrimiento de la enzima convertidora de angiotensina homóloga, ECA2, ha adicionado mayor complejidad al eje clásico del SRAA, en el que la angiotensina II (Ang II) y la enzima convertidora de angiotensina (ECA) cumplen roles protagónicos **(Fyhrquist & Saijonmaa, 2008)**. La evidencia actual sugiere un prometedor papel a este nuevo integrante del SRAA, específicamente como un contra-regulador del eje principal o vía clásica. ECA2 difiere de ECA tanto en especificidad de sustrato como en función. ECA2 produce Ang-(1-7) a partir de la hidrólisis de Ang II y Ang-(1-9) a partir de la hidrólisis de Ang I. Ang-(1-9) puede ser luego transformada a Ang-(1-7) por acción de ECA **(Ocaranza & Jalil, 2012) (Figura 2)**.

Fisiológicamente, Ang II cumple un papel fundamental en la homeostasis de la presión arterial mediante su acción en la absorción de sodio a nivel renal, estimulación de la liberación de aldosterona, vasoconstricción de la musculatura lisa vascular y activación simpática a nivel del sistema nervioso central **(Clarke et al. 2013)**. Sin embargo, su sobreactivación puede llevar al desarrollo de ciertas patologías. Por ejemplo, Ang II via activación de receptor de angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>R), activa fosfolipasa C y la vía ERK1/2 a través de la proteína G $\alpha_{q/11}$  e induce hipertrofia del cardiomiocito **(Lorenz et al. 2009)**.

La vía de señalización del receptor de angiotensina II tipo 2 (AT<sub>2</sub>R) es mucho menos conocida, aunque se piensa que actúa vía proteína G $\alpha_i$  **(Clarke**

**et al. 2013**). En ratas en las que se le infundió Ang II y se bloqueó AT<sub>2</sub>R, hubo aumento de tamaño del ventrículo izquierdo, aumento de la síntesis de proteínas y de la traslocación de la proteína kinasa C (PKC) hacia la membrana **(Bartunek et al. 1999)**. En ratas espontáneamente hipertensas propensas al accidente cerebrovascular (SHRSP), la sobreexpresión de AT<sub>2</sub>R mediante la utilización de un lentivirus, disminuyó el grosor de la pared del ventrículo izquierdo en comparación con los animales control, que mostraron un aumento en el grosor **(Metcalf et al. 2004)**. Ratas transgénicas a las que se les indujo hipertrofia por ligación aórtica y que sobreexpresaban AT<sub>2</sub>R, mostraron disminución en el diámetro ventricular izquierdo y disminución en los niveles de colágeno **(Yan et al. 2008)**. Además, la activación de AT<sub>2</sub> se ha asociado con la inducción de la Oxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) en un modelo de ratones diabéticos, indicando un rol de este receptor a nivel de funcionamiento vascular y endotelial **(Taguchi et al. 2012)**. Estos antecedentes sugieren que AT<sub>2</sub>R actuaría como un contraregulador de los efectos mediados por Ang II a través de su receptor AT<sub>1</sub>.



**Figura 2. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona**

Renina convierte al Angiotensinogeno en Ang I, la cual es hidrolizada por ECA generando Ang II, actuando principalmente a través del receptor AT<sub>1</sub>. ECA2 puede hidrolizar a Ang I para generar Ang-(1-9), la cual actúa a través del receptor AT<sub>2</sub>. Además, ECA2 puede hidrolizar a Ang II para generar Ang-(1-7), la cual actúa a través del receptor MAS. Ang-(1-9) puede ser hidrolizada por ECA para formar Ang-(1-7)

Por otra parte, múltiples estudios indican una acción protectora cardiaca de Ang-(1-7). Este péptido previene los efectos prohipertrofos y profibróticos de Ang II en el corazón por medio de su receptor MAS ( **Santos & Maric, 2003; Ferrario et al. 2010**). Ratones transgénicos que sobreexpresan Ang-(1-7), aumentando sus niveles en el plasma, y se les indujo hipertensión arterial mediante la administración de isoproterenol o deoxicorticosterona (DOCA), se protegieron del desarrollo de fibrosis e hipertrofica cardiaca ( **Nadu et al. 2008; Santiago et al. 2010**).



Hasta hace un tiempo, el rol que cumplía Ang-(1-9) en este nuevo sistema contraregulator de SRAA, era no más que el de intermediario en la producción de Ang-(1-7), siendo este último el que cumplía con los roles fisiológicos. Sin embargo nuevos estudios han mostrado que Ang-(1-9) tendría efectos por sí sola, regulando procesos patológicos a nivel cardiaco.

### **1.3.2. Angiotensina-(1-9)**

ECA2 genera a Ang-(1-9) a través de la hidrólisis del aminoácido terminal leucina de Ang I, generando el péptido de 9 aminoácidos (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His) (**Donoghue et al. 2000**). Además, esta conversión puede ser llevada a cabo por catepsina A y carboxipeptidasa A (**Jackman, 2002; Garabelli et al. 2008**). Ang-(1-9) está presente en pacientes voluntarios sanos, en pacientes o en ratones tratados con inhibidores de ECA (iECAs) o antagonistas de AT<sub>1</sub>R y sus niveles circulantes aumentan en etapas tempranas post-infarto al miocardio (**Ocaranza & Jalil, 2012**), permitiendo pensar que Ang-(1-9) podría actuar como un nuevo contrarregulador del eje ECA/Ang II.

### **1.3.3. Angiotensina-(1-9) e hipertrofia cardiaca**

La administración de Ang-(1-9) por medio de una mini bomba osmótica a ratas a las que se les indujo infarto al miocardio (IM) por ligación de la arteria coronaria, redujo los niveles plasmáticos de Ang II, inhibió la actividad de ECA plasmática y tisular (ventrículo izquierdo) y previno la hipertrofia cardiaca vista por disminución del área y perímetro del cardiomiocito, disminución en los niveles de mRNA de ANF (factor atrial natriurético) y de los niveles proteicos de  $\beta$ -MHC (cadena pesada de la beta miosina), ambos biomarcadores de hipertrofia (**Ocaranza et al. 2010**). Dado que Ang-(1-9) puede ser convertida a Ang-(1-7) por acción de ECA y mediar estos efectos anti hipertróficos, se

administró A779, antagonista del receptor MAS, sin observar modificación de en la prevención de la hipertrofia, dando cuenta que Ang-(1-9) posee acción anti hipertrófica per se, sin la mediación de Ang-(1-7). En este mismo estudio, experimentos *in-vitro* utilizando cardiomiocitos de rata, a los que se les indujo hipertrofia por estimulación con NE o IGF-1, Ang-(1-9) mostró los mismos efectos anti hipertróficos observados *in-vivo*, el cual no se modificó por A779 **(Ocaranza et al. 2010)**.

Un segundo estudio realizado en células H9c2 (mioblastos de rata neonata inmortalizados) y en cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de conejo adulto a los que se les indujo hipertrofia por estímulo con Ang II y vasopresina, tanto Ang-(1-7) como Ang-(1-9) previnieron el aumento en el tamaño de los cardiomiocitos y la expresión de marcadores de hipertrofia **(Flores-Muñoz et al. 2011)**. La adición de losartan previno la hipertrofia producida por Ang II pero no la generada por vasopresina. El efecto anti hipertrófico de Ang-(1-9) y de Ang-(1-7), bajo el estímulo de vasopresina, no fue modificado por losartan, indicando que el receptor AT<sub>1</sub> no cumpliría un rol directo en la acción de estos dos péptidos. A779 solamente bloqueó la respuesta de Ang-(1-7) sin afectar la de Ang-(1-9), confirmando que el efecto de Ang-(1-9) es independiente de la acción de Ang-(1-7). Interesantemente, se observó que el antagonista del receptor AT<sub>2</sub> PD123,319 no afectó el efecto anti hipertrófico de Ang-(1-7), pero si bloqueó el de Ang-(1-9), sugiriendo que este péptido actuaría a través de este receptor. Estudios de radioligando indicaron que Ang-(1-9) interactúa con el receptor AT<sub>2</sub> (pK<sub>i</sub> = 6.28 ± 0.1) **(Flores-Muñoz et al. 2011)**.

Los datos anteriores indican que el péptido Ang-(1-9) ejerce por si solo un efecto preventivo a nivel cardiaco frente distintos estímulos pro hipertróficos. Sin embargo, la vía de señalización intracelular por la cual actuaría este péptido, hasta la fecha, es completamente desconocida.

Como describimos anteriormente, existe una relación bidireccional entre el desarrollo de hipertrofia y la modificación de la dinámica mitocondrial en cardiomiocitos de rata neonata, observando que el estímulo de NE junto con generar hipertrofia además de fisiónar la red mitocondrial. Además, el inducir fusión mitocondrial previno el desarrollo de hipertrofia provocada por NE. Junto con esto, teniendo en cuenta que Ang-(1-9) previene la respuesta hipertrófica, las preguntas que surgen son:

- ¿El efecto anti-hipertrófico de Ang-(1-9) tendrá alguna incidencia en la morfología mitocondrial?
- ¿Ang-(1-9) tendrá algún efecto sobre la fisión mitocondrial producida por NE?

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

“Angiotensina-(1-9) previene el efecto prohipertrófico de norepinefrina sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocitos”

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Investigar el efecto de angiotensina-(1-9) sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocitos de rata estimulados con Norepinefrina

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**Objetivo específico 1:** Estudiar los efectos de angiotensina-(1-9) sobre la morfología de la red mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos

**Objetivo específico 2:** Determinar si angiotensina-(1-9) previene los efectos prohipertróficos de NE sobre la red mitocondrial del cardiomiocito

**Objetivo específico 3:** Evaluar el papel de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial en el efecto de angiotensina-(1-9).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. 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, PD 123,319 y el anticuerpo anti  $\beta$ -tubulina (T4026). El péptido angiotensina-(1-9) se adquirió en GL Biochem. El cocktail de inhibidores de proteasas complete Mini (11 836 170 001) y el cocktail inhibidores de fosfatasas PhosSTOP (04 906 837 001) se adquirieron en Roche Applied Science (Penzberg, Alemania). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). 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). Los anticuerpos anti Opa-1 y anti Mfn2, se compraron en Abcam (Cambridge, MA, EEUU). De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron: colagenasa tipo II, suero fetal bovino (FBS) y suero de ternera (FCS). Mitotracker Green-FM (M7514) 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). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot EZ-ECL (20-500-1000) se adquirió en Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU). La albúmina de suero bovino (BSA) se adquirió en Winkler Ltda. (Santiago, Chile). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

## **5.2. Modelo experimental**

En esta tesis se utilizó como modelo experimental cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata, los cuales se obtuvieron a partir de ratas neonatas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 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 (National Institutes of Health, EEUU, 2011), siendo los protocolos experimentales aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## **5.3. Cultivos primarios de ratas neonatas**

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, los corazones de ratas neonatas se removieron y lavaron en medio Hank's estéril a 37°C. Las aurículas se eliminaron y los ventrículos se disgregaron mecánicamente para ser sometidos a digestiones enzimáticas sucesivas con colagenasa tipo II (0,02 g/100 mL Hank's) y pancreatina (0,06 g/100 mL Hank's). Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial a superficies plásticas que presentan los dos tipos celulares presentes en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos). El producto de la digestión enzimática se pre-plaqueó en placas de 100 mm durante 2 h a 37 °C en medio DME:M199 (4:1) (Medio de mantención, MM) 10% SFB. Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron, se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 5 min y se resuspendieron en 20 mL de MM 5% FBS y 10% FCS. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán, el cual permite visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer. Conocida su concentración, los cardiomiocitos se sembraron en MM 5% FBS-10% FCS a distintas densidades, según las necesidades

experimentales, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina 100  $\mu$ M, sobre placas de cultivo cubiertas previamente con una monocapa de gelatina (2% p/v). Las células se mantuvieron en incubadores termorregulados a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% aire. Luego de aproximadamente 24 h, las células se lavaron para retirar los residuos propios del cultivo primario y se mantuvieron en MM sin SFB por 24 h antes de exponerlos a cualquier estímulo.

#### **5.4. Estímulos**

Para evaluar su efecto sobre la dinámica mitocondrial, las células se trataron con Angiotensina-(1-9) 100  $\mu$ M entre 0 y 24 h. El estímulo pro-hipertrófico empleado fue NE 10  $\mu$ M por 24 h previa incubación con Angiotensina-(1-9) 100  $\mu$ M por 6h. Los antagonistas se agregaron 30 min previos y se mantuvieron durante los estímulos, a las concentraciones indicadas para cada uno de ellos.

#### **5.5. Preparación de extractos celulares totales**

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células/placa. Una vez finalizado el estímulo, las células se lavaron tres veces con solución de PBS fría y luego se lisaron con 80  $\mu$ L de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1%; tritón X-100 1% v/v) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasa (Roche). El homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 20 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo y se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay,

BioRad, Hercules, CA, EEUU). Finalmente el extracto se desnaturalizó en tampón SDS-PAGE 4x, para ser almacenado posteriormente a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **5.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida 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  $\mu\text{g}$  de extracto proteico total. El gel concentrador se preparó al 3% y el separador al 10% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%) a un voltaje constante de 80 V durante 30 min y luego a 110 V hasta el final de la corrida electroforética. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, EEUU) de 0,45  $\mu\text{m}$  a amperaje constante de 400 mA por 90 min en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM).

### **5.7. Western blot**

Una vez realizada la electrotransferencia, las membranas se trataron 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 el anticuerpo primario (anti Mfn2 1:1.000; anti OPA1 1:1.000; anti p-Drp1 1:500) en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1 %; leche descremada 5% p/v) toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón, según corresponda, conjugado con peroxidasa de rabanito a una dilución de 1:5.000 en tampón de incubación. Para la detección, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución de sustrato quimioluminiscente para



Western blot EZ-ECL y se expusieron en el equipo de revelado G:BOX XT4 (Syngene), donde se obtuvieron imágenes digitales las cuales fueron analizadas con la ayuda del programa Image J (NIH, EEUU). 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 en las cantidades de proteínas cargadas en el gel, se analizaron los niveles de  $\beta$ -tubulina (1:5.000) o de Drp1 total (1:1.000), mediante reacciones de inmunodetección iguales a las descritas anteriormente.

### **5.8. Inmunofluorescencia indirecta**

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de  $0,25 \times 10^6$  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 la morfología de este organelo, las células se incubaron con los anticuerpos anti-Drp-1 (dilución 1:500) y anti-Fis-1 (dilución 1:1.000) en PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Se lavaron nuevamente con PBS y luego se incubaron por 1 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). Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje, el cual además retarda el decaimiento de la fluorescencia. Posteriormente, las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss

Microsystems, Oberkoche, Alemania). El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J como se describe en detalle más adelante.

### **5.9. Visualización de la morfología mitocondrial**

Finalizados los estímulos correspondientes, los cardiomiocitos se lavaron tres veces con solución tampón Krebs (NaCl 145 mM; KCl 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,6 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; Hepes 10 mM; glucosa 5,6 mM) y luego se incubaron por 25 min a 37°C con la sonda Mitotracker Green-FM 400 nM preparada en la misma solución, a partir de un stock al 20% en DMSO. Luego de la incubación, las células se lavaron nuevamente con solución Krebs y los cubreobjetos se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 µL de solución Krebs. Posteriormente, utilizando un microscopio confocal invertido Carl Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert 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 de 488 nm. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron como secuencias de profundidad en el eje Z cada 0,4 µm, siendo cada secuencia de 10 imágenes. Se utilizó el lente objetivo de 63x el cual posee una apertura numérica de 1,4. Las dimensiones de las imágenes fueron de 1024 x 1024 píxeles.

### **5.10. Análisis digital de imágenes**

Una vez obtenidas las secuencias de imágenes con la sonda MTG éstas se deconvolucionaron, mediante el software Image J, 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. Al finalizar la deconvolución se cuantificó el

número de partículas teñidas con MTG (número de objetos), así como su volumen promedio, utilizando el programa accesorio 3D Object Counter para Image J. La cuantificación digital de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta se realizó, sobre las imágenes deconvolucionadas, 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.

#### **5.11. 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, o mediante el test t de Student cuando corresponda, considerándose como significativo un  $p < 0,05$ .

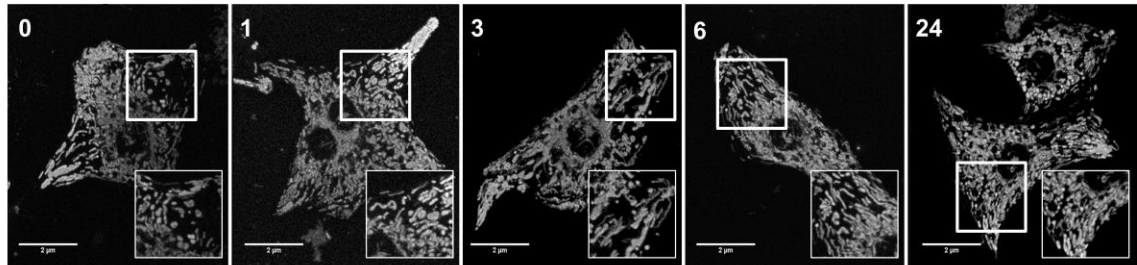
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Objetivo 1: Estudiar los efectos de angiotensina-(1-9) sobre la morfología de la red mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos

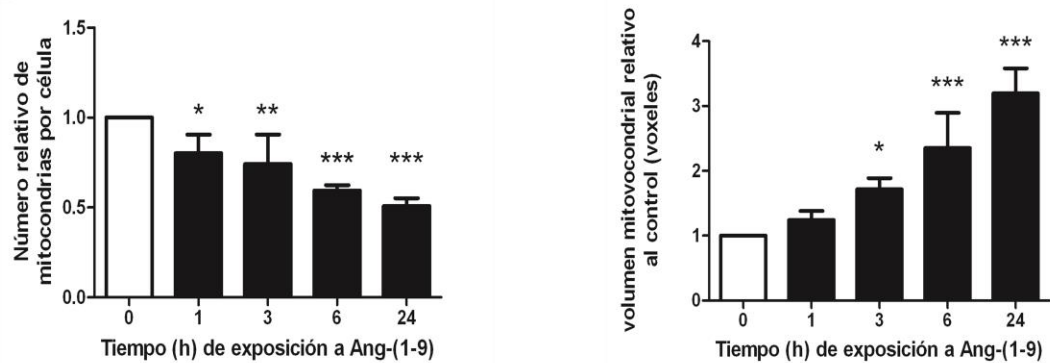
La morfología y función de las mitocondrias están reguladas por eventos de fisión y fusión, observándose distintas alteraciones de estos procesos en el desarrollo de patologías cardíacas (**Ong, Hall, & Hausenloy, 2012; Dorn, 2013**). Sin embargo, poco se conoce que efectos sobre la dinámica mitocondrial inducen los estímulos cardioprotectores, como lo es Ang-(1-9), de la cual se ha demostrado que posee propiedades anti-hipertróficas (**Ocaranza et al. 2010; Flores-Muñoz et al. 2011**). Para responder esta interrogante, cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas se trataron con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M por 0, 1, 3, 6 y 24 h y se observó la morfología mitocondrial a los distintos tiempos mediante microscopía confocal y tinción con Mito Tracker Green TM (400 nM).

La **Figura 3A** muestra una imagen representativa de la morfología mitocondrial observada para cada tiempo de exposición a Ang-(1-9), observándose una red mitocondrial más fusionada según aumenta el tiempo de incubación. Para poder realizar un análisis más objetivo de esta observación, se cuantificó el número de mitocondrias y el volumen mitocondrial promedio por célula utilizando el software ImageJ (**Figura 3B**). Los gráficos muestran la cuantificación de estos parámetros, observándose por una parte una disminución significativa en el número de mitocondrias por célula y un aumento en el volumen mitocondrial promedio, lo que da cuenta del fenotipo mitocondrial fusionado que es inducido por el estímulo de Ang-(1-9).

A



B

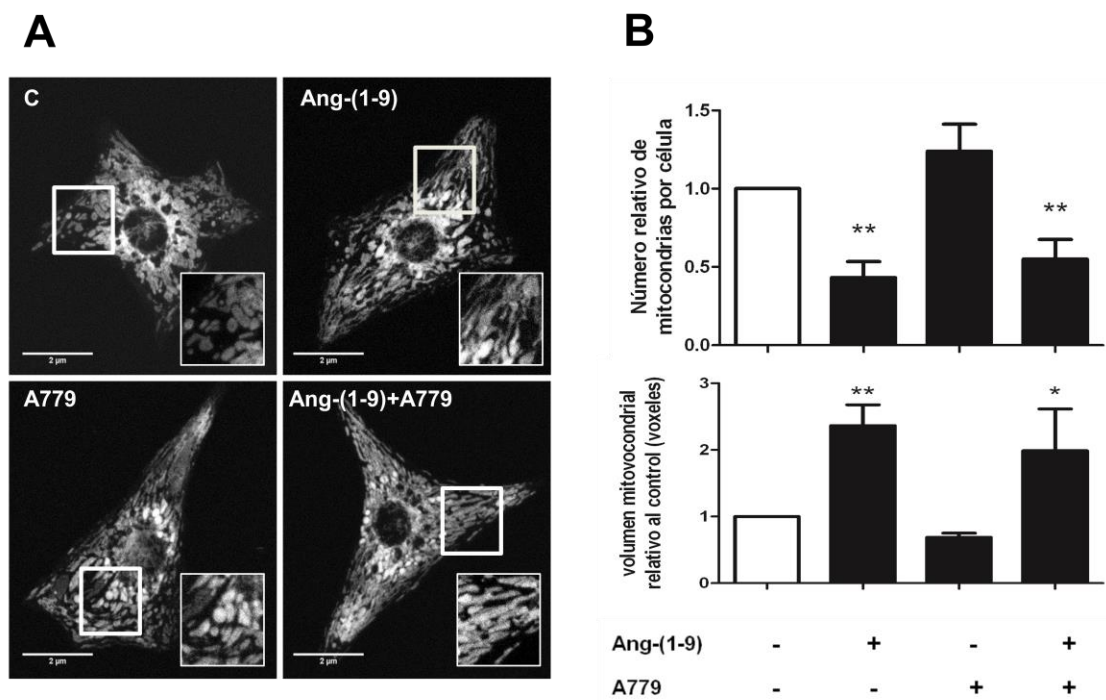


**Figura 3. Efecto de Angiotensina-(1-9) sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito.** A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cardiomiocitos tratados con Ang(1-9) 100  $\mu$ M por 0, 1, 3, 6 y 24 h. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal y tinción con Mito Tracker Geen TM. B) Cuantificación del número de mitocondrias relativo al control y volumen mitocondrial relativo al control (n= 4 experimentos independientes). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 y \*\*\* $p$ <0.001 con respecto al control. Escala 2  $\mu$ m.

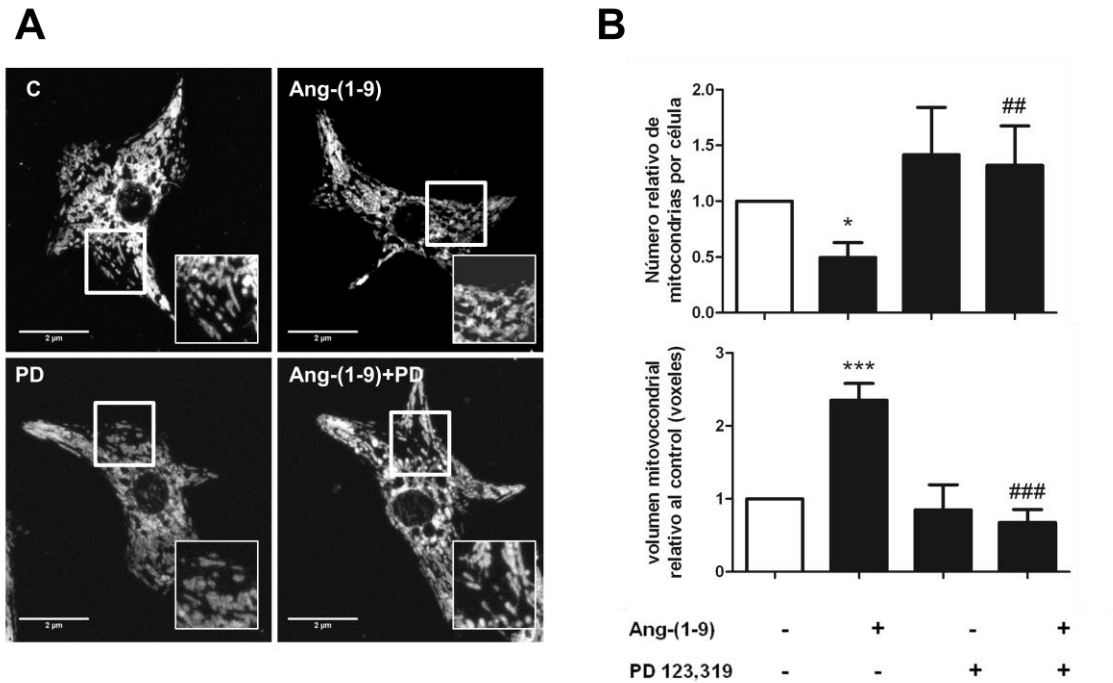
Ang(1-9) es parte del SRAA, la cual se forma a partir de ECA2. Pero junto con esto, Ang(1-9) puede ser transformada en Ang(1-7) (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008), la cual puede mediar efectos protectores cardiacos mediante la interacción con el receptor MAS (Ferrario et al. 2010). Para descartar que el efecto sobre la dinámica mitocondrial que observamos se deba a la acción de Ang(1-7) (previa hidrólisis de Ang(1-9)), utilizamos el antagonista del receptor MAS A779. Los cardiomiocitos se pre-incubaron por 30

min con A779 10  $\mu$ M y posteriormente se co-incubaron por 6 h con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M. La **Figura 4A** muestra una imagen representativa de la morfología mitocondrial que se observó en cada condición. La **Figura 4B** se muestra la cuantificación del número de mitocondrias por células y el volumen mitocondrial promedio, que dan cuenta de tipo de morfología mitocondrial observado. La pre-incubación con A779 no afectó significativamente la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9), dando cuenta que este efecto es independiente de la acción vía el receptor MAS.

Recientemente se ha descrito en la literatura, que el efecto anti-hipertrófico de Ang-(1-9) es mediado por el receptor AT2 (**Flores-Muñoz et al. 2011**). Para observar si la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9) también es mediada por este receptor, se pre-incubaron a los cardiomiocitos por 30 min con el antagonista del receptor AT2, PD 123,319 (1  $\mu$ M) y luego se co-incubaron por 6 h con Ang-(1-9). En la **Figura 5A** se muestra una imagen representativa de la red mitocondrial observada bajo esas condiciones. En la **Figura 5B** se muestra la cuantificación de la morfología mitocondrial. La pre-incubación con PD 123,319 bloqueó la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9), no observándose cambios ni el número ni en el volumen promedio, dando cuenta que este efecto sería mediado por el receptor AT2.



**Figura 4. Participación del receptor MAS en la fusión mitocondrial mediada por Angiotensina-(1-9).** A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cardiomiocitos tratados con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M por 6 h con o sin pre-incubación de 30 min con A779. Las imágenes se obtuvieron por microscopia confocal y tinción con Mito Tracker Geen TM. B) Cuantificación del número de mitocondrias relativo al control y volumen mitocondrial relativo al control ( $n= 3$  experimentos independientes). \* $p<0.05$  y \*\* $p<0.01$  con respecto al control. Escala 2  $\mu$ m.

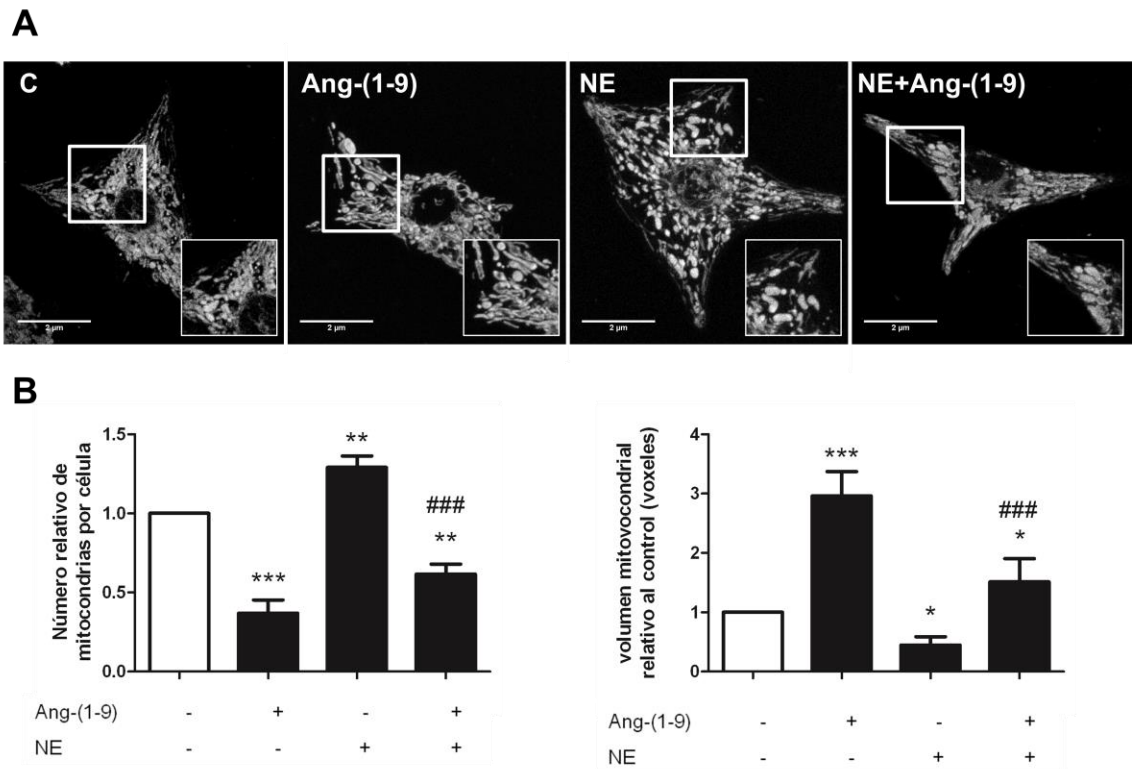


**Figura 5. Participación del receptor AT2 en la fusión mitocondrial mediada por Angiotensina-(1-9).** A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cardiomiocitos tratados con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M por 6 h con o sin pre-incubación de 30 min con PD 123,319 (PD). Las imágenes se obtuvieron por microscopia confocal y tinción con Mito Tracker Geen TM. B) Cuantificación del número de mitocondrias relativo al control y volumen mitocondrial relativo al control (n= 4 experimentos independientes). \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  con respecto al control; ## $p < 0.01$  y ### $p < 0.001$  con respecto a Ang-(1-9). Escala 2  $\mu$ m.



## **6.2. Objetivo 2: Determinar si Angiotensina-(1-9) previene la fisión mitocondrial inducida por norepinefrina.**

Se ha descrito en la literatura que Ang-(1-9) previene la hipertrofia en cardiomiocitos frente a distintos estímulos pro-hipertroficados, entre ellos NE (**Ocaranza et al. 2010; Flores-Muñoz et al. 2011**). Junto este antecedente, recientemente nuestro laboratorio ha descrito la existencia de una estrecha relación entre la dinámica mitocondrial y el desarrollo de hipertrofia, donde NE junto con generar hipertrofia del cardiomiocito fisiónó la red mitocondrial (**Pennanen, 2012**). Además, cuando se intervino la red mitocondrial y se indujo fusión, se previno el desarrollo de hipertrofia inducida por NE. Con esto, es de esperar que si por una parte Ang-(1-9) previene el desarrollo de hipertrofia, también tenga alguna incidencia en la fisión mitocondrial inducida por el estímulo pro-hipertrofico de NE. Para comprobar esto, se pre-incubaron cardiomiocitos con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M por 6 h y luego se co-incubaron con NE 10  $\mu$ M por 24 horas y se obtuvieron imágenes de la red mitocondrial mediante microscopia confocal y tinción con Mito Tracker Green.



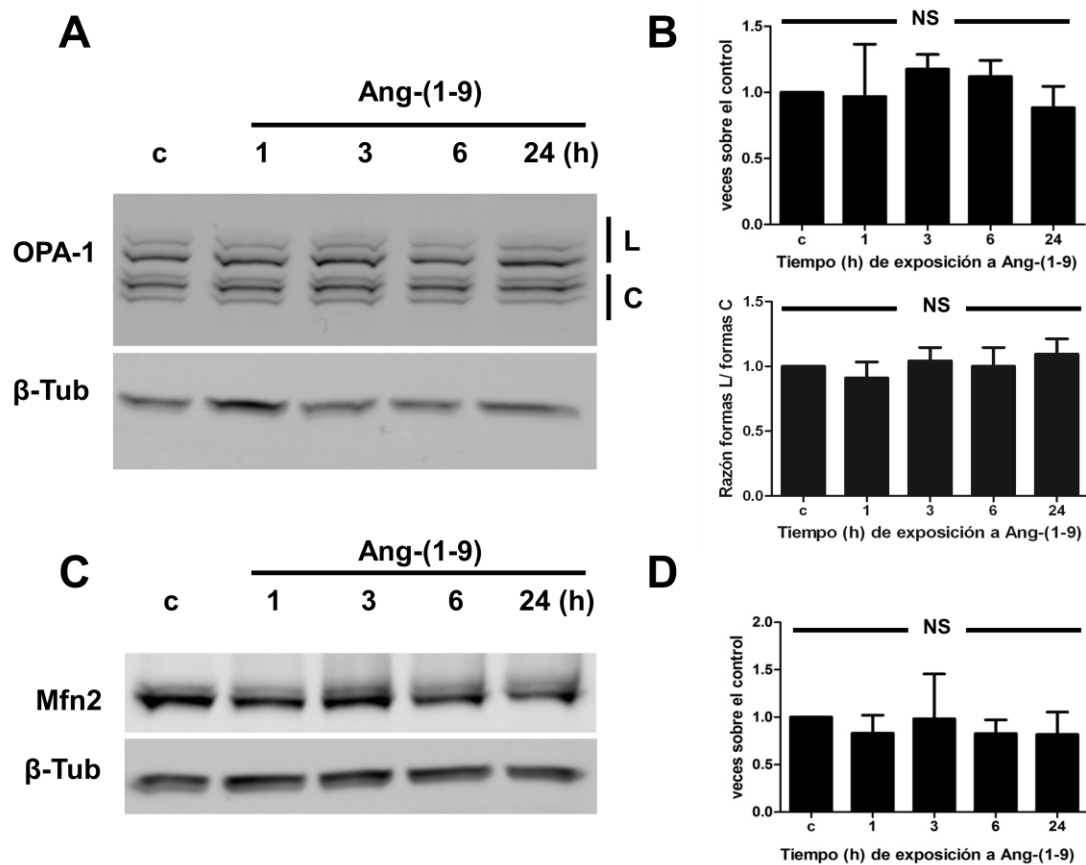
**Figura 6. Efecto de angiotensina-(1-9) y norepinefrina sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito.** A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cardiomiocitos tratados con NE 10  $\mu$ M por 24 h con o son pre-incubación de Ang-(1-9) 100  $\mu$ M por 6 h. Las imágenes se obtuvieron por microscopia confocal y tinción con Mito Tracker Geen TM. B) Cuantificación del número de mitocondrias relativo al control y volumen mitocondrial relativo al control (n= 4 experimentos independientes). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 y \*\*\* $p$ <0.001 con respecto al control; ### $p$ <0.001 con respecto a NE. Escala 2  $\mu$ m.

La **Figura 6A** muestra una imagen representativa de la morfología mitocondrial observada frente al estímulo con NE con o sin previa pre-incubación con Ang-(1-9). Se observa una red mitocondrial más fusionada cuando se pre-incubó con Ang-(1-9) comparada con los cardiomiocitos que fueron estimulados solo con NE, donde se puede observar una red mitocondrial fisionada. Para poder realizar un análisis más objetivo de esta observación, se cuantificó el número de mitocondrias y el volumen mitocondrial relativo por célula utilizando el software ImageJ (**Figura 6B**). Los gráficos muestran la cuantificación de estos parámetros, observándose por una parte un aumento significativo en el número de mitocondrias por célula y una disminución en el volumen mitocondrial promedio en las células que fueron tratadas con NE, lo que da cuenta del fenotipo mitocondrial fisionado. Cuando se pre-incubó con Ang-(1-9) estos cambios no se observaron.

### **6.3. Objetivo 3: Determinar la participación de las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial en el efecto de angiotensina-(1-9) sobre la morfología mitocondrial**

Para determinar la participación de las proteínas Opa-1 y Mfn2 en la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9), se obtuvieron extractos proteicos totales de cardiomiocitos tratados con Ang-(1-9) por 0, 1, 3, 6 y 24 h y mediante Western blot se midieron los niveles de estas proteínas. La **Figura 7** muestra imágenes representativas y las cuantificaciones densitométricas, no observándose modificaciones significativas frente a los estímulos con Ang-(1-9). Por otra parte, se ha mostrado 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 fragmentación mitocondrial (**Head et al & Van der Blik, 2009**), por lo que probablemente una disminución en el procesamiento y acumulación de las formas largas de OPA1 pudiesen generar

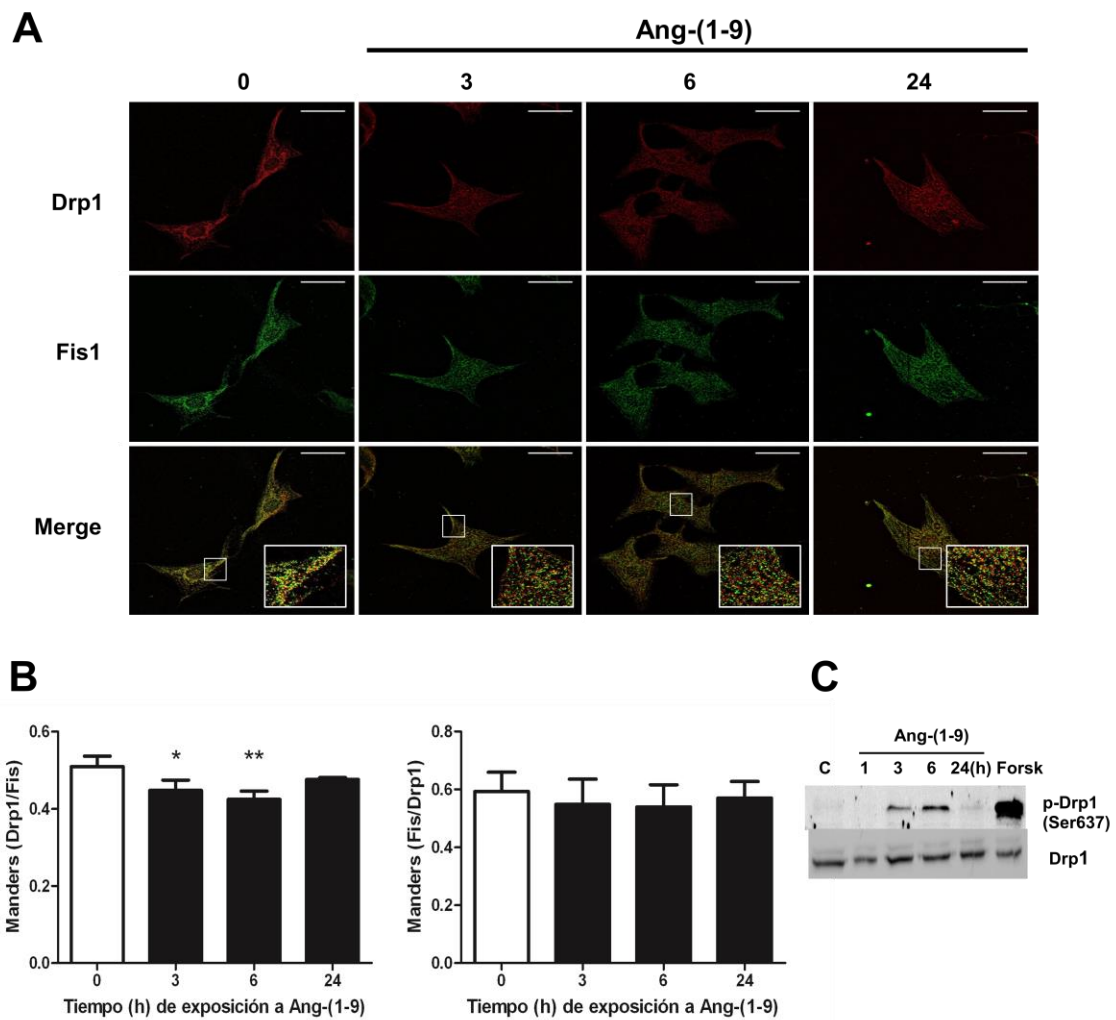
fusión mitocondrial. La **Figura 7B**, muestra la relación entre formas largas (L) y formas cortas(C), sin observarse cambios significativos en esta razón. Con esto, la participación de estas proteínas que median procesos de fusión mitocondrial no tendría mayor importancia en el efecto de Ang-(1-9) sobre la red mitocondrial.



**Figura 7. Efecto de Ang-(1-9) en los niveles de las proteínas OPA-1 y Mfn2**

Cultivos primarios de cardiomiocitos fueron tratados con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M por 0, 1, 3, 6 y 24 h y luego se obtuvieron los extractos proteicos totales y se determinó, mediante Western, los niveles de las proteínas. A) Western blot representativo de OPA-1, B) análisis densitométrico: grafico superior, bandas totales de OPA-1; grafico inferior, relación bandas largas (L) versus bandas cortas (C). C) Western blot representativo de Mfn2, D) análisis densitométrico. Como control de carga se utilizo  $\beta$ -tubulina. NS: no significativo.

Drp1 se encuentra mayormente en el citosol y es necesario que migre hacia la mitocondria para poder fisioarla. Una menor translocación de esta proteína podría estar relacionada con la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9). Para observar este proceso, se evaluó por inmunocitoquímica la translocación de Drp1 hacia la mitocondria, utilizando a Fis1 como marcador mitocondrial y así poder determinar el grado de localización. Los resultados de colocalización muestran una disminución significativa en el coeficiente de Manders para la proteína Drp1, luego del tratamiento con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M por 3 y 6 h, indicando una disminución en la migración de esta proteína de fisión hacia la mitocondria. Por otra parte, se han descrito en la literatura modificaciones post-traduccionales para Drp1, entre ellas la fosforilación inactivante en Ser637 de la cadena aminoacídica ( **Chang & Blackstone, 2007; Cereghetti et al. 2008**), por lo que esta modificación fue evaluada mediante Western blot, observándose aumento en la fosforilación a los tiempos 3 y 6 h de tratamiento. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha podido obtener un único N de este experimento, debido a lo dificultoso de la técnica, por lo que es necesario la reproducción de este resultado



**Figura 8. Efecto de angiotensina-(1-9) sobre la translocación hacia la mitocondria y fosforilación de Drp1.** A) Imagen representativa de inmunofluorescencia indirecta de Drp1 y Fis, utilizado como marcador mitocondrial, en cardiomiocitos tratados con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M por 0, 3, 6 y 24 horas. B) Cuantificación de los coeficientes de Manders para Drp1 sobre Fis1 y viceversa (N=3). C) Western blot para la fosforilación de Drp1 en Ser 637 de cardiomiocitos tratados con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M a los tiempos indicados y como control de fosforilación se utilizó Forskolina (N=1). \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ . Escala 10  $\mu$ m.

## 7. DISCUSIÓN

El corazón demanda altas cantidades de ATP con el fin de cumplir con su función básica, que es la de latir y bombear sangre hacia nuestros tejidos. La mayor parte de esta energía proviene de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y en un menor porcentaje de la oxidación de glucosa. Ambos procesos son llevados a cabo en la mitocondria, razón por la cual, el funcionamiento de este organelo es clave para la homeostasis del corazón. La mitocondria es un organelo de doble membrana, cuya función y morfología están reguladas por procesos de fusión y fisión. Una red mitocondrial fusionada ha sido relacionada con un aumento en el consumo de oxígeno y producción de ATP, en cambio la fisión mitocondrial ha sido relacionada en su mayoría con un deterioro de la función de este organelo.

Con estos datos, no es raro, dado la dependencia del corazón de la función mitocondrial, observar que en patologías cardíacas la de dinámica mitocondrial se encuentre alterada.

En muestras humanas de corazón con cardiomiopatía isquémica se observó una disminución en los niveles de OPA-1 junto con un aumento de los niveles de Mfn1, Mfn2 y Drp1. La disminución de Opa1 también se observó en corazones de ratones con insuficiencia cardíaca post-isquémica junto con la observación de mitocondrias más pequeñas y desorganizadas en corazón. **(Chen et al. 2009)**. Junto con estos datos, el desarrollo progresivo de cardiomiopatía dilatada, fragmentación mitocondrial y defectos en la respiración mitocondrial fue también observado en ratones *knock-out* para Mfn1 y Mfn2 **(Chen, et al. 2011)**.

La hipertrofia cardiaca es una respuesta adaptativa a múltiples estímulos, entre ellos NE. Un estudio reciente mostró que NE, junto con inducir hipertrofia del cardiomiocito, fisionó la red mitocondrial, disminuyó el consumo de oxígeno y la producción de ATP, factores que darían cuenta de una disfunción mitocondrial en el desarrollo de hipertrofia **(Pennanen, 2012)**. Interesantemente, la inducción de fisión mitocondrial, mediante la utilización de un adenovirus que expresa una proteína antisentido de Mfn2, generó hipertrofia del cardiomiocito, aumentando el área, sarcomerización y los niveles de marcadores propios de la hipertrofia, reafirmando la importancia de la función mitocondrial para el cardiomiocito y dando cuenta de la relación bi-direccional de estos procesos.

En la literatura existen evidencias que postulan que la modulación de la morfología mitocondrial podría ser utilizada como estrategia terapéutica para generar cardioprotección. Sobre-expresión de Mfn1, Mfn2 o la utilización de un dominante negativo o un siRNA para Drp1, mostraron un menor porcentaje de muerte frente al daño por isquemia/reperfusión **(Ong et al. 2010; Wang et al. 2011)**. Estos datos apuntan a que la inducción de fusión mitocondrial sería cardioprotectiva. Sin embargo, en corazones de rata adulta deficientes de Mfn2 mostraron menor susceptibilidad al daño y disminución del tamaño de infarto post-isquemia/reperfusión, siendo posible que las funciones de Mfn2 varíen durante la maduración del cardiomiocito **(Papanicolaou et al. 2011)**.

Resultados de nuestro Laboratorio en un modelo de cardiomiocitos neonatos muestran que la inducción de fusión mitocondrial, mediante la utilización de Drp<sub>K38A</sub>, previno la respuesta hipertrófica frente al estímulo con NE **(Pennanen, 2012)**, por lo que en este caso, la mantención de una red fusionada, sería clave para la prevención de hipertrofia patológica.



Por otra parte, Ang-(1-9) es un miembro reciente del SRAA, el cual es generado a partir de la hidrólisis de Ang I por la ECA2 y se ha postulado que cumpliría un rol contra-regulador del eje clásico de ECA/Ang I/AT1. Ang-(1-9) previene la hipertrofia cardíaca inducida por Ang II, vasopresina, IGF-1 y NE **(Ocaranza et al. 2010; Flores-Muñoz et al. 2011)**.

Dado que la hipertrofia patológica inducida por NE puede ser prevenida tanto por inducción de fusión mitocondrial y por pre-incubación con Ang-(1-9), este estudio se enfocó en buscar si también existe alguna relación entre ambos procesos. En primer lugar, él solo estímulo con Ang-(1-9) induce fusión de la red mitocondrial en forma tiempo-dependiente, mostrando cambios tanto en la disminución de objetos y aumento del volumen promedio a partir de las 3 h, siendo el primer estudio que documenta este resultado en algún tipo de modelo. Como el estímulo pro-hipertrófico con NE indujo fisión mitocondrial y la hipertrofia inducida por este estímulo es prevenida por Ang-(1-9), observamos si Ang-(1-9) previene la fisión mitocondrial inducida por NE. La pre-incubación de 6 h con Ang-(1-9), periodo en el cual la red mitocondrial se encuentra fusionada, es capaz de prevenir la fisión mitocondrial inducida por el estímulo pro-hipertrófico de NE, además de mantener la red fusionada. Estos resultados, dan cuenta nuevamente de la relación que existe entre la dinámica mitocondrial e hipertrofia, dado que el estímulo anti-hipertrófico induce el efecto contrario al estímulo pro-hipertrófico sobre la morfología. Sin embargo, en el futuro es clave estudiar si la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9) es un proceso clave en su mecanismo anti-hipertrófico.

### **7.1. Proteínas involucradas en la fusión mitocondrial inducida por Angiotensina-(1-9)**

El control de la morfología mitocondrial depende del nivel y actividad de ciertas proteínas que son las encargadas de modular los procesos de fusión y fisión. Se ha observado una disminución de la proteína Opa1 en pacientes y ratones con cardiomiopatía isquémica, pero no así en pacientes con cardiomiopatía dilatada (**Chen et al. 2009**). Por otra parte, ratones *knock out* para Mfn2 mostraron mitocondrias fragmentadas y desarrollo progresivo de cardiomiopatía diabética (**Chen et al. 2011**), mientras que la sobre-expresión de Mfn2 en células HL-1, protegió del daño por isquemia y reperfusión. En un modelo más similar al nuestro, la hipertrofia inducida por fenilefrina estuvo acompañada por una disminución en los niveles de Mfn2 (**Fang et al. 2007**). Estos datos hacen pensar que la modulación de los niveles de estas proteínas es un factor importante para la homeostasis cardiaca, por lo que posiblemente puedan estar involucradas en la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9). Sin embargo, no hubo una modificación significativa en los niveles de Opa1 ni Mfn2, lo que da cuenta probablemente de que estas proteínas no forman parte del mecanismo por el cual Ang-(1.9) induce fusión.

La manipulación de la actividad de Drp1 modula la morfología mitocondrial y la respuesta del cardiomiocito a estímulos patológicos. La utilización del inhibidor farmacológico de Drp1, mdivi-1, previno el daño causado por isquemia y reperfusión, retardando la apertura del poro de transición mitocondrial y redujo la muerte en células HL-1 y en cardiomiocitos de rata adulta. Además, pre-tratamiento de ratas adultas, con un bolo intra-venoso de mdivi-1, redujo el área infartada y la fragmentación mitocondrial observada por microscopia electrónica (**Ong et al. 2010**). En ratones que sobre-expresaban miRNA-499 a nivel cardiaco y que fueron expuesto a daño por isquemia y

reperfusión, mostraron menor tamaño de infarto y muerte de células cardíacas por apoptosis comparado con los controles, evento que sería mediado por una disminución en la fragmentación mitocondrial por una menor translocación de Drp1 hacia mitocondria (**Wang et al. 2011**). En un modelo de cardiomiocitos neonatos con hipertrofia inducida por NE, la translocación de Drp1 hacia mitocondria se vio aumentada. Además, cuando se utilizó Drp<sub>K38A</sub> se indujo fusión mitocondrial y se previno el desarrollo de hipertrofia (**Pennanen, 2012**). Estos antecedentes hacen pensar de que la migración de Drp1 pudiese estar modulada por el estímulo con Ang-(1-9). Además se observó una disminución en la translocación de Drp1 hacia la mitocondria, a los tiempos 3 y 6 h de incubación con Ang-(1-9). Si bien esta disminución es estadísticamente significativa, no representa un gran porcentaje de cambio, por lo que su importancia radicaría en la disminución sostenida en el tiempo del tono basal de migración de Drp1 hacia la mitocondria. Junto con esto, la fosforilación en el sitio inhibitorio Ser637 aumentó a los tiempos 3 y 6 h, lo que explicaría la menor migración de Drp1 hacia mitocondria y con esto disminución en la fisión mitocondrial, lo que llevaría finalmente a una red mitocondrial más fusionada. Sin embargo, las **Figuras 3 y 6** muestran que la fusión mitocondrial se mantiene a tiempos más largos, pero no se acompaña ni con una disminución en la migración ni un aumento en la fosforilación en Ser637 de Drp1 a las 24 h. Posiblemente este resultado se deba a que en conjunto con una disminución en la migración de Drp1, exista modulación además en alguna proteína adaptadora en mitocondria lo que daría como resultado la incapacidad de Drp1 de fisión aunque esté localizada en la mitocondria. Esta hipótesis debe ser estudiada en el futuro, junto con observar si Ang-(1-9) previene la translocación de Drp1 hacia mitocondria inducida por el estímulo pro-hipertrofico de NE.

## **7.2. Participación de los receptores MAS y AT2 en la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9)**

Como mencionamos, Ang-(1-9) es miembro del SRAA, generada a partir hidrólisis de Ang I por la enzima ECA2. Por otra parte, Ang-(1-9) puede convertirse en Ang-(1-7) por acción de enzima ECA. Así mismo, Ang-(1-7) puede ser generada a partir de Ang II por acción de ECA2 (**Fyhrquist & Saijonmaa, 2008**).

En la literatura, existe actualmente un gran número de estudios que demuestran la actividad cardioprotectiva de Ang-(1-7). Entre estos estudios, se demuestra que este péptido es capaz de prevenir los efectos prohipertrofos y profibróticos de Ang II en el corazón (**Santos & Maric, 2003 ; Ferrario et al. 2010**). Junto con esto, ratones transgénicos que sobreexpresan Ang-(1-7), fueron protegidos del desarrollo de fibrosis e hipertrófica cardiaca inducida por hipertension (**Nadu et al. 2008; Santiago et al. 2010**). Además, todos estos efectos son mediados por activación del receptor MAS. Hasta hace un tiempo atrás, se pensaba que la única función de Ang-(1-9) dentro del SRAA era el de ser degradado para la formación de Ang-(1-7). Sin embargo, estudios recientes muestran que Ang-(1-9) posee actividad por sí misma. La administración de Ang-(1-9) previno la hipertrofia cardiaca tanto *in-vivo* como *in-vitro*. Además, la administración de A779, antagonista del receptor MAS, no modificó la prevención de la hipertrofia (**Ocaranza et al. 2010**). Estudios realizados en células H9c2 y en cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de conejo adulto a los que se les indujo hipertrofia por estímulo con Ang II y vasopresina, Ang-(1-9) previno la hipertrofia (**Flores-Muñoz et al. 2011**). A779 no afectó la acción de Ang-(1-9), confirmando que el efecto anti-hipertrófico de Ang-(1-9) es independiente de la acción de Ang-(1-7). Sin embargo, existe la posibilidad en este estudio de que el efecto de Ang-(1-9) sobre la morfología mitocondria sea, en forma completa o en parte, por acción de Ang-(1-7), previa degradación de

Ang-(1-9). La **Figura 4**, muestra la morfología mitocondrial en presencia de Ang-(1-9) y A779, observándose que el efecto de fusión no es inhibido por este antagonista, indicando que este efecto es independiente de la generación y acción de Ang-(1-7).

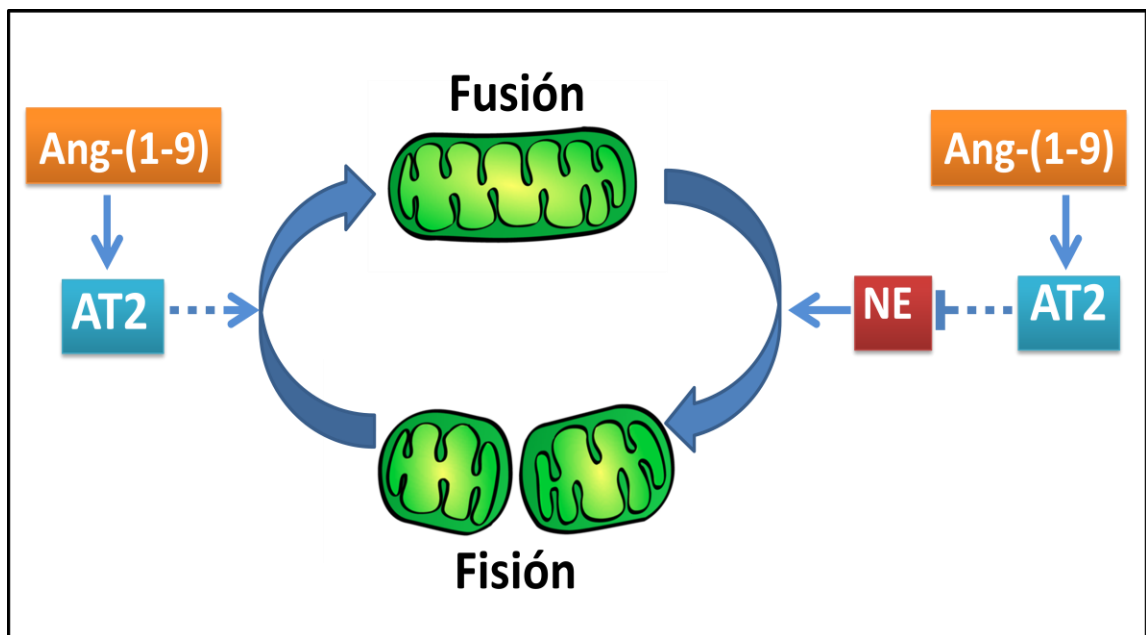
Por otra parte, el receptor AT<sub>2</sub> ha sido asociado como parte del sistema contra-regulador del eje clásico de SRAA, donde AT<sub>1</sub>R cumple un rol principal. El bloqueo de AT<sub>2</sub>R en ratas con hipertrofia inducida por hipertensión, generó un aumento de tamaño del ventrículo izquierdo por sobre el control de ratas hipertensas (**Bartunek et al. 1999**). En ratas transgénicas que sobre-expresaban AT<sub>2</sub>R, mostraron disminución en el grado de hipertrofia inducida por ligación aórtica (**Yan et al. 2008**). Junto con esto, en la literatura existen pruebas de que los efectos de Ang-(1-9) son vía activación de AT<sub>2</sub>R (**Flores-Muñoz et al. 2011**). Por lo tanto, observamos el rol de AT<sub>2</sub>R en el efecto de Ang-(1-9) sobre la dinámica mitocondrial. La **Figura 5**, muestra la morfología mitocondrial en presencia de Ang-(1-9) y PD 123,319, observándose que la fusión, vista por disminución en el número de objetos y aumento en el volumen promedio, es bloqueada en presencia de este antagonista, lo que da cuenta que el efecto sobre la dinámica mitocondrial es mediado por el receptor AT<sub>2</sub>.

## 8. PROYECCIONES

Este es el primer trabajo que muestra que el péptido Ang-(1-9) modula la dinámica mitocondrial de cardiomiocitos neonatos vía receptor AT2. Actualmente, existe mucho interés en estudiar y desarrollar estrategias terapéuticas que tengan como blanco la activación del receptor AT2, para el tratamiento de patologías cardíacas. Recientemente se ha desarrollado un agonista no peptídico del receptor AT2, llamado Compuesto 21 (C21). Estudios muestran que C21 previene el remodelado vascular, el deterioro de la función cardíaca post-infarto al miocardio, disfunción renal, entre otros (**Steckelings et al. 2012**). Esta molécula podría presentar ventajas comparativas versus un péptido, debido a la degradación enzimática de este último. Sin embargo, el compuesto C21 no ha mostrado prevenir el remodelado cardíaco post-infarto al miocardio (**Jehle et al. 2012**), cualidad que sí posee Ang-(1-9). Por lo tanto, la activación del receptor AT2 es de amplio interés farmacológico, efectos que probablemente dependan del ligando que lo active. Por otra parte, la regulación de la dinámica mitocondrial ha sido postulada como una nueva estrategia terapéutica de patologías cardíacas (**Ong et al. 2012; Dorn, 2013; Stetler et al. 2013**). El desarrollo de un inhibidor farmacológico de Drp1, mdivi-1, ha mostrado proteger de la muerte inducida por IR aguda de células cardíacas, al inhibir la fisión mitocondrial (**Ong et al. 2010**). Ang-(1-9) es un péptido endógeno que es capaz de inducir fusión de la red mitocondrial y además prevenir la fisión generada por NE, este último proceso asociado al desarrollo de hipertrofia.

Por lo tanto, los resultados mostrados en este estudio relacionan dos nuevas estrategias terapéuticas de interés, como lo son el estímulo del receptor AT2 y la dinámica mitocondrial en el tratamiento de patologías cardíacas.

En el futuro, queda por terminar de dilucidar la vía de señalización de Ang-(1-9) y si el efecto sobre la dinámica mitocondrial es importante para su efecto anti-hipertrófico.



**Figura 9. Modelo final**

El estímulo con Ang-(1-9) 100  $\mu$ M induce fusión de la red mitocondrial, a partir de las 3 h de estímulo. Además, la pre-incubación por 6h con Ang-(1-9) previene la fisión mitocondrial inducida por NE 10  $\mu$ M 24h.

## 9. CONCLUSIONES

1. Ang-(1-9) fusiona la red mitocondrial de cardiomiocitos neonatos, evidenciada por una disminución en el número de objetos y un aumento en el volumen mitocondrial promedio
2. El aumento de la fusión mitocondrial, está asociado a una menor migración de Drp1 hacia la mitocondria, lo que disminuiría la fisión mitocondrial, lo que da como resultado una red mas interconectada
3. Ang-(1-9) previno la fisión mitocondrial inducida por el estímulo pro-hipertrófico de NE, junto con mantener una red fusionada.
4. El efecto de Ang-(1-9) es independiente de su transformación a Ang-(1-7) y de la activación del receptor MAS, pues el bloqueo de este último, no afecto la fusión mitocondrial inducida por Ang-(1-9)
5. El efecto de Ang-(1-9) es mediado por la activación del receptor AT2, pues al antagonizarlo se bloquea el efecto de Ang-(1-9) sobre la fusión mitocondrial.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

Barth, E. 1992. Ultrastructural quantitation of mitochondria cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Moll Cell Cardiol* 681: 669–681.

Bartunek, J., Weinberg, E. O., Tajima., 1999. Angiotensin II type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin ii in hypertrophied hearts. *Circulation*, 99: 22–25.

Benard, G., Bellance, N., James. et al., 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci*, 120: 838–48.

Cereghetti, G. M., 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 15803–8.

Chan, D. C. 2012. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet*, 46: 265–87.

Chang, C.R., & Blackstone, C. 2007. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem*, 282: 21583–7.

Chang, C.R., & Blackstone, C. 2010. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci*, 1201: 34–9.

Chen, H., & Chan, D. C. 2004. Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol*, 59: 119–144.

Chen, H., Chomyn, A., & Chan, D. C. 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, 280: 26185–92.

Chen, L., 2009. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res*, 84: 91–9.

Chen, Y., 2011. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ Res*, 109: 1327–31.

Clarke, C., 2013. Regulation of cardiovascular remodeling by the counter-regulatory axis of the renin-angiotensin system. *Future cardiol*, 9: 23–38.

Dai, D.F., 2011. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Gαq overexpression-induced heart failure. *Circ Res*, 108: 837–46.

De las Fuentes, L., 2006. Hypertensive left ventricular hypertrophy is associated with abnormal myocardial fatty acid metabolism and myocardial efficiency. *J Nucl Cardiol*, 13: 369–77.

Delettre, C., & Lenaers, G., 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, 26: 207–10.

Doenst, T., 2010. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res*, 86: 461–70.

Donoghue, M., 2000. A Novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ace2) converts angiotensin i to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87: e1–e9.

Dorn, G. W. 2013. Mitochondrial dynamics in heart disease. *Biochim biophys Acta*, 1833: 233–41.

Dorn, G. W., 2011. MARF and OPA1 control mitochondrial and cardiac function in Drosophila. *Circ Res*, 108: 12–7.

Fang, L., 2007. Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Sci*, 80: 2154–60.

Ferrari, R., 2006. Anti-ischaemic effect of ivabradine. *Pharmacol Res*, 53: 435–9.

Ferrario, C. M., 2010. Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). *Adv Pharmacol*, 59: 197–233

Flores-Muñoz, M., 2011. Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J Physiol*, 589: 939–51.

Frezza, C., 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126:177–89.

- Fyhrquist, F., & Saijonmaa, O. 2008. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*, 264:224–36.
- Garabelli, P. J., 2008. Distinct roles for angiotensin-converting enzyme 2 and carboxypeptidase A in the processing of angiotensins within the murine heart. *Exp Physiol*, 93: 613–21.
- Head, B., 2009. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol*, 187: 959–66.
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 589–600.
- Hoppins, S., Lackner, L., & Nunnari, J. 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76: 751–80.
- Jackman, H. L. 2002. angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin a. *Hypertension*, 39: 976–981.
- Lee, Y., & Jeong, S., 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Bio Cell*, 15: 5001–5011.
- Lorenz, K., 2009. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 15: 75–83.
- McMullen, J. R., & Jennings, G. L. 2007. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34: 255–62.
- Metcalfe, B. L., 2004. Prevention of cardiac hypertrophy by angiotensin II type-2 receptor gene transfer. *Hypertension*, 43: 1233–8.
- Mishra, S., 2010. Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56, 598–603.
- Mozdy, A.D., 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol*, 151: 367–80.
- Nadu, A. P., 2008. Reduced isoproterenol-induced renin-angiotensin changes and extracellular matrix deposition in hearts of TGR(A1-7)3292 rats. *J Am Soc Hypertens*, 2: 341–8.

- Ocaranza, M. P., & Jalil, J. E. 2012. Protective role of the ace2/ang-(1-9) axis in cardiovascular remodeling. *Int J hypertens*, 2012: 0-12.
- Ocaranza, M. P., 2010. Angiotensin-(1–9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens*, 28: 1054–1064.
- Olichon, A., 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, 278: 7743–6.
- Ong, S.B., 2012. Mitochondrial dynamics in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 19:400-14
- Ong, S.B., 2010. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 121: 2012–22.
- Osterholt, M., 2012. Alterations in mitochondrial function in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart Fail Rev*, 2012: 0-11.
- Otera, H., 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*, 191: 1141–58.
- Papanicolaou, K. N., 2011. Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Mol Cell Biol*, 31: 1309–28.
- Papanicolaou, K. N., 2012. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 302: 167–79.
- Pennanen, C. (2012). Regulacion de la dinamica mitocondrial del cardiomiocito por igf-1 y norepinefrina. Tesis Doctorado en Farmacologia. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Quimicas y Farmaceuticas, 136p.
- Remondino, A., 2000. Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction. *J Mol cell Cardiol*, 32: 2025–34.
- Santiago, N. M., 2010. Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension*, 55: 889–96.

- Santos, R., & Maric, C. 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 8258–8263.
- Sheeran, F. L., & Pepe, S. 2006. Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *Biochim Biophys Acta*, 1757: 543–52.
- Smirnova, E., 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 12: 2245–56.
- Stanley, W. C., & Chandler, M. P. 2002. Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart fail Rev*, 7: 115–30.
- Stojanovski, D., 2004. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci*, 117: 1201–10.
- Taguchi, K., 2012. Angiotensin II type 2 receptor-dependent increase in nitric oxide synthase activity in the endothelium of db/db mice is mediated via a MEK pathway. *Pharmacol Res*, 66: 41–50.
- Taguchi, N., 2007. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*, 282: 11521–9.
- Thandapilly, S. J., 2011. Resveratrol prevents norepinephrine induced hypertrophy in adult rat cardiomyocytes, by activating NO-AMPK pathway. *Eur J Pharmacol* 668: 217–24.
- Wang, J.X., 2011. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*, 17: 71–8.
- Yan, X., 2008. Pressure overload-induced hypertrophy in transgenic mice selectively overexpressing AT2 receptors in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: 1274–81.
- Yoon, Y., & Krueger, E. 2003. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol*, 23: 5409–5420.
- Zhou, L.Y., 2012. Mitochondrial function in cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol*, 23: 5409-5420