

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



“Angiotensina (1-9) en la señalización del calcio mitocondrial en el cardiomiocito”

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico por:

CRISTIAN ALEJANDRO SOTOMAYOR FLORES

Profesor Patrocinante

Directores de Memoria

Dr. Sergio Lavandero González

Dr. Sergio Lavandero González

Dra. Valentina Parra Ortiz

Santiago – Chile

2013

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 presentaciones a congresos:

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**, Lopez-Crisosto, C, Parra, V, Lavandero, S. Mitochondrial fission induced by norepinephrine in cultured cardiomyocytes is counteracts 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.

Dedicado a mi familia...

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	2
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
SUMMARY.....	10
1. INTRODUCCION.....	12
1.1. Sistema renina-angiotensina.....	12
1.2. Péptidos efectores del SRA.....	14
1.3. Receptores AT1 y AT2.....	18
1.4. RAS e hipertrofia cardiaca	20
2. HIPÓTESIS.....	32
3. OBJETIVO GENERAL.....	32
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.2. Reactivos.....	34
5.3. Medición de cinéticas mitocondriales y citoplasmáticas de calcio	34
5.4. Medición cercanía retículo endoplásmico-mitocondria.....	36
5.5. Análisis digital de imágenes.....	37
5.6. Análisis estadístico.....	37
6. RESULTADOS	38
6.1. Efectos de Ang 1,9, NE e histamina en el Ca ²⁺ mitocondrial	38
6.2. Modulación de la señal de Ca ²⁺ mitocondrial	40
6.3. Efecto de los antagonistas del receptor Mas o AT2	43
6.4. Estudios de colocalización retículo-mitocondria	49
7. DISCUSIÓN.....	52
7.1. Importancia del Ca ²⁺ en el desarrollo de hipertrofia.	52
7.2. Efecto directo sobre el.....	54
aumento en la liberación de Ca ²⁺ desde el RE.	55
7.3. Bloqueo de respuesta con antagonistas.....	56
7.4. Cercanía RE-mitocondria.....	58
8. CONCLUSIONES	61
9. BIBLIOGRAFIA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema renina angiotensina actualizado.	13
Figura 2: Eventos del proceso hipertrófico del cardiomiocito.	21
Figura 3 Respuestas gatilladas por el estrés biomecánico en el miocardio.	22
Figura 4 Esquema de la participación de calcio y calcineurina	24
Figura 5 Dinámica y señalización de Ca^{2+}	26
Figura 6: Angiotensina 1-9 disminuye aumento de calcio inducido por NE.	30
Figura 7: Modulación distancia retículo-mitocondria.	31
Figura 8: Cinética de calcio mitocondrial y pulso de Ang 1-9.	39
Figura 9: Cinética de calcio mitocondrial y pulso de NE.	39
Figura 10: Cinética de calcio mitocondrial y pulso de histamina.	40
Figura 11: Área bajo la curva en cinética de calcio mitocondrial.	40
Figura 12: Cinética de calcio mitocondrial pulsos de histamina.	42
Figura 13: Tiempo en llegar al máximo de fluorescencia.	42
Figura 14: Área bajo la curva cinéticas de histamina.	43
Figura 15: cinética de calcio mitocondrial y antagonistas.	45
Figura 16: Tiempo en llegar al máximo de fluorescencia y antagonistas.	46
Figura 17: Comparación respuesta Ang 1-9 + A779 y Control A779.	47
Figura 18: Comparación respuesta Ang 1-9 + PD123319 y control PD	47
Figura 19: Áreas bajo la curva: calcio mitocondrial y antagonistas.	48
Figura 20: Imágenes del estudio de colocalización retículo mitocondria.	50
Figura 21 y 22: Coeficiente de Manders: estudios de colocalización	51
Figuras 23. Corrección tratamiento con antagonistas.	58
Figura 24. Nuevos candidatos en señalización de calcio:	60
Figura 25: Modelo final.	63

ABREVIATURAS

µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
µM	: Micromolar
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
AMPc	: Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	: Análisis de la varianza
ARN	: Ácido ribonucleico
ARNm	: ARN mensajero
ATP	: Adenosín trifosfato
ATPasa	: Adenosín trifosfatasa
BSA	: Albúmina de suero bovino
B2	: Receptor bradiquinina tipo 2
CCCP	: Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
c-Src	: Protooncogen que codifica para tirosinas quinasas
DME	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EGFR	: factor del receptor de crecimiento epidermal
ERK	: Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	: Suero fetal bovino
GTP	: Guanosín trifosfato
GTPasa	: Guanosín trifosfatasa
H	: Horas
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitogenos
Min	: Minutos
NADPH	: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
NF-AT3:	Factor nuclear de células T activadas tipo 3
NF-κB	: Factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de células B activadas
NMDAR	: Receptor de glutamato
NO	: Óxido nítrico
p21Ras	: Proteína transformadora codificada por oncogenes
PBS	: Tampón de fosfato salino
PDGF	: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKA	: Proteína kinasa dependiente de AMPc
PKC	: Proteína quinasa C
PSF	: Función de difusión puntual
Raf-1	: Protooncogen serina/treonina quinasa
S	: Segundos
SEM	: Error estándar de la media
Ser	: Serina
SERCA	: Calcio-ATPasa del retículo sarco-endoplasmático
TBS	: Tampón de Tris salino
Tyr	: Tirosina
Δψ	: Potencial mitocondrial

RESUMEN

Angiotensina (1-9) regula calcio mitocondrial en el cardiomiocito

El sistema renina-angiotensina (RAS) forma parte de un eje de control homeostático de procesos tan importantes como el mantenimiento del tono vascular, el balance hidroeléctrico y la contractilidad cardíaca. Su sobre-activación se relaciona con el desarrollo de hipertensión arterial, la que con el paso del tiempo desencadena una serie de procesos deletéreos de remodelado que cursan con hipertrofia del cardiomiocito, lo que puede llevar finalmente a la insuficiencia cardíaca. Adicionalmente, se ha mostrado que la sola desregulación de este sistema puede desencadenar hipertrofia y remodelado cardíaco. Para la compleja regulación del RAS, el organismo hace uso de distintos efectores o agonistas dentro de los que para nuestra investigación, destacamos al péptido angiotensina 1-9 que cada vez toma más importancia por su efecto fisiológico, descrito y corroborado por distintos investigadores, de contrarrestar y prevenir la señalización hipertrófica en cardiomiocitos originada por distintos estímulos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En el presente trabajo se investigó el mecanismo anti-hipertrófico de Angiotensina 1-9, para lo que valiéndonos de previas investigaciones de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación, nos centramos en la señalización mediada por calcio que tiene un papel principal en la contracción, control del metabolismo energético celular y expresión génica en el corazón,

siendo además uno de los principales actores en la hipertrofia cardiaca.

Los resultados mostraron que la preincubación de angiotensina 1-9 no tuvo efectos directo sobre los movimientos de calcio; ya sea citoplasmático o mitocondriales, pero sí disminuyó la respuesta de calcio citoplasmático frente a un estímulo pro-hipertrófico, como la Norepinefrina e incrementó los transitorios mitocondriales de calcio evocados tanto por norepinefrina como histamina (esta última se ha descrito como gatillante de la salida de calcio desde el retículo endoplásmico hacia la mitocondria a través de los canales sensibles a IP3).

Finalmente al investigar mediante inmunohistoquímica si los aumentos de calcio en la mitocondria se debían a un acercamiento entre el retículo y la mitocondria producido por la preincubación de Ang 1-9, evidenciamos que no se produce un acercamiento entre estos organelos, pero interesantemente si se evita el alejamiento de estos inducidos por estímulos prohipertróficos.

Como conclusión de nuestro estudio Ang 1-9 corrige los niveles de Ca^{2+} citoplasmático inducidos por estímulos prohipertróficos, posiblemente por una mejora en la eficiencia en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, lo que no se debe a una modulación de cercanía entre el retículo y la mitocondria.

SUMMARY

Angiotensin (1-9) regulates cardiomyocyte mitochondrial calcium

The renin-angiotensin system (RAS) is part of a homeostatic control shaft of important processes such as the maintenance of vascular tone, the electrolyte balance and cardiac contractility. The over-activation of this system has been associated with the development of high blood pressure, which over time triggers a series of deleterious remodeling processes that occur through cardiomyocyte hypertrophy and that can possible end in heart failure. Additionally it has been demonstrated that dysregulation of this system, by itself, can trigger cardiac hypertrophy and remodeling. To achieve the regulation of RAS, the organism uses different effectors or agonists, among them the peptide Angiotensin 1-9 that we highlight to our investigation, who has becoming increasingly more important for its physiological effect described and corroborated by other investigators to counteract and prevent hypertrophic signaling in cardiomyocytes caused by various stimuli *in vitro* and *in vivo*.

In the present work we wanted to delve into the hypertrophic mechanism of Angiotensin 1-9, and availing ourselves of previous research in our and other laboratories, we focus on calcium signaling, in order to get to understand a little more of this process, coupling to the fact that this plays a major role in contraction, control of cellular energy metabolism and gene expression in the heart.

In our results we first found that the pre-incubation of Angiotensin 1-9 itself had no direct effect on cytoplasmic or mitochondrial calcium movements, but decreased the cytoplasmic calcium response of the pro-hypertrophic agent Norepinephrine, and increased the mitochondrial calcium transients evoked by both, norepinephrine and histamine (which has been described that triggers output of calcium from the endoplasmic reticulum into mitochondria through the IP3 calcium channels).

Finally, using immunohistochemistry to investigate whether increases in calcium in mitochondria were due to a closer approach between the reticulum and the mitochondria induced by the Angiotensin 1-9 pre-incubation, we saw no differences in the proximity between these organelles, but interestingly the pre-incubation avoid the estrangement induced by the Norepinephrine pro-hypertrophic stimuli.

As conclusion to our study we found that Angiotensin 1-9 is able to correct the cytoplasmic Ca^{2+} levels induced by a pro-hypertrophic stimuli, possibly by an improvement in the efficiency of Ca^{2+} entry into the mitochondria, which is not due to a modulation of the closeness between reticulum and mitochondria.

1. INTRODUCCION

1.1. Sistema renina-angiotensina

Los primeros conocimientos del sistema renina-angiotensina (RAS) fueron aportados en el año 1898, cuando el fisiólogo finlandés Robert Tigerstedt, luego de realizar experimentos en riñones de conejos especuló que la renina podría tener de manera directa o indirecta una relación con la hipertrofia cardiaca y la hipertensión arterial encontrada en las personas con enfermedad renal.¹

El concepto de la vía clásica del RAS que incluye, entre otros, al angiotensinogeno generado en el hígado, la renina por los riñones y el péptido efector principal, la angiotensina II generada por la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en la vasculatura, quedó completado con el estudio realizado por Timmermans y cols. con el clonamiento de los receptores AT1 y AT2² (Figura 1). Sin embargo las implicaciones fisiopatológicas de este sistema han continuado expandiéndose con el tiempo, haciéndose gradualmente evidente que en adición al RAS sistémico, se han encontrado RAS locales en diversos órganos y tejidos. De hecho hasta la generación intracelular de Ang II se ha descrito, convirtiendo al RAS no sólo en un sistema endocrino, sino también autocrino, paracrino e intracrino³. Sumado a todos estos antecedentes, múltiples investigaciones han ido reconociendo nuevos integrantes de este

sistema, tales como péptidos con función biológica, como lo son las angiotensinas III (2-8), IV (3-8), 1-7 y 1-9, así como nuevas enzimas y receptores⁴

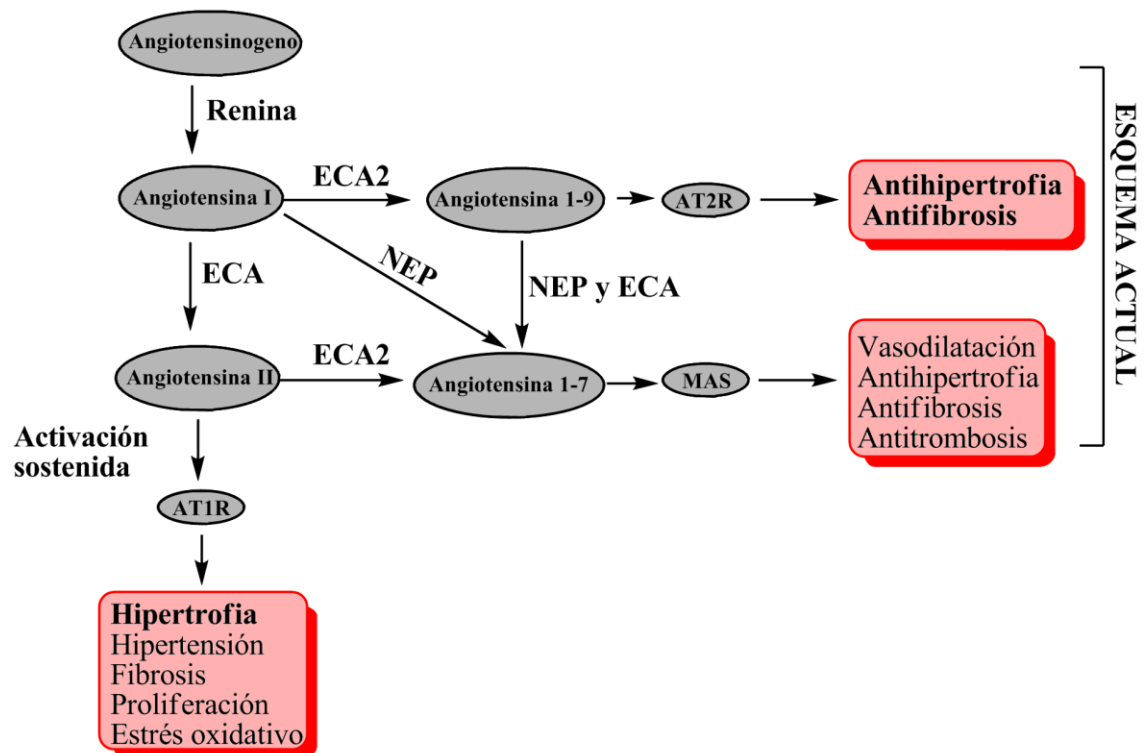


Figura 1. Esquema del sistema renina angiotensina actualizado. Mas, receptor para Ang 1-7; AT2R, receptor de angiotensina tipo 2; AT1R, receptor de angiotensina tipo 1, ACE, enzima convertidora de angiotensina; ACE2, enzima convertidora de angiotensina tipo 2; NEP, endopeptidasa neutral Modificado de Fyhrquist, F. & Saijonmaa, O. Renin-angiotensin system revisited. *J Internal Med* **264**, 224–36 (2008).

1.2. Péptidos efectores del SRA

1.2.1. Angiotensina II. El octapéptido angiotensina II (Ang II) se forma a partir de la escisión enzimática del angiotensinógeno a angiotensina I (Ang I) por la proteasa renina, con la subsecuente transformación a Ang II por la enzima convertidora de angiotensina I (ACE). La señalización de Ang II al interior de las células ocurre a través de las vías dependientes de proteína G y también mediante la interacción del receptor de angiotensina II (AT1) con muchas proteínas tirosina quinasas, como los receptores EGFR, PDGF, receptor de insulina, familia c-Src quinasa, quinasas dependientes de calcio (PyK2), quinasas de adhesión focal (FAK) y quinasas Janus (JAK). En adición, Ang II activa NAD(P)H oxidasas y generar especies reactivas de oxígeno (ROS)⁵. Los AT1R también activan serina/treonina quinasas como PKC y MAPK (incluyendo ERK1/2, p38-MAPK y c-Jun con NH2 terminal JNK) que están implicadas en crecimiento celular e hipertrofia⁶. La inducción de todas estas vías mencionadas está altamente regulada y en los pacientes en donde RAS se encuentra sobre-estimulado hay una mayor respuesta a Ang II, lo cual puede iniciar y propagar eventos patológicos, promoviendo la enfermedad vascular.⁷

1.2.2. Angiotensina III. Angiotensina (2-8) es un heptapéptido conocido por causar vasoconstricción y liberación de aldosterona. Su acción la ejerce principalmente vía los mismos receptores que Ang II (AT1R y AT2R) y probablemente sea más importante que Ang II en la modulación de acciones

mediadas a través del receptor AT1, como la liberación de vasopresina⁸. En un estudio realizado en perros⁹, se mostraron efectos equipotentes a las mismas concentraciones plasmáticas de Ang II y Ang III en aumento de presión sanguínea, secreción de aldosterona, excreción de sodio y actividad plasmática de renina, con la única diferencia de que la tasa de aclaramiento metabólico de Ang III fue 5 veces mayor que la de Ang II lo que justificaría la preponderancia de este último péptido dentro del RAS.⁹

1.2.3. Angiotensina IV. La angiotensina IV o Ang (3-8) puede ser generada a partir de la Ang III por la aminopeptidasa M y ha ido cobrando creciente importancia desde el descubrimiento y clonamiento de los que parecieran ser sus receptores endógenos, los de aminopeptidasa regulados por Insulina (IRAP)¹⁰. Estos al ser activados mediarían acciones como vasodilatación, hipertrofia y activación de NFκB, llevando a un aumento en la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1), la proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1), interleuquina 6 y el factor de necrosis tumoral tipo α¹¹. La activación de estas vías vinculan a este péptido como el principal sindicado en la respuesta vascular inflamatoria cuando se sobreactiva el RAS jugando un importante papel en la fisiopatología cardiovascular¹².

1.2.4. Angiotensina 1-7. El heptapéptido Ang 1-7 se consideró durante mucho tiempo como un péptido sin acciones biológicas y se pensaba simplemente que su efecto beneficioso estaba dado por ser un contraregulador de la producción

de Ang II por competencia enzimática, a pesar de los tempranos reportes de algunos de sus efectos fisiológicos en la liberación de vasopresina¹³. Actualmente, gracias al creciente interés por enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA 2), este péptido ha comenzado a cobrar importancia, evidenciándose que se opone a las acciones de vasoconstricción y proliferación ejercidas por la Ang II¹⁴.

A nivel transduccional la unión de Ang 1-7 al receptor MAS incrementaría el NO y activaría la NO sintasa junto con Akt¹⁵. Paralelamente, la deficiencia de este receptor disminuye la expresión de SERCA, lo cual afectaría el manejo del Ca²⁺ al interior del cardiomiocito¹⁶. La interacción entre Ang 1-7 y el sistema de prostaglandinas-bradiquininas-NO, el que se encuentra alterado en diversas patologías cardiovasculares, aporta otro punto de importancia a este nuevo péptido y el manejo de la fisiopatología cardiovascular.¹⁷

1.2.5. Angiotensina 1-9. Existe muy poca información con respecto a este péptido de 9 aminoácidos originado a partir de la hidrólisis de la leucina del carboxilo terminal de la angiotensina I (1-10) mediante ECA2 (la cual presenta un 42% de homología con el sitio catalítico de la ECA), debido a que inicialmente se pensaba que ésta se hacía activa fisiológicamente una vez que se transformaba a Ang 1-7¹⁸. Sin embargo, en el año 1989, se mostró que el tratamiento crónico con inhibidores de la ECA produce una disminución en la

producción de Ang II y un aumento de concentraciones de Ang 1-9, lo que permitió pensar que el efecto de éstos podría no estar ligado exclusivamente en la disminución de la producción de Ang II, sino que también con algún efecto complementario y positivo de la Ang 1-9.¹⁹

Actualmente, se ha evidenciado que tanto la Ang 1-9 como la Ang 1-7 aumentan los niveles de ácido araquidónico y liberación de NO por bradiquininas, potenciando la acción de éstas sobre su receptor B2 y siendo Ang 1-9 significativamente más activa²⁰. Recientemente, Ocaranza y cols., mostraron en modelos *in vivo* de hipertrofia cardiaca experimental que la administración del péptido a través de bombas miniosmóticas tiene una acción antihipertrófica ²¹. Flores-Muñoz y cols. también mostraron que la Ang 1-9 inhibe la hipertrofia producida por Ang II a través de su unión al receptor AT2²². Adicionalmente también se ha mostrado recientemente que la Ang 1-9 atenúa la fibrosis inducida en modelos de ratas espontáneamente hipertensas vía receptor AT2 ²³. Todas estas evidencias han despertado un gran interés en continuar investigando si este péptido podría llegar a convertirse en una alternativa real como tratamiento o profilaxis del remodelado cardiaco.

1. 3. Receptores AT1 y AT2

Las acciones clásicas del RAS son ejercidas a través de la activación del receptor AT1. La eficacia de los antagonistas de este receptor en términos de controlar la presión sanguínea, disminuir la progresión de la enfermedad renal crónica y la reducción del riesgo cardiovascular reflejan la importancia de este receptor en una variedad de desórdenes. Clásicamente la estimulación del AT1R causa la activación de la proteína heterotrimérica G, llevando a la activación de PKC e incrementando la concentración de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, la estimulación de este receptor también activa la señalización adicional de mecanismos no relacionados con el acoplamiento de la proteína G, como la activación de las quinasas Janus y c-Src²⁴. Interesantemente se ha descubierto que el estrés mecánico, sin participación de Ang II, no sólo activa la señalización extracelular de quinasas e incrementa la producción *in vitro* de fosfoinositol, sino que también induce hipertrofia cardíaca *in vivo* debido a que el estrés mecánico induce la asociación del receptor AT1 con JAK 2 y la translocación de las proteínas G al núcleo, en ausencia de ligando. Estos datos sugieren que el receptor AT1 puede tener efectos fisiológicos de manera independiente a la unión a sus ligandos endógenos²⁵

El receptor AT2 es claramente distinto al AT1 en su organización genómica, especificidad de expresión tisular, así como en sus mecanismos de señalización²⁶. En los individuos adultos el receptor AT1 se expresa

prácticamente de manera ubicua, especialmente en órganos involucrados en el control vascular, mientras que AT2R se encuentran predominantemente en el útero, células de la granulosa ovárica y en distintas áreas del cerebro². Dado que este receptor se encuentra principalmente en tejidos fetales, el receptor AT1 predomina en tejidos adultos²⁷, pero su expresión aumenta dramáticamente bajo condiciones patológicas, como en la insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal, lesiones de la piel o lesiones vasculares²⁶.

Mientras que la señalización a través del receptor AT1 se encuentra vastamente estudiada, la verdadera naturaleza de la señalización del receptor AT2 sigue siendo enigmática. A pesar de compartir características estructurales básicas comúnmente compartidas por los receptores acoplados a proteína G, el receptor AT2, no posee ninguna de las funciones atribuidas clásicamente a éstos²⁸. Uno de los contrastes de su señalización estaría dado por ejemplo, por la activación de fosfatasas para inhibir ciertos pasos en la señalización de crecimiento²⁹ o por la inactivación de MAP quinasas, previamente activadas por el receptor AT1 unido a Ang II³⁰, con todo lo cual, a pesar de no estar totalmente descrita su vía de señalización, este receptor se vuelve particularmente interesante por su capacidad de contrarrestar los efectos dañinos del eje Ang II/AT1.

1.4. RAS e hipertrofia cardiaca

La hipertrofia cardiaca se caracteriza por un incremento en el tamaño del cardiomiocito, con aumento de la síntesis proteica y un cambio en la organización en la estructura sarcomérica³¹. Desde un punto de vista fenotípico se distinguen dos formas de hipertrofia cardíaca: una concéntrica, secundaria a sobrecargas de presión y caracterizada a nivel celular por la adición en paralelo de sarcómeros con crecimiento lateral de los cardiomiocitos; y la hipertrofia excéntrica, debida a sobrecarga de volumen y caracterizada por la adición de sarcómeros en serie con un crecimiento celular longitudinal³². A nivel molecular, estos cambios celulares se acompañan con la re-inducción de proteínas de fetales, de manera similar a las encontradas en etapas embrionarias.³¹

El crecimiento hipertrófico acompaña muchas formas de enfermedades cardiacas, como la enfermedad isquémica, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca o enfermedad valvular. En estos tipos de enfermedades se piensa que la hipertrofia cardiaca estaría actuando como un mecanismo compensatorio para disminuir el estrés de la pared cardiaca y el consumo de oxígeno³³. Estos procesos de sobrecarga crónica, finalmente, conducen a la activación de los genes tempranos (c-jun, c-fos, c-myc) y de los genes fetales (factor natriurético atrial [ANF], cadena pesada de la miosina β [β -MHC] y alfa-actina esquelética [SKA], entre otros), que son considerados y utilizados como marcadores de respuesta hipertrófica³⁴ (Figura 2).

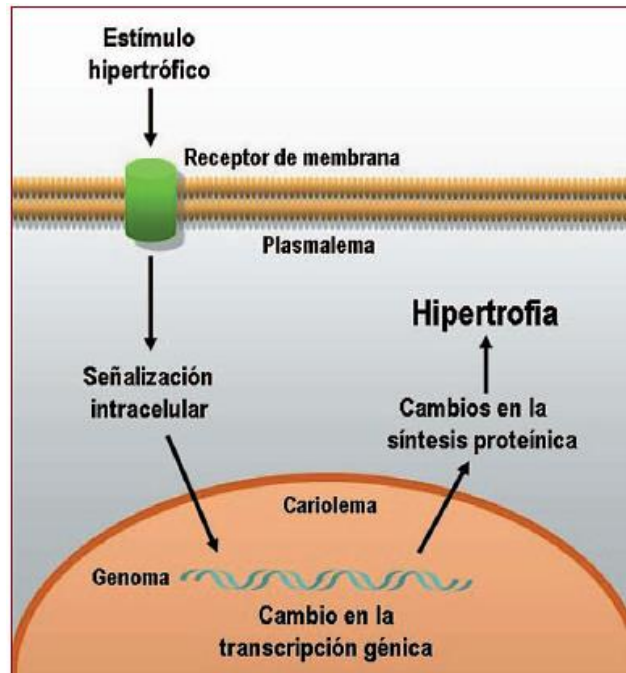


Figura 2: Eventos que tienen lugar en el proceso hipertrófico del cardiomiocito.
Adaptado de Molkentin, J. D. y cols. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. Annu Rev.Physiol. 63 391–426 (2001).

1.5.1. Estímulos hipertróficos y sus receptores. El estrés biomecánico en el miocardio puede producirse por 2 tipos de estímulos: el estiramiento mecánico y la liberación de factores neurohumorales³⁶. El estrés mecánico inducido por estiramiento físico de cardiomiocitos adultos y neonatales es suficiente para inducir una respuesta genética y fenotípica hipertrófica, incluso en ausencia de factores neurohumorales³⁴. Diversos son los factores humorales que pueden actuar como un estímulo hipertrófico en el cardiomiocito, y distintas son las consecuencias de su activación. Un primer grupo está compuesto por los factores de crecimiento: factor de crecimiento transformante tipo β [TGF- β], factor de crecimiento fibroblástico [FGF], factor de crecimiento análogo a la

insulina tipo 1 [IGF-1], entre otros que, por medio de su acción en receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, activan una cascada de segundos mensajeros intracelulares que, finalmente, conducen a un patrón de crecimiento normal, característico del crecimiento hipertrófico fisiológico o adaptativo³⁷. Un segundo tipo de estímulo humoral para el crecimiento del cardiomiocito procede de la estimulación de receptores unidos a proteína G, entre los que destacan los receptores adrenérgicos para epinefrina y norepinefrina, el receptor AT1 para angiotensina II (Ang II) y el receptor ET para endotelina-1, todos los cuales han sido relacionados con el desarrollo de hipertrofia patológica y su eventual progreso a insuficiencia cardiaca³⁸

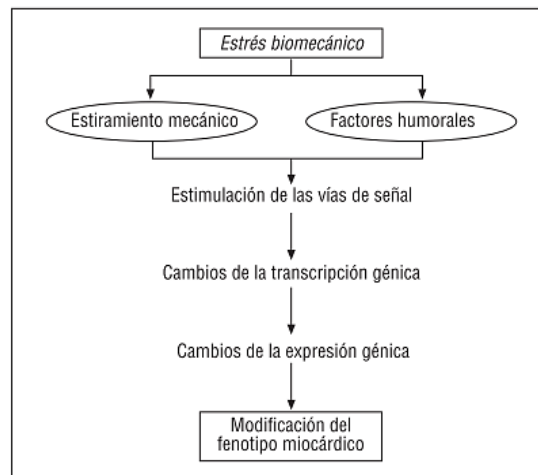


Figura 3 Esquema representativo de las respuestas desencadenadas por el estrés biomecánico en el miocardio. Carreño, J. E. "et al". 2006. *Cardiac Hypertrophy: Molecular and Cellular Events. Rev Esp Cardiol.* 59, 473–486.

La transducción de señales en respuesta al estrés mecánico se caracteriza por la multiplicidad de vías activadas de forma simultánea³⁹. Así, en

cardiomiocitos en cultivo, el estrés mecánico produce la activación de fosfolipasas (PLC, PLD y PLA2), tirosina quinasas, p21ras, Raf-1, quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y sus activadores, JNK, PKC y probablemente otras moléculas⁴⁰. En estudios realizados en modelos de ratones adultos, se estableció a través de expresión transgénica de PKC-β es suficiente para generar un fenotipo hipertrófico ventricular progresivo, mientras que el mismo experimento realizado en un modelo de ratas neonatas conllevó a la muerte súbita, con marcadas anormalidades en la regulación del Ca²⁺ intracelular, lo que lleva a pensar la importancia que puede tener el manejo del Ca²⁺ en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca⁴¹. Complementariamente, otro grupo de investigadores demostró que la hipertrofia producida fenilefrina o Ang II se vió notablemente disminuida al ocupar inhibidores farmacológicos de la fosfatasa calcineurina, la cual desfosforila al factor transcripcional NF-AT3, permitiendo su translocación al núcleo e interactuar de manera sinérgica con el factor transcripcional GATA4, lo que se encuentra directamente relacionado con el desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardíaca. Incluso se evidenció mediante ratones transgénicos que expresaban calcineurina o NF-AT3 constitutivamente activos, los cuales desarrollaron hipertrofia e insuficiencia cardíaca⁴².

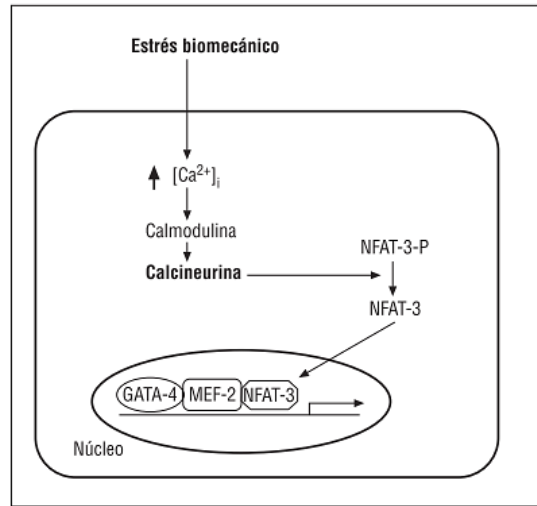


Figura 4 Esquema de la participación de calcio y calcineurina en la transmisión de señales originadas por estrés biomecánico en los cardiomiocitos. Díez, J. "et al". 2001. *Respuestas del miocardio al estrés biomecánico. Rev Esp Cardiol. 54, 507–515.*

En otro estudio, Liang y cols. mostraron que los factores de transcripción GATA 4 y GATA 6 son importantes reguladores de la hipertrofia cardiaca *in vivo* e *in vitro*⁴³, constatando que su sobreexpresión mediante adenovirus, genera hipertrofia (medida como: aumento en la organización sarcomérica, incremento en el área de superficie celular, en la incorporación de leucina (síntesis de proteínas) y de la re-expresión de ANP y síntesis de ANF) y que la hipertrofia producida por PE induce un aumento en la expresión de estos factores.

1.7. Señalización de Ca^{2+}

El Ca^{+} es un ion que participa en una muy alta y versátil señalización intracelular con la capacidad de participar en muchas diferentes funciones celulares, teniendo un rol esencial, entre otras, en la regulación de la contracción, metabolismo, crecimiento, hipertrofia y muerte del cardiomiocito⁴⁴. En cada momento la cantidad de Ca^{2+} al interior del cardiomiocito está determinada por un balance entre los mecanismos que lo introducen al interior del citoplasma, (“on reactions”) y los que lo remueven (“off reactions”) desde este espacio celular ya sea a través de la acción de buffers, bombas o intercambiadores, limitando así su posterior acción en la señalización y transducción celular⁴⁵ (Figura 5).

Existen diferentes canales de membrana que controlan la entrada de Ca^{2+} en respuesta a estímulos como: depolarización de membrana, estiramiento, estímulos nocivos, agonistas extracelulares, mensajeros intracelulares y por la depleción de reservas intracelulares. La liberación desde los reservorios de Ca^{2+} , usualmente del retículo endoplásmico (ER) o su equivalente en el músculo, el retículo sarcoplásmico (SR) es controlado por el mismo Ca^{2+} o por mensajeros como Ins (1,4 5) P_3 , ADP ribosa cíclica (cADPR), dinucleotido fosfato adenina de ácido nicotínico (NAADP), esfingosina 1 fosfato (S1P), los que estimulan o modulan la liberación desde estos reservorios internos⁴⁶.

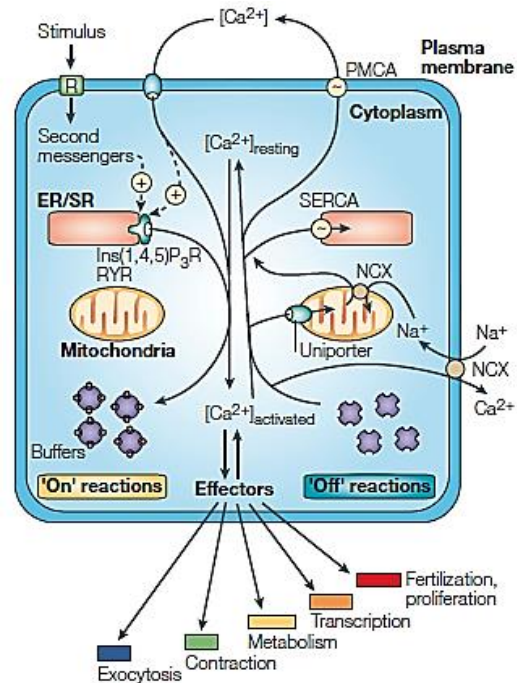


Figura 5 Dinámica y señalización de Ca^{2+} . El calcio al interior de la célula puede ser regulado a través de múltiples procesos, ya sea ingresándolo al citoplasma, desde el medio extracelular, siendo liberado desde el retículo endoplásmico, mitocondria u otras fuentes de calcio intracelular, (on reactions) o sacando el calcio del citoplasma a través de intercambiadores, bombas o buffers ("off reactions") Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. 2003. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. Nature Rev Mol Cell Biol 4,517–29.

1.7.1. Mecanismos de entrada de Ca^{2+} desde el exterior. El Ca^{2+} extracelular es una de las principales fuentes de Ca^{2+} en la célula. El ingreso se produce a través de múltiples distintos canales en la membrana celular, dentro de los que destacan los canales dependientes de voltaje, (VOCs) que hacen uso de la presencia del gradiente electroquímico a lo largo de la membrana plasmática para generar rápidos transientes de Ca^{2+} en respuesta a cambios de voltaje, controlando procesos celulares rápidos como la exocitosis o la

contracción muscular. Otro tipo importante de canal es el operado gracias a la unión a un receptor en particular, (ROCs) como por ejemplo de los receptores de NMDA que responden a glutamato. También existen los canales regulados por acción de segundos mensajeros, (SMOCs) como los regulados por nucleótidos cíclicos o los sensibles a ácido araquidónico. Finalmente podemos mencionar a los canales operados por reservorios de almacenamiento (SOCs) activados por termosensores y señales de estiramiento, pertenecientes a la familia TRP que se caracterizan por tener baja conductancia y ser particularmente importantes en el control de procesos celulares lentos, como la contractilidad de la musculatura lisa y la proliferación celular ⁴⁵.

1.7.2. Mecanismos de liberación de Ca^{2+} desde reservorios internos. Otra fuente principal de Ca^{2+} para la señalización son los reservorios internos que están localizados primariamente en el ER/SR (retículo endoplásmico/retículo sarcoplásmico), en los cuales IP_3R (receptor de IP_3) y RyR (receptor de rianodina) tienen la mayor preponderancia. El primero es una glicoproteína que induce la liberación de Ca^{2+} desde el retículo al unirse a su ligando, el segundo mensajero IP_3 . Este receptor además de participar en la liberación de calcio, libera una proteína de unión $\text{IP}_3\text{-IP}_3\text{R}$, la que regularía la frecuencia y amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} a través del IP_3R ⁴⁷. El RyR es un canal intracelular de Ca^{2+} ubicado en el retículo sarco(endo)plásmico compuesto por cuatro idénticas subunidades, las que se combinan para formar un poro de proteína de alta conductancia permeable a cationes. La actividad del canal es regulada

por Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP, oxidación/reducción y fosforilación. En adición, el RyR es regulado por interacciones intramoleculares proteína-proteína, así como también por numerosas proteínas accesorias como el receptor de dihidropiridina (DHPR), la proteína de unión FK506 (FKBP), calmodulina (CaM), sorcina y calsequestrina (CSQ)⁴⁸. Diversos estímulos funcionan a través de la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) para generar IP₃, quien activa la salida de Ca^{2+} desde reservas internas. Hay distintas isoformas de PLC que son activadas por diferentes mecanismos, algunas por receptores acoplados a proteína G, (PLC β), por receptores acoplados a tirosinas quinasas (PLC γ) o por incremento en la concentración de Ca^{2+} (PLC δ), etc ⁴⁹. Los receptores de bradiquinina y neuroquinina A, por ejemplo, generan transitorios rápidos y largos de Ca^{2+} , mientras que el ácido lisofosfatídico, la trombina y la histamina generan respuestas más pequeñas, que se desarrollan lentamente pero persisten por mucho más tiempo. Esta variabilidad puede provenir del hecho de que los receptores se asocian a diferentes elementos de transducción e isoformas de PLC de manera específica al tipo celular ⁵⁰.

1.8. Calcio e hipertrofia

Enfermedades cardiovasculares comunes como la hipertensión arterial o el infarto del miocardio requieren que los cardiomiocitos desarrollen una fuerza mayor para mantener la función cardíaca. Esto requiere incremento en el

ingreso de Ca^{2+} , el que activaría la vía de señalización calcineurina-NFAT⁵¹, la que iniciaría la expresión de genes involucrados en la hipertrofia cardiaca patológica. Gao y cols. han mostrado que mientras que los canales TRP causan hipertrofia, la fuente primaria de obtención de Ca^{2+} serían los canales de tipo L (dependientes de voltaje)⁵². Otro estudio relacionado, al utilizar modelos de ionomicina, cafeína y Ang II que incrementan el Ca^{2+} intracelular por diferentes mecanismos⁵³ evidenció que sólo cafeína y Ang II lograban incrementar la superficie celular de los cardiomiocitos y los niveles de mRNA de ANP (péptido natriurético auricular), BNP (péptido natriurético cerebral) y β MHC (cadena pesada de β miosina) y que la actividad de la ATPasa (SERCA) y la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} se encontraba reducida en estos dos mismos grupos. Además, la hipertrofia inducida por cafeína fue inhibida por el inhibidor de calcineurina ciclosporina A (CsA) y por el inhibidor de CaMKII KN93, mientras que la hipertrofia inducida por Ang II sólo fue inhibida por KN93 pero no por CsA, lo que sugeriría que la hipertrofia del cardiomiocito está asociada con la actividad de la SERCA y la señalización a través de CaMKII y/o calcineurina, mientras que la sobrecarga de Ca^{2+} por sí sola, no es suficiente para generar hipertrofia del cardiomiocito.

Finalmente cabe agregar que nuestro Laboratorio nos aportó dos importantes antecedentes para nuestra investigación:

- 1) Ang 1-9 regula los niveles intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a un estímulo prohipertrofico NE. Constatándose que el tratamiento con NE de cardiomiocitos de ratas neonatas conduce a un aumento en el calcio intracelular, lo que es, en alguna medida prevenido al preincubar estas células con Ang 1-9 por 30 minutos ⁵⁴ (Figura 6)
- 2) Un modelo hipertrofico de NE produce un alejamiento entre el retículo y la mitocondria afectando el traspaso de calcio desde un organelo a otro disminuyendo la cantidad de calcio ingresada a la mitocondria proveniente del retículo ⁵⁵ (Figura 7)

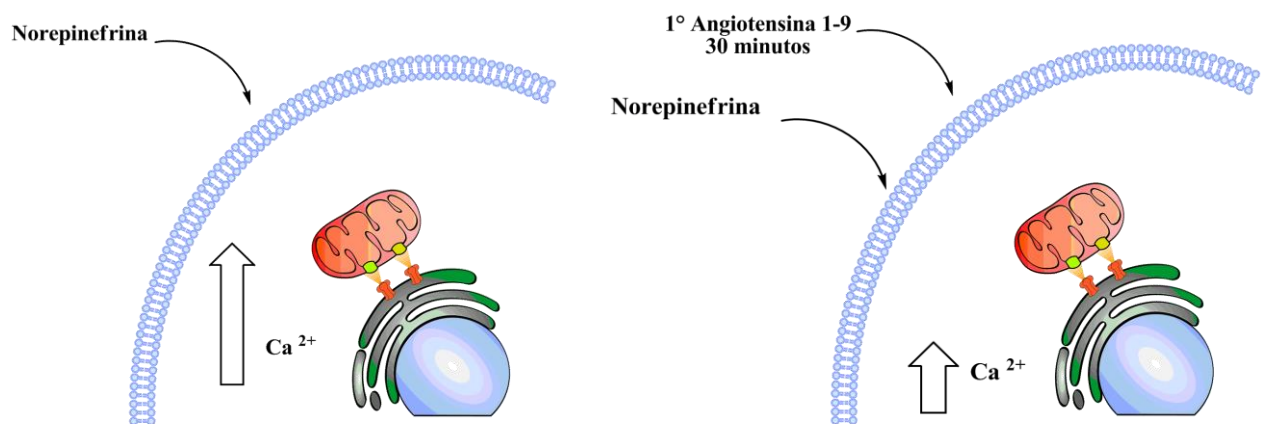


Figura 6: Preincubación angiotensina 1-9 disminuye el incremento de calcio inducido por un pulso de NE. Adaptado de la tesis de pregrado de Hechenleitner, J. A. Regulación de los niveles intracelulares de calcio por angiotensina 1-9 en el cardiomiocito. 1-48 (2011)

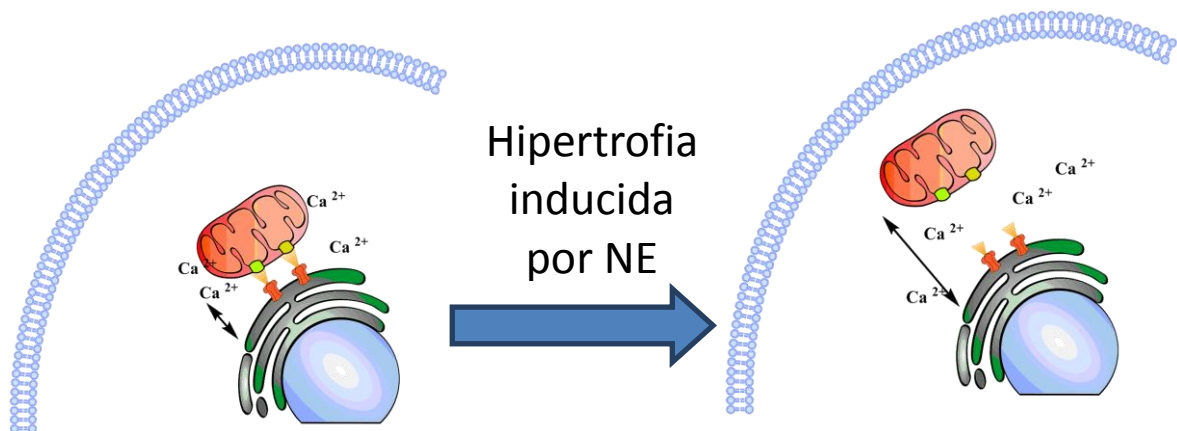


Figura 7: Modulación distancia retículo-mitocondria. *Modelo hipertrófico de NE produce un alejamiento entre el retículo y la mitocondria afectando el traspaso de calcio desde un organelo a otro. Adaptado de la tesis de magister de Tomás Gutiérrez “Estudio de la señalización de insulina en cardiomiocitos hipertróficos”. 1–67 (2012).*

Tomando en cuenta estos importantes antecedentes y la información precedente, nos vimos muy interesados en seguir evaluando este comportamiento en la señalización de calcio y la participación que pudiera estar teniendo la mitocondria en su manejo, lo que nos llevó a la hipótesis planteada en la próxima sección.

2. HIPÓTESIS

“Angiotensina-(1-9) aumenta el traspaso de calcio entre el retículo endoplásmico y mitocondria en el cardiomiocito, debido al incremento de los contactos entre ambos organelos.”

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si Ang 1-9 cambia los niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca^{2+} e investigar si existe alguna modificación en la cercanía retículo-mitocondria que altere la señalización del mismo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si Ang-(1-9) regula directamente el calcio mitocondrial en el cardiomiocito.
- Evaluar el efecto modulador de Ang-(1-9) a nivel del calcio mitocondrial movilizado por histamina, Ang II o NE.
- Investigar si Ang 1-9 modifica los contactos entre retículo endoplásmico y mitocondria en el cardiomiocito.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Aislamiento y cultivo. Todos los animales se trataron siguiendo las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de experimentación: Guide for the use of laboratory animals (NIH, 2011), siendo los protocolos experimentales además aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Para la realización de esta tesis de pregrado se utilizaron como modelo experimental cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Para este fin, los corazones se extrajeron y lavaron en medio Hank's y, posteriormente, homogenizados y digeridos con colagenasa tipo II (0,02 g/100 mL) y pancreatina (0,06 g/100 mL). Una vez finalizada la digestión, las células se preplaquearon durante 2 h en medio DMEM:M199 (4:1) que contenía 10% FBS. Finalmente, las células se centrifugaron a 1.000 rpm por 5 min y resuspendieron en medio DMEM:M199 (4:1) que contenía 5% FBS y 10% FCS. La concentración de cardiomiocitos se determinó por conteo en microscopio óptico, tiñéndolas con azul de Tripán. Las células se sembraron en medio DMEM:M199 (4:1) que contenía 5% FBS y 10% FCS según las necesidades de cada experimento en presencia de 5-bromo-2-deoxiuridina, en placas cubiertas de gelatina (2% p/v) y mantenidas a 37°C en una atmosfera controlada de 95% aire y 5% CO₂ durante 24 h. Transcurrido

este tiempo las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio DMEM:M199 (4:1) en presencia de 5-bromo-2-deoxiuridina. Después de 24 h, las células se estimularon según la descripción de cada experimento.

5.2. Reactivos. Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio Hank's medio Eagle modificado de Dulbecco (DME), gelatina, tritón X-100, bromo-2'-deoxiuridina, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), tripsina-EDTA 1X. De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron, colagenasa tipo II, el suero fetal bovino (FBS), Mito-Tracker Green-FM (M7514) y suero de ternera (FCS). Las sondas Rhod-FF AM (cat. R23983) y FLUO3-AM (F1242) se compraron en Molecular Probes-Invitrogen (Eugene, OR, EEUU). El anticuerpo anti KDEL (ADI-SPA-827) se compró en Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). 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).

5.3. Medición de cinéticas mitocondriales y citoplasmáticas de calcio. Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm sobre cubreobjetos de 25 mm cubiertos con gelatina ($0,5 \times 10^6$ células por placa) e incubados en medio

de mantención. Luego se lavaron y preincubaron durante 30 min con las sondas fluorescentes Fluo3-AM (5,4 mM) o RhodFF (5,4 mM), para medir calcio citoplasmático y mitocondrial, respectivamente, en medio Krebs (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 g/mL glucosa). Posteriormente, los cardiomiocitos se lavaron y montaron en un microscopio confocal invertido (Carl Zeiss Axiovert 135 M LSM Microsystems). Las imágenes fluorescentes se obtuvieron cada 0.985 seg. En cada medición, las células se dejaron sin estimular durante los primeros 100 seg para determinar los niveles basales de Ca²⁺. Después, se les agregaron los diferentes estímulos a medir, para luego capturar imágenes durante 250 seg. Finalmente, se agregó KCl 50 mM ó CCCP 50 μM como control positivo para calcio citoplasmático y mitocondrial, respectivamente. Para cada secuencia de imágenes obtenida, se determinaron los niveles de fluorescencia en regiones de interés (ROI) de células individuales. Los valores se expresaron como $\Delta F/F_0$, donde ΔF corresponde a $F - F_0$, y F_0 a la fluorescencia basal, respectivamente⁵⁶. Para el análisis de las imágenes se utilizó el software Image J. Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se mostraron como figuras representativas o como promedios \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Para determinar la significancia estadística de los datos, estos se analizaron por t-Student, cuando se comparen dos grupos, o por ANOVA y la prueba Tuckey, cuando se compararon tres o más grupos.

5.4. Medición cercanía retículo endoplásmico-mitocondria. Posterior al cultivo, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2%). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS (filtrado) durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos Kdel (dilución 1:500) para retículo y Fis-1 (dilución 1:1000) para mitocondria en PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Se lavaron nuevamente con PBS y luego se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y protegida de la luz con el anticuerpo secundario Alexa 488 o 568, anti mouse o anti conejo, según corresponda. Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje, el cual además retarda el decaimiento de la fluorescencia. Una vez montadas, las inmunofluorescencias se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss Microsystems, Oberkochen, Alemania). El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J. La colocalización RE-mitocondria en las diferentes regiones subcelulares se analizó con ANOVA de dos vías. Se consideró como significativo un $p < 0,05$.

5.5. Análisis digital de imágenes. La cuantificación digital de la colocación de las imágenes de inmunofluorescencia antes descritas, se realizó analizando los coeficientes de Manders para cada una de las señales fluorescentes en estudio y asociadas a dos canales (un canal para cada una de las señales, con el programa Image J ⁵⁷ Matemáticamente, los coeficientes de Manders son la proporción entre la señal de un canal que se encuentra colocada con la señal del otro canal en relación a la cantidad total de señal en ese canal. Dado que se utilizan dos canales para analizar la colocación se calcularon dos coeficientes de Manders, uno para cada canal (Figura 5). Previo a este análisis, se realizó la eliminación de la fluorescencia fuera de foco usando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (Point Spread Function) correspondiente para cada condición de lente objetivo del microscopio confocal y de fluorescencia utilizada. Además, mediante el uso de un programa generado en nuestro laboratorio, se pudo determinar la fluorescencia de cada señal en distintas áreas celulares, con tal de cuantificar la colocación entre mitocondrias y RE en cada una de ellas⁵⁸

5.6. Análisis estadístico. Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Para determinar la significancia estadística de los datos, éstos fueron analizados por t-Student, cuando se compararon dos grupos, o por ANOVA y la prueba Tuckey, cuando se compararon tres o más grupos. La colocación RE-mitocondria en las

diferentes regiones subcelulares se analizó con ANOVA de dos vías. Se consideró como significativo un $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Efectos de Ang 1-9 NE e histamina en el Ca^{2+} mitocondrial

Como se mencionó anteriormente, de acuerdo a estudios realizados previamente en el laboratorio⁵⁴, la concentración de Ang 1-9 significativamente efectiva para modular la respuesta de NE fue $100 \mu\text{M}$, por lo que en este trabajo se probó su efecto en la cinética de calcio mitocondrial, utilizando la fluorescencia emitida por la sonda mitocondrial Rhod FF. La Figura 8 muestra que en esta condición experimental se observó una respuesta muy discreta, sin conseguir significancia estadística, por lo que consideró como una respuesta nula (Figura 8). Al repetir la prueba anterior, pero esta vez utilizando NE en la concentración descrita en literatura como la cantidad necesaria para inducir fenotipo hipertrófico ($10 \mu\text{M}$), se observó que no hubo respuesta en la cinética de calcio mitocondrial (Figura 9). Sin embargo, al repetir el mismo experimento pero usando histamina (100 mM) en la concentración descrita en la literatura que activa los canales de IP_3 y la consiguiente salida de Ca^{2+} desde el RE⁵⁹, se generó un incremento de fluorescencia sostenido, un reflejo de un aumento en la cantidad de Ca^{2+} al interior de la mitocondria o en otras palabras, una entrada de Ca^{2+} hacia la mitocondria (Figura 10)

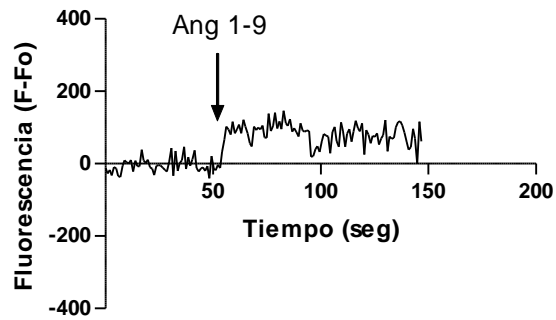


Figura 8: Cinética de calcio mitocondrial y pulso de Ang 1-9. *Tiempo de cinética: 150 segundos, concentración de Ang 1-9: 100 μ M. Fluorescencia medida a campos con 5 o más ROI (regiones ópticas de interés) en 3 experimentos independientes.*

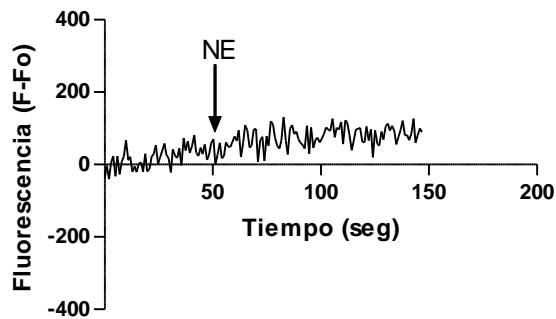


Figura 9: Cinética de calcio mitocondrial y pulso de NE. *Tiempo de cinética: 150 segundos, concentración de Ne 10 μ M. Fluorescencia medida a campos con 5 o más ROI (regiones ópticas de interés) en 3 experimentos independientes.*

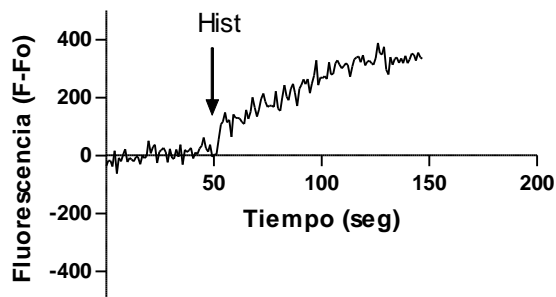


Figura 10: Cinética de calcio mitocondrial y pulso de histamina. *Tiempo de cinética: 150 segundos, concentración de Histamina: 100 mM. Fluorescencia medida a campos con 5 o más ROI (regiones ópticas de interés) en 3 experimentos independientes.*

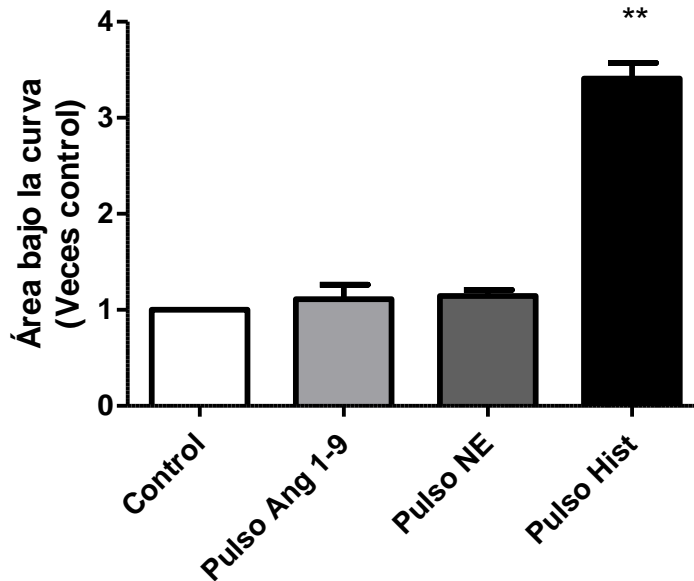


Figura 11: Área bajo la curva en cinética de calcio mitocondrial. *Pulsos de distintos estímulos n= 3-4 ** p < 0,001*

6.2. Modulación de la señal de Ca^{2+} mitocondrial dependiente de histamina por Ang 1-9

Anteriormente en nuestro laboratorio se estableció que NE genera un fenotipo hipertrófico junto con disminuir los contactos retículo-mitocondria y disminuir las cinéticas de calcio mitocondrial evocadas por histamina⁵⁵. Adicional e independientemente, también se estableció que Ang 1-9 podía disminuir o atenuar el aumento del Ca^{2+} citoplasmático originado por NE a la misma concentración necesaria para generar hipertrofia⁵⁴. Considerando estos

antecedentes y los resultados previamente descritos (Figuras 8-10), se evaluó si la preincubación de Ang 1-9 altera la salida de Ca^{2+} inducido por histamina desde el RE hacia la mitocondria.

Para llevar a cabo este estudio, se investigó el efecto de la preincubación de Ang 1-9 por 30 min, 3 ó 6 h, aumentando además los tiempos de cinética a 400 seg y agregando el desacoplante mitocondrial carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) que hace permeable la membrana mitocondrial interna al flujo de protones, para asegurarnos de que los cambios que pudiéramos observar en fluorescencia no sean atribuibles a mitocondrias desacopladas. Luego de agregar la histamina en las tres condiciones de preincubación a los 100 seg y compararlo con el control se evidenció un aumento en la cantidad de Ca^{2+} mitocondrial junto con las preincubaciones de manera tiempo dependiente, tal como se muestra en la Figura 11. Al cuantificar la cantidad de fluorescencia midiendo el área bajo la curva de las cinéticas, se aprecia con mayor claridad que efectivamente hay un incremento en el área de fluorescencia de manera dependiente al tiempo de preincubación (Figura 12). Al normalizar la cuantificación de la figura anterior con respecto al control, asignándole un valor como uno a este, los análisis estadísticos realizados utilizando ANOVA de una vía, muestran que el aumento en fluorescencia en la condición de preincubación de 6 horas es significativamente mayor en relación al control (Figura 13).

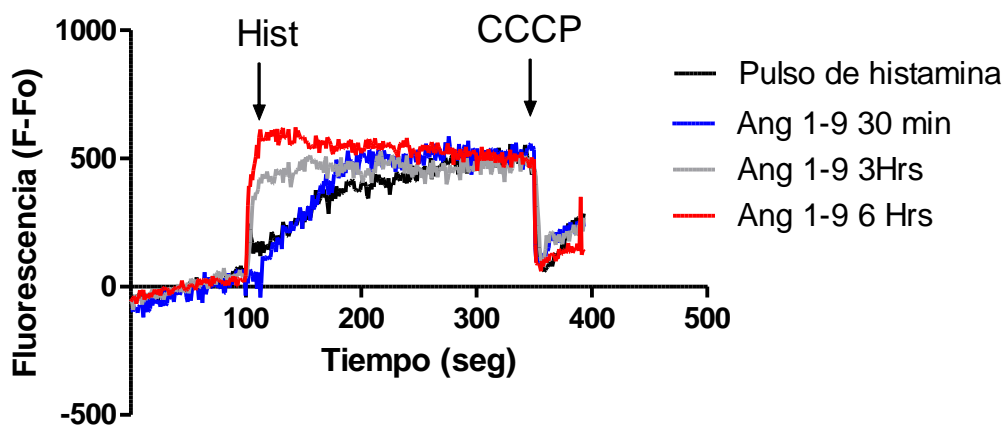


Figura 12: Cinética de calcio mitocondrial de modulación de respuesta a pulsos de histamina. Cinéticas de 400 segundos; Ang 1-9 100 μM preincubada por 30 minutos 3 horas y 6 horas; Histamina 100 mM agregada a los 100 segundos; CCCP 50 μM como control positivo agregado a los 350 segundos. $n = 4$

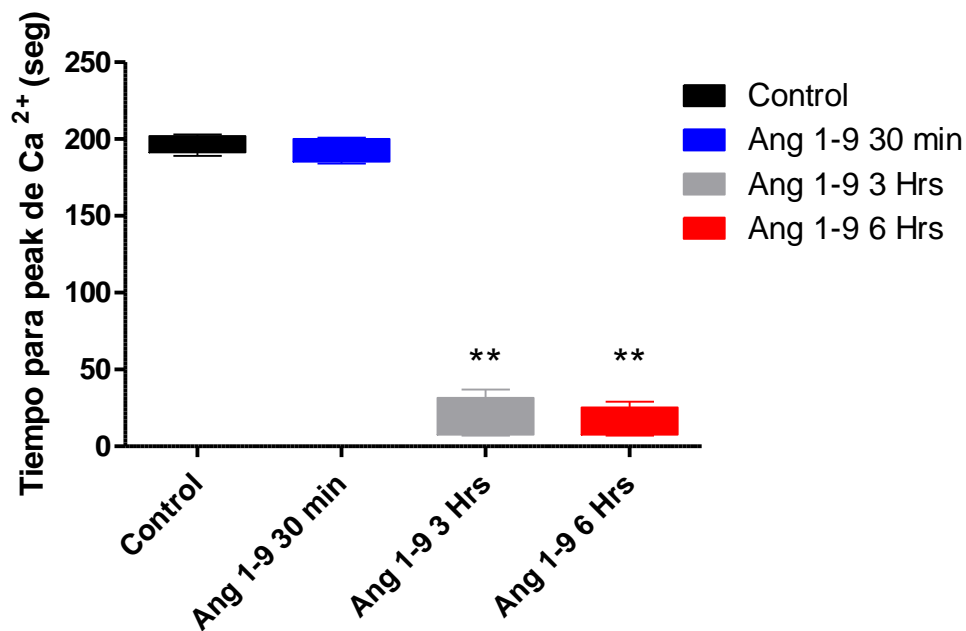


Figura 13: Tiempo en llegar al máximo de fluorescencia. Comparación de los tiempos que toma llegar al máximo de fluorescencia en las condiciones de preincubación de 3 y 6 Horas de la figura anterior. $n = 4$, ** $p < 0,001$

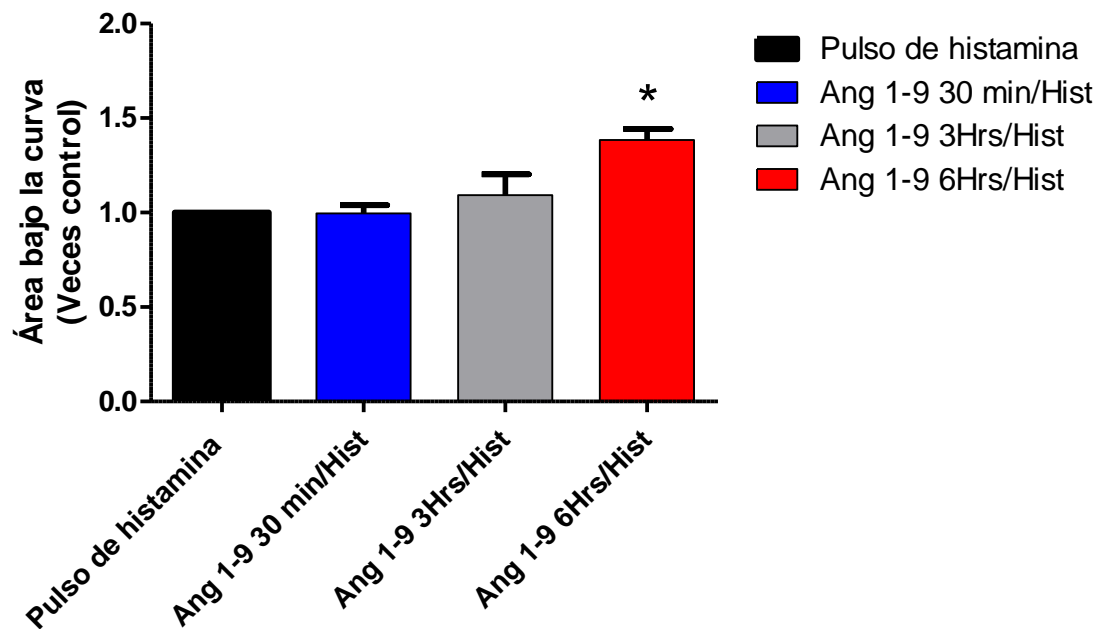


Figura 14: Área bajo la curva de modulación de respuesta en cinética de histamina. Cuantificación del área bajo la curva en cinética de figura 11, correspondiente a la cantidad de fluorescencia en las condiciones de preincubación de 3 y 6 h, medida en unidades de fluorescencia arbitrarias. $n=4$ * $p < 0,05$

6.3. Efecto de los antagonistas del receptor Mas o AT2 en la modulación de la señal de Ca²⁺ mitocondrial dependiente de histamina por Ang 1,9

De acuerdo a los resultados anteriores, se continuó trabajando de aquí en adelante con la preincubación de 6 h, tomando en cuenta que en ésta reúne dos características importantes: 1) Junto con la preincubación de 3 h es la que alcanza la mayor fluorescencia en menos tiempo (*Time to peak*) y 2) es la única condición donde se obtiene un aumento significativo en la cantidad de fluorescencia (*área under curve*) en comparación con las distintas condiciones

de preincubación. Tal como ha sido descrito en la introducción, Ang 1-9 puede ser degradada por la ECA para formar Ang 1-7 y se han establecidos como ligandos endógenos de las angiotensinas 1-9 y 1-7, los receptores AT2 y MAS respectivamente^{60,61}. Por esta razón y para asegurarnos de que la preincubación de Ang 1-9 por 6 h está produciendo sus efectos vía Ang 1-9/AT2 y no vía Ang 1-9 transformándose a Ang 1-7 y actuando a través del receptor MAS, realizamos las mismas pruebas de cinéticas, pero esta vez con los antagonistas A779 y PD123319 de los receptores MAS y AT2, respectivamente. Interesantemente, la Figura 15 muestra que el pretratamiento con estos antagonistas a la condición de preincubación de 6 h en las cinéticas de los pulsos de histamina, arrojaron como resultado que la forma de la curva en donde está el pretratamiento con el antagonista del receptor AT2 (PD 123319) junto a la preincubación de 6 h (línea verde), se parece a la condición control (línea negra) y que el pretratamiento con el antagonista del receptor MAS junto a la preincubación de 6 h (línea azul) se parece a la condición de preincubación de Ang 1-9 6 h sin antagonista (línea roja); todo con la única salvedad de que ambas condiciones con pretratamiento de antagonista presentan curvas de menor amplitud que las condiciones control y Ang 1-9, 6 h.

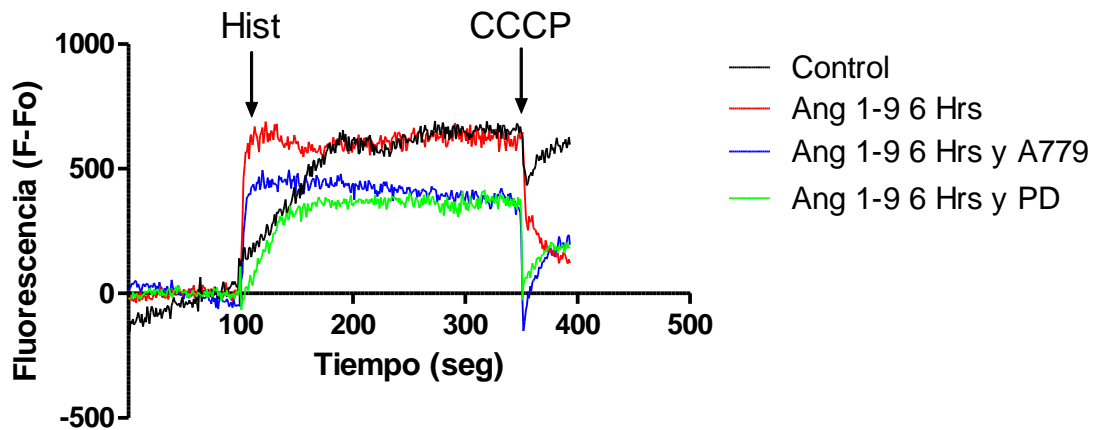


Figura 15: cinética de calcio mitocondrial y antagonistas. Efecto de Ang 1-9 6 h y antagonistas del receptor MAS y AT2: A779 10 μ M (Antagonista receptor MAS) y PD123319 1 μ M (Antagonista receptor AT2), agregados media hora antes que las preincubaciones de 6 h. n=5

Siguiendo la misma lógica que en las cinéticas medidas sin antagonistas, analizamos el tiempo que demoraban las señales en llegar al máximo de fluorescencia, lo que podría dar cuenta de la velocidad de ingreso de calcio a la mitocondria, constatando que el antagonismo del receptor AT2 no produce cambios en el tiempo en llegar al máximo de fluorescencia, comparados con la preincubación de Ang 1-9 sin antagonistas y al mismo tiempo, el antagonismo del receptor AT2 modula la cinética mitocondrial, llevándola a valores idénticos al control, lo que nos indicaría que al menos el aumento en la velocidad de la cinética inducido por la Ang 1-9 se ve anulado al bloquear el receptor AT2 y no así el MAS, por lo que sería efectivamente la vía Ang 1-9/AT2 la que estaría dando cuenta de esta propiedad (Figura 16).

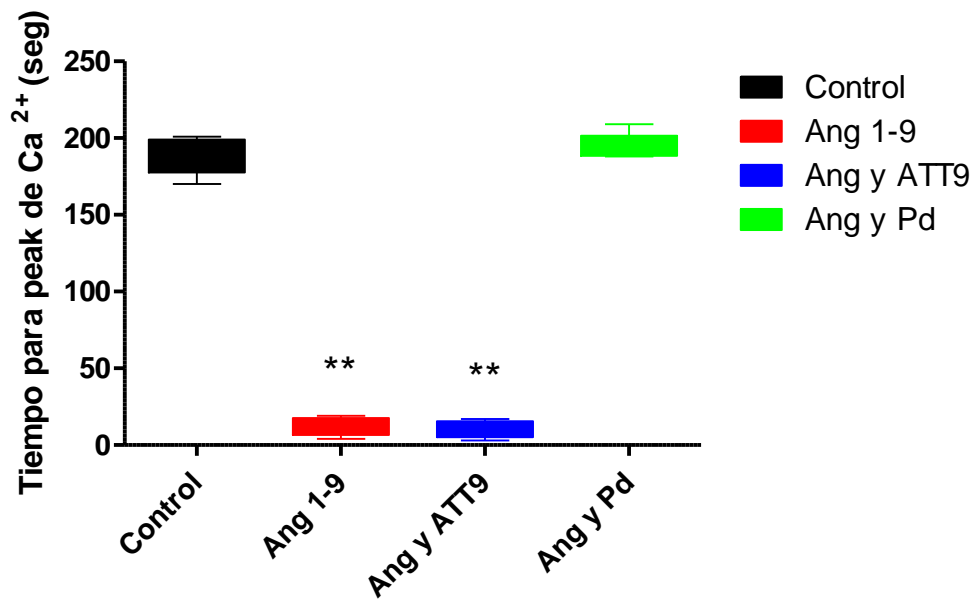


Figura 16: Tiempo en llegar al máximo de fluorescencia en cinética de calcio mitocondrial y antagonistas. Tanto Ang 1-9 sola como Ang 1-9 y ATT9 tardaron significativamente menos segundos en alcanzar el máximo de fluorescencia, entendido como cantidad de calcio dentro de la mitocondria. $n = 5$ ** $p < 0,001$

Para estudiar finalmente si el mero tratamiento con antagonistas produce la disminución en magnitud en las cinéticas observadas en la figura 15 realizamos la medición de las cinéticas de los controles de los antagonistas por sí solos (sin preincubación de Ang 1-9) y pudimos apreciar que efectivamente el pretratamiento con los antagonistas produce disminución de la respuesta basal, lo que explicaría entonces las menores áreas medidas en las condiciones con pretratamiento y preincubaciones (Figuras 17 y 18).

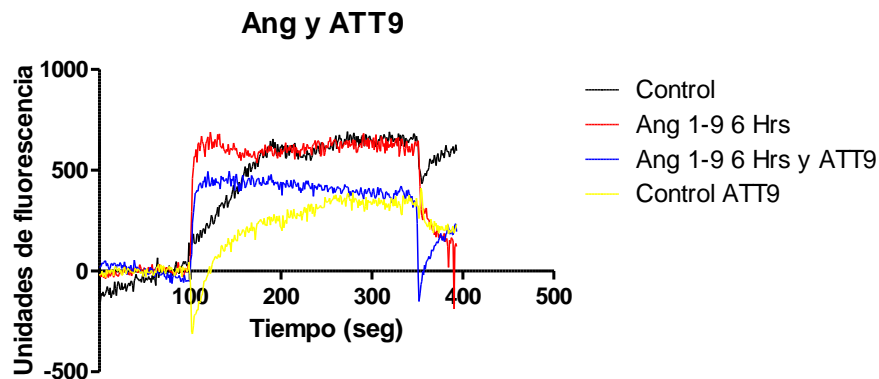


Figura 17: Comparación respuesta Ang 1-9 + A779 y Control A779. *Cinética de calcio mitocondrial de 5 experimentos independientes; A779 concentración 10 μ M.*

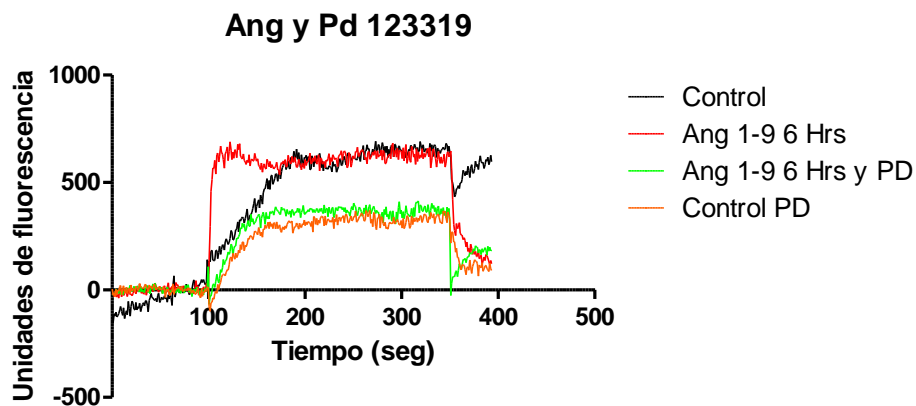


Figura 18: Comparación respuesta Ang 1-9 + PD123319 y control PD. *Cinética de calcio mitocondrial de 5 experimentos independientes; PD123319 concentración 1 μ M.*

Para estudiar la cantidad de calcio mitocondrial movilizado, en todas las condiciones, nuevamente se determinó el área bajo la curva y se constató que efectivamente el pretratamiento con antagonistas disminuyó la cantidad de fluorescencia en comparación con el control y/o la condición de preincubación sin antagonistas, observándose una mayor área en la condición con el antagonista del receptor MAS vs. la misma condición, pero con antagonista del

receptor AT2. Interesantemente, ambas áreas se encuentran significativamente debajo del área de la condición control y en el caso del bloqueo del receptor MAS, la preincubación con Ang 1-9 fue capaz de evitar la disminución producida por el mero tratamiento con el antagonista (Figura 19).

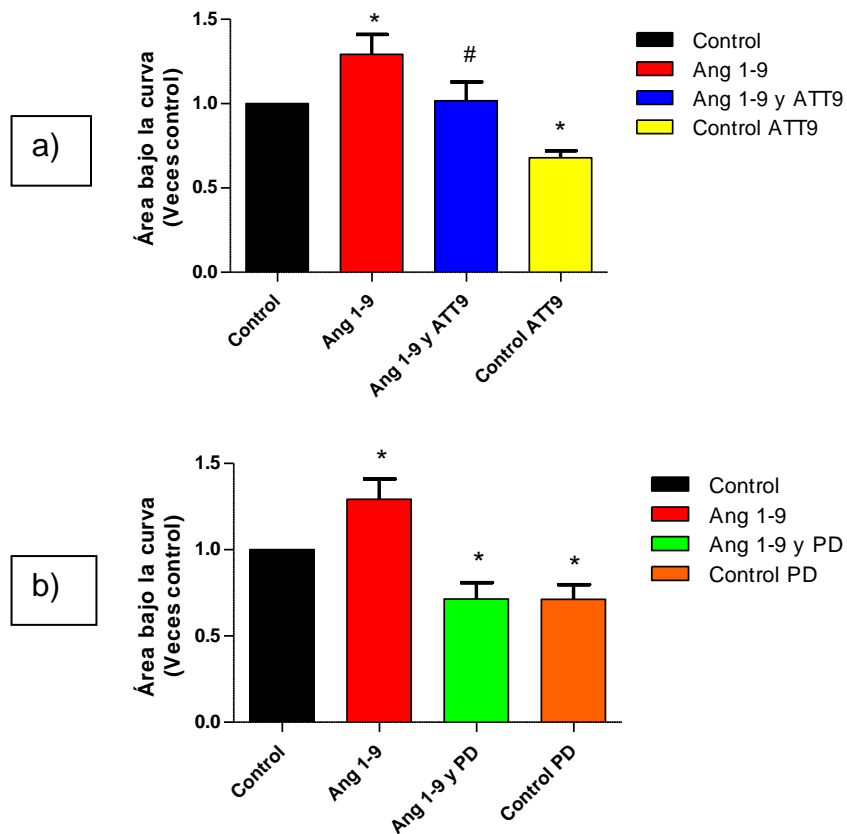


Figura 19: Áreas bajo la curva de cinética de calcio mitocondrial y antagonistas. a) Comparación antagonismo receptor MAS. b) Comparación antagonismo receptor AT2. Las barras representan el área bajo la curva en las cinéticas de calcio mitocondrial medidas por fluorescencia. $n=5$; * $p < 0,05$ vs Control #; $p < 0,05$ vs Control A779.

6.4. Estudios de colocación retículo-mitocondria

Para estudiar si el aumento de Ca^{2+} en la mitocondria, evidenciado en los experimentos anteriores, se explica mediante un acercamiento entre el RE y la mitocondria, considerando principalmente que:

- 1) Histamina como fue mencionado anteriormente, induce la activación del receptor de IP3 y la consiguiente salida de calcio desde el retículo; y
- 2) Se ha descrito que las mejoras en la eficiencia de entrega del Ca^{2+} desde el RE hacia a la mitocondria pueden ser explicadas, entre otras opciones, por un acercamiento entre estos organelos ⁵⁸,

Se realizaron estudios de colocación RE-mitocondria mediante inmunohistoquímica como se describe en Materiales y Métodos, utilizando anticuerpos específicos que se unen al retículo o mitocondria y a su vez son marcados con anticuerpos secundarios fluorescentes a distintas longitudes de onda, una de la otra, lo que permite estudiar con microscopía confocal en dos canales de manera simultánea la fluorescencia emitida por cada uno de ellos, para luego superponer las imágenes y estudiar mediante un software informático que distingue estas unidades de fluorescencia el nivel de cercanía que estas estructuras tienen lo que se conoce con el nombre de coeficiente de Manders ⁵⁷

Las condiciones medidas en estos estudios de colocalización fueron la preincubación de Ang 1-9 por 6 h, tratamiento de NE por 24 h (por sus características descritas sobre la hipertrofia y alejamiento retículo-mitocondria que produce) y preincubación de Ang 1-9 6 h previas al tratamiento de NE por 24 h, constatando diferencias de colocalización entre las condiciones de NE 24 h y NE 24 h/Ang 1-9 6 h (Figura 20).

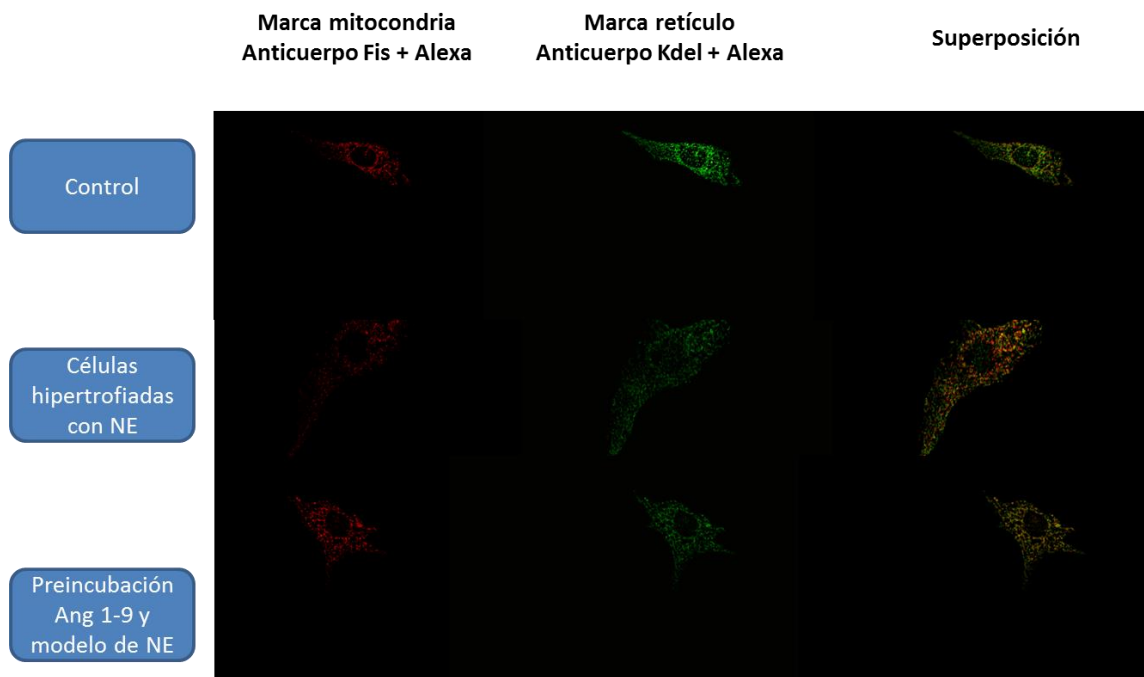


Figura 20: Imágenes del estudio de colocalización retículo mitocondria. *Imágenes de colocalización mitocondria/retículo obtenidas por microscopía confocal e inmunohistoquímica (descrito en materiales y métodos). Florescencia roja para mitocondria y verde para retículo. Tratamiento con NE por 24 hrs. Preincubación de Ang 1-9 6 hrs.*

Al realizar la cuantificación de la colocación mediante el coeficiente de Manders, se aprecia que la colocación mitocondria-RE en la condición de preincubación de Ang 1-9 por 6 h no varía con respecto al control, sin embargo, las células tratadas previamente con NE 10 μ M por 24 h evidencian una significativa disminución de la colocación con respecto al control, tal como había sido descrito, lo cual se relacionaría con un alejamiento entre el RE y la mitocondria. Finalmente el resultado más destacable fue que al preincubar por 6h con Ang 1-9 antes del tratamiento por 24 h de NE, se observó que no hay disminución en la colocación, lo que indicaría que la preincubación de Ang 1-9 por 6 h estaría de alguna forma previniendo el alejamiento inducido por el estímulo prohipertrófico de NE (Figuras 21 y 22).

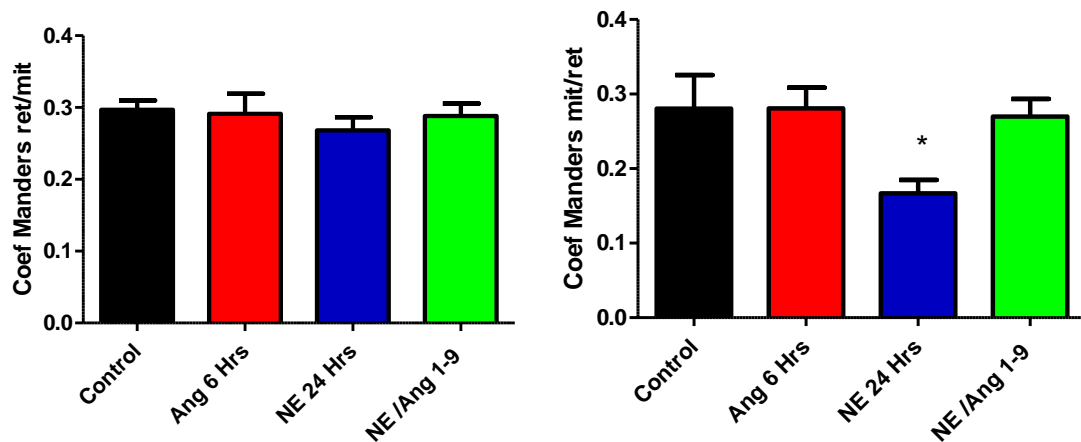


Figura 21 y 22: Coeficiente de Manders de la colocación retículo mitocondria. Las barras corresponden a la cantidad de fluorescencia amarilla, que se produce cuando las fluorescencia verde y roja se encuentran en el mismo lugar, lo que da cuenta de la colocación de las estructuras marcadas con estas fluorescencias. $n=3$; $*p < 0,05$

7. DISCUSIÓN

7.1. Importancia del Ca^{2+} en el desarrollo de hipertrofia. Las catecolaminas, endotelina-1, Ang II e IGF-1 han sido bien caracterizados como estímulos neurohumorales inductores de hipertrofia. Los tres primeros son capaces de actuar a través de la unión de sus receptores acoplados a proteínas G de la subclase $G_{\alpha q/\alpha 11}$ a $\text{PLC}\beta$, induciendo la generación de DAG quien activa a la proteína quinasa C y produce inositol 1,4,5 trifosfato Ins (1,4,5)P_3 , el que se acumula y lleva a la movilización de calcio desde el retículo endoplásmico⁶². Esta liberación de Ca^{2+} ha mostrado mediar la señalización de hipertrofia a través de la activación de la vía calcineurina-NFAT o la inactivación vía calmodulina-HDAC (histona deacetilasa). La activación de $G_{\alpha q/\alpha 11}$ es un potente inductor también de la vía MAPK, aunque el mecanismo exacto de este acoplamiento no ha sido descrito^{63,64}. La vía MAPK puede ser iniciada por: GPCRs, receptores de tirosina quinasa (IGF-1 y receptores del factor de crecimiento de fibroblastos), receptores de serina/treonina quinasa ($\text{TGF}\beta$) y estímulos de estiramiento, entre otros. Consiste en una secuencia de sucesivas quinasas que terminan fosforilando y activando a p38, JNKs y ERKs⁶⁵, los cuales son capaces de fosforilar a su vez múltiples blancos intracelulares, incluyendo numerosos factores transcripcionales que inducen la reprogramación de la expresión de genes fetales.

Junto con lo anterior, dos clases de quinasas han sido implicadas como reguladores de la hipertrofia cardiaca, CaMK y PKC, ambas activadas por Ca^{2+} . La sobreexpresión de CaMK II y IV en corazón produce un fenotipo de cardiomiopatía hipertrófica y la inhibición genética de CaMKII reduce la hipertrofia y mejora la función cardiaca durante una infusión de isoproterenol, indicando que esta es necesaria y suficiente para la inducción de hipertrofia cardíaca^{66,67,68}. A pesar de que la inhibición de las isoformas α , β y ϵ de PKC han mostrado no estar involucradas en la regulación de la hipertrofia cardíaca, la sobreexpresión de estas isoformas, puede inducir hipertrofia en ratones transgénicos⁶⁹

Otro importante regulador de hipertrofia involucra las enzimas HDAC (histona deacetilasas) que llevan a alteraciones en la expresión génica mediadas por remodelamiento de cromatina. Estas enzimas son reguladas a través de fosforilación. Por ejemplo las señales mediadas a través de proteínas quinasas como PKC, PKD o CaMKII fosforilan a las HDACs resultando en la subsecuente importación al núcleo interactuando físicamente con factores transcripcionales que regulan el crecimiento y diferenciación celular como MEF-2 (myocyte enhancer factor-2)⁷⁰. Estudios in vivo señalan una relación entre la fosforilación de HDAC5 y HDAC9 con la hipertrofia inducida por sobrecarga de presión o activación de calcineurina⁷¹.

7.2. Efecto directo sobre el Ca^{2+} mitocondrial. La finalidad de medir las variaciones sobre la cantidad de Ca^{2+} mitocondrial, es orientarnos en el tipo de señalización que pudiese estar involucrada en nuestras condiciones de prueba. Tomando en cuenta la información anterior que pone al Ca^{2+} como principal participante dentro de la génesis de la hipertrofia del cardiomiocito, sumada a la creciente evidencia de las propiedades *in vitro* e *in vivo* de la Ang 1-9 en términos de prevención de hipertrofia inducida por endotelina-1, Ang II, NE e IGF-1, a través de la acción del recientemente conocido receptor AT2 y la importante información aportada por las investigaciones realizadas en el laboratorio mencionadas en la introducción de este trabajo en donde la NE afecta el traspaso de calcio desde el retículo a la mitocondria y que la Ang 1-9 disminuye los niveles intracelulares de calcio luego de un estímulo de NE, en esta tesis nosotros quisimos estudiar inicialmente los efectos directos sobre el calcio mitocondrial de Ang 1-9 (100 μM), NE (10 μM) e Histamina (100 mM), siendo las dos primeras las concentraciones descritas con efecto fisiológico sobre hipertrofia y la tercera corresponde a la concentración descrita capaz de conseguir la apertura de canales dependientes de IP_3 . Al estudiar las curvas, a pesar de que a simple vista pareciera verse un aumento en las cinéticas con los estímulos, al cuantificar y comparar con un control si estímulo pudimos determinar que no existe un aumento significativo en la fluorescencia de las cinéticas tanto de Ang 1-9 como de NE, pero si con el estímulo de Histamina.

7.3. Aumento en la liberación de Ca^{2+} desde el RE. Al obtener resultados negativos en la modulación de las cinéticas de calcio mitocondrial con Ang 1-9 e histamina y teniendo en cuenta que el pre-tratamiento con NE disminuyó la cantidad de Ca^{2+} ingresada a la mitocondria por histamina⁵⁵, un conocido activador de los canales dependientes de IP_3 , quisimos estudiar a continuación si Ang 1-9 podía potenciar de manera opuesta a NE la activación de estos canales.

Al graficar las distintas curvas de preincubación de Ang 1-9 con estímulo de histamina se apreció un cambio en su forma, llegando a un máximo de fluorescencia cada vez más rápido al ir aumentando el tiempo de preincubación de Ang 1-9, consiguiendo a las 6 horas el cambio más marcado. Hay dos consideraciones muy importantes que realizar en estas mediciones: Primero, con la sonda utilizada no es posible calcular y cuantificar de manera exacta las cantidades de calcio movilizadas, lo que significa que si bien somos capaces de obtener gráficos de cantidad de fluorescencia al medir el área bajo las curvas, estos gráficos sólo nos permiten estimar las variaciones de calcio a través de una interpretación de las curvas de manera más bien cualitativa. En segundo lugar, como la fluorescencia emitida depende de múltiples factores como la cantidad de la sonda cargada, el número de células por placa, tamaño de las células, concentración de la sonda, tiempo de exposición del láser en el

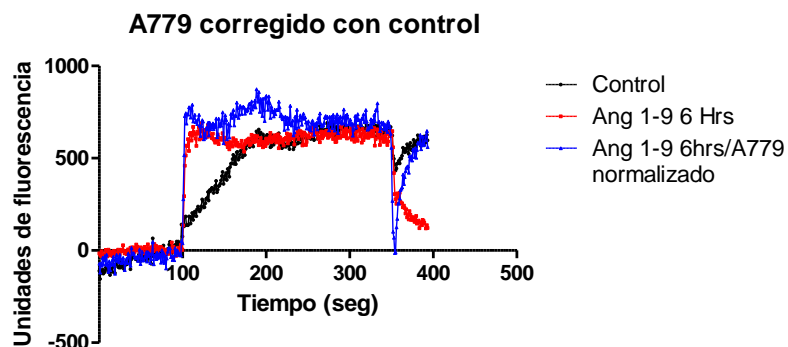
microscopio, etc. es necesario analizar y entender los resultados como veces de cambio con respecto a la situación control por lo que todas las cuantificaciones de aquí en adelante estarán relativizadas con respecto al control de cada experimento.

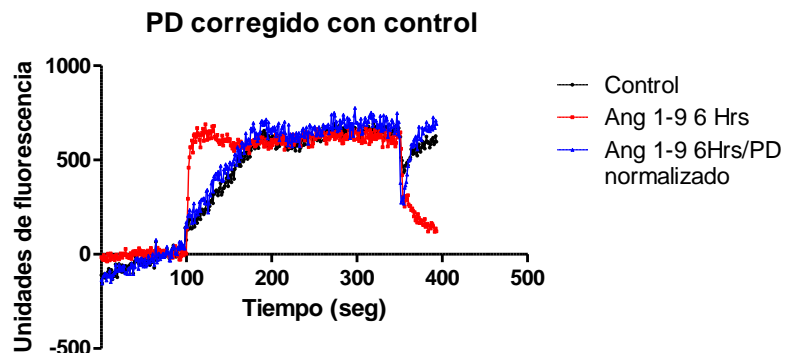
Teniendo en cuenta lo anterior podemos sostener que la disminución en el tiempo en llegar al máximo de fluorescencia, junto con una mayor área bajo la curva en las cinéticas de calcio mitocondriales con preincubación de 6 horas, pueden ser interpretadas como un ingreso más rápido de Ca^{2+} a la mitocondria desde el RE en esta condición, luego de un estímulo de histamina, y que esta entrada más rápida se traduciría en mayor cantidad de Ca^{2+} ingresado durante la cinética, en comparación con el control.

7.4. Bloqueo de respuesta con antagonistas. Como se mencionó en este trabajo, en la literatura se encuentra establecido que Ang 1-9 puede ser degradada por la ECA y formar Ang 1-7. De esta forma, al agregar estímulos de Ang 1-9 o realizar pre-incubaciones de ésta, era necesario corroborar que los efectos observados eran por la acción de la Ang 1-9 y no de la Ang 1-7 y la manera más sencilla de estudiar esto (al menos de manera preliminar) fue utilizar antagonistas para los receptores descritos de cada uno de estos péptidos.

Interesantemente los resultados obtenidos con los bloqueos de los receptores entregan información muy importante, en donde cabe destacar:

- Si estudiamos la forma de las curvas a través del parámetro *tiempo en llegar al máximo de fluorescencia*, podemos notar claramente que al bloquear AT2 la forma de la curva vuelve a ser como la del control, en contraposición al bloqueo del receptor MAS en donde se mantiene la misma forma que la preincubación de Ang 1-9 sin antagonista.
- Si estudiamos el área de las curvas, observamos por simple inspección visual y en los gráficos de cuantificación que los antagonistas disminuyen la respuesta basal a histamina por las células, lo que implicaría que estos receptores tendrían alguna participación en el normal funcionamiento de la señalización de calcio al interior del cardiomiocito. Sin embargo, si realizamos la corrección de las cinéticas con el control de los antagonistas, obtenemos curvas idénticas a las condiciones de control y Ang 1-9 6 horas, lo que implica que efectivamente es la disminución en la respuesta basal que producen los antagonistas por si solos, la que da cuenta de las menores curvas de Ang 1-9 con ambos antagonistas (Figura 23).





Figuras 23. Corrección tratamiento con antagonistas. Corrección de cinética, condiciones Ang 1-9 6h/A779 y Ang 1-9 6h/PD con sus respectivos controles.

Sería interesante continuar estudiando a estos receptores de manera de seguir caracterizando en que parte del proceso de señalización estarían interviniendo para contestar preguntas como ¿Cuáles son las moléculas que pueden actuar como agonistas y antagonistas endógenos de estos receptores? ¿Tendrán estos receptores alguna actividad intrínseca, sin necesidad de ser inducidos por algún agonista? ¿Afectarán basalmente la señalización de calcio en general al interior de la célula o tendrán puntos específicos de acción, como por ejemplo, la SERCA, el RyR, el RIP₃, los canales tipo L, etc.?

7.5. Cercanía RE-mitocondria. Luego de los resultados obtenidos, resultó muy importante saber si el aumento de Ca²⁺ ingresado a la mitocondria luego del estímulo de histamina estaba siendo mediado en alguna medida por un incremento en el contacto entre estos organelos, considerando primero que la

arquitectura y distribución celular es muy importante en la regulación de la señalización de Ca^{2+} intracelular⁷². Adicionalmente, también se tenía como antecedente, los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio en donde se estableció que al utilizar NE como modelo de hipertrofia, se observaba una disminución en los contactos entre el retículo y la mitocondria estudiados mediante estudios de colocalización con microscopía confocal⁵⁵.

El análisis de nuestros resultados respecto al parámetro de colocalización mostró que la preincubación de Ang 1-9 no produce un acercamiento entre el RE y la mitocondria, pero si se previene el alejamiento inducido por NE, lo que invita a reflexionar sobre si la colocalización es una consecuencia o causa de la hipertrofia y deja con interrogantes muy interesantes a abordar en próximas investigaciones frente al tema tales como ¿Serán las diferencias en el manejo del calcio intracelular en condiciones patológicas las que llevaran a este alejamiento entre estos organelos?, ¿Será deletéreo o beneficioso para la homeostasis del calcio este alejamiento? ¿Formará parte de la señalización hacia la muerte celular programada?

De cualquier manera, el hecho de que no haya un acercamiento del RE con la mitocondria con la preincubación de Ang 1-9 por 6 h lleva también a la conclusión que la mejora en la eficiencia en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria proveniente del RE responde a otro tipo de control, de manera que será necesario seguir investigando quien es el responsable de este fenómeno,

apareciendo nuevos candidatos, como el que dejaremos mencionado en la siguiente sección, el cual será necesario evaluar experimentalmente en futuras investigaciones.

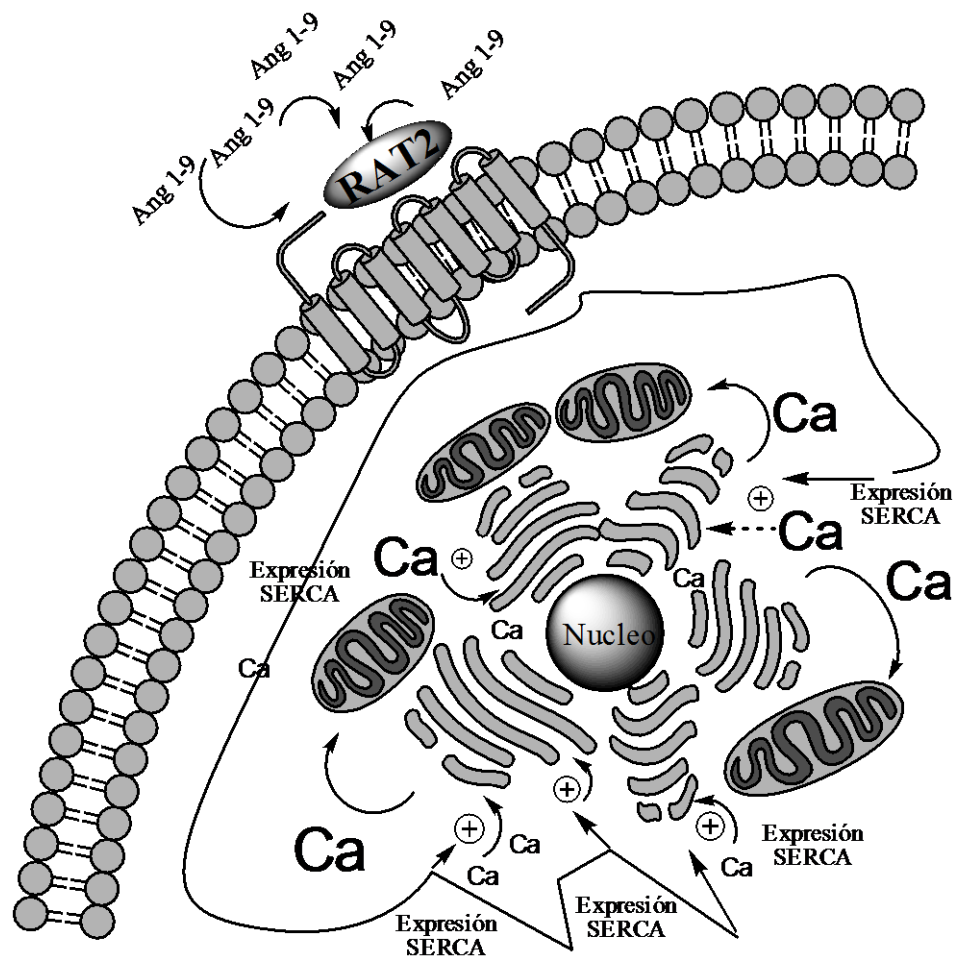


Figura 24. Nuevos candidatos en señalización de calcio: Aumento en expresión o actividad de SERCA. Modelo propuesto que podría explicar los resultados obtenidos en términos de mayor capacidad de secuestrar calcio ingresado a la célula por cualquier vía (como por ejemplo el ingresado desde el extracelular por un estímulo de NE) y una mayor capacidad de entrega frente desde el retículo hacia la mitocondria (frente por ejemplo a activación de canales dependientes de IP_3 conseguidos con histamina)

8. CONCLUSIONES

✓ Angiotensina 1-9 mejora la eficiencia de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria luego de ser evocado éste desde el RE mediante la activación de receptores dependientes de IP_3 . Este aumento en la cantidad de Ca^{2+} es consistente también con un aumento en la velocidad de ingreso del mismo y se requiere de una ventana de tiempo de preincubación de horas del péptido Ang 1-9 para conseguir los efectos descritos en nuestros resultados, dándonos cuenta de que los fenómenos observados no serían resultado de una acción directa ni espontánea sobre canales o receptores que regulen este Ca^{2+} , sino que más bien una sumatoria de eventos que culminaría con un diferente manejo de este ion.

✓ Interesantemente y en contra de nuestras primeras suposiciones, esta mejora en la eficiencia de ingreso de Ca^{2+} no está relacionada con un mayor contacto físico entre el RE y la mitocondria, aunque la preincubación de la angiotensina 1-9 si bloqueó el alejamiento de estos organelos inducido por un estímulo prohipertrófico, sugiriéndonos que tal vez este fenómeno de mayor o menor contacto subyace a otro proceso anterior que es regulado por nuestro péptido de estudio.

- ✓ Además de los interesantes resultados en la modulación de cinéticas de Ca^{2+} mitocondrial, cabe destacar que se requiere la activación del receptor AT2 y no del receptor MAS para conseguir efectos descritos, lo cual es concordante con lo descrito en la literatura.

- ✓ Al analizar todo lo anterior podemos notar que angiotensina 1-9 al unirse a su receptor AT2 genera cambios al interior del cardiomiocito que previenen y se contraponen a los fenómenos intracelulares producidos por estímulos hipertróficos, lo que muy presumiblemente estaría dando cuenta de su efecto antihipertrófico descrito *in vivo* e *in vitro*.

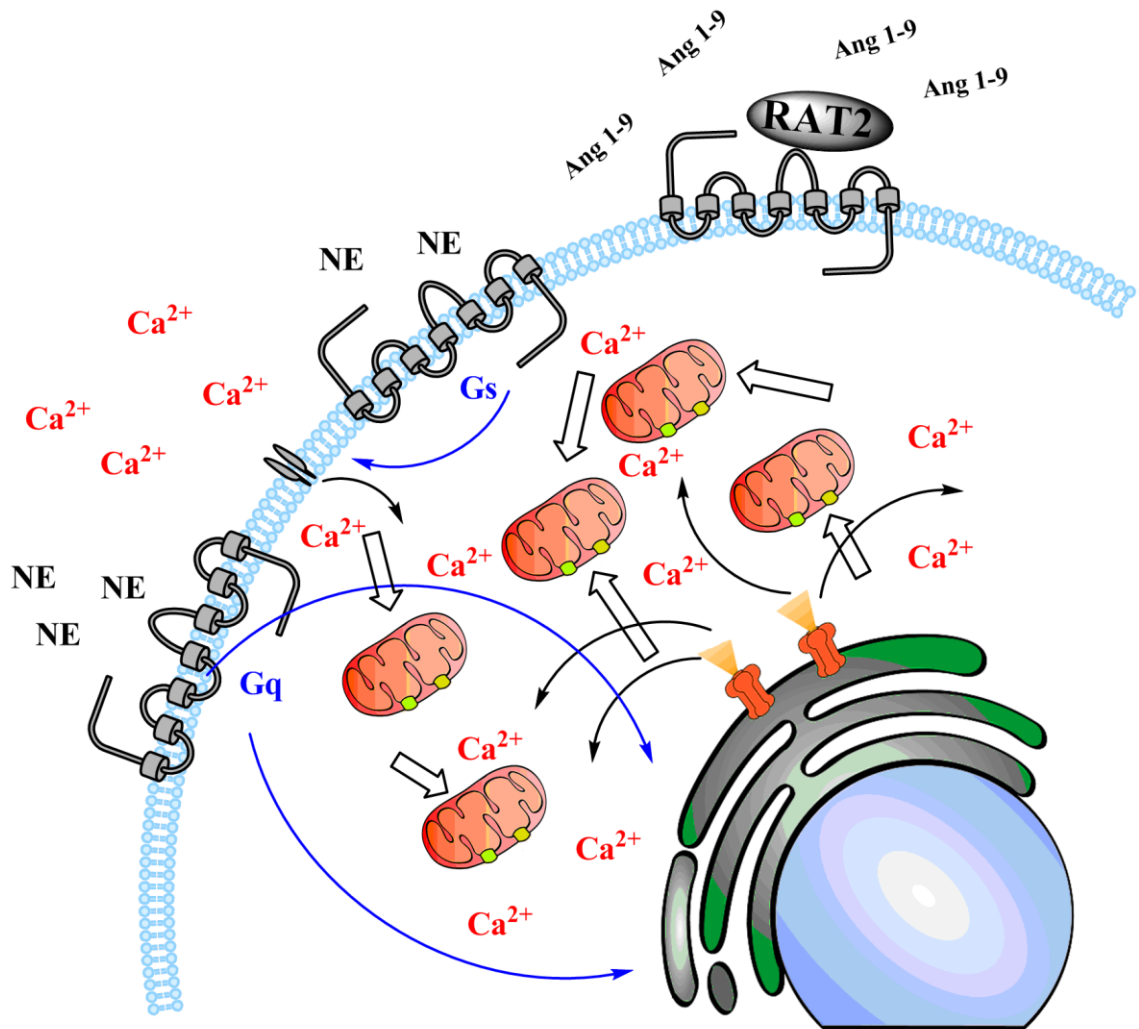


Figura 25: Modelo final. La unión de Ang 1-9 a su receptor aumenta la cantidad y la velocidad en la entrada de calcio a la mitocondria luego de la salida desde el retículo endoplásmico.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Tigerstedt, R. "et al". 1898. Niere und Kreislauf *Acta Physiol Scand* 8, 223–71.
2. Timmermans, P. "et al". 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonist. *Pharmacol Rev.* 45, 205–51.
3. Kumar, R. "et al". 2007. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab.* 18, 208–14.
4. Fyhrquist, F. & Saijonmaa, O. 2008. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 264, 224–36.
5. Griendling, K. "et al". 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86, 494–501.
6. Mehta, P. & Griendling, K. 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292, 82–97.
7. Hunyady, L. & Catt, K. 2006. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Cell Endocrinol.* 20, 953–70.
8. Zini, S. "et al". 1996. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 11968–73.
9. Gammelgaard, I. "et al". 2006. Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Acta Physiol* 188, 129–38.
10. Albiston, a L. "et al". 2001. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem.* 276, 48623–6.
11. Kerins, D. "et al". 1995. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* 96, 2515–2520.

12. Ruiz-Ortega, M., Esteban, V. & Egido, J. 2007. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med.* 17, 19–25.
13. Schiavone, M. “et al”. 1988. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85, 4095–8.
14. Ferrario, C. M. 2006. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 47, 515–21.
15. Sampaio, W. O. “et al”. 2007. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 49, 185–92.
16. Dias-Peixoto, M. F. “et al”. 2008. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 52, 542–8.
17. Santos, R. a S. “et al”. 2006. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 47, 996–1002.
18. Donoghue, M. “et al”. 2000. A novel angiotensin-converting enzyme – related to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 87, 1–9.
19. Drummer, O. H., Kourtis, S. & Johnson, H. 1990. Effect of chronic enalapril treatment on enzymes responsible for the catabolism of angiotensin I and formation of angiotensin II. *Biochem Pharmacol.* 39, 513–518.
20. Erdos, E. “et al”. 2002. Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. *J Mol Cell Cardiol.* 34, 1569–1576.
21. Ocaranza, M. P. “et al”. 2010. Angiotensin-(1–9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens* 28, 1054–1064.
22. Flores-Muñoz, M. “et al”. 2011. a Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J Physiol.* 589, 939–51.

23. Flores-Muñoz, M. "et al". 2012. Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertension* 59, 300–7.
24. Barauna, V. G. "et al". 2013. Shear Stress-induced Ang II AT1 receptor activation: G-protein dependent and independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1–6.
25. Zou, Y. "et al". 2004. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol.* 6, 499–506.
26. Stoll, M. & Unger, T. 2001. Angiotensin and its AT2 receptor: new insights into an old system. *Regul Pept.* 99, 175–82.
27. Grady, E. "et al". 1991. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest.* 88, 921–33.
28. Mukoyama, M. "et al". 1993. Expression cloning of type 2 Angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.* 268, 2–5.
29. Bottari, S. P. "et al". 1992. The angiotensin AT2 receptor stimulates protein activity and mediates inhibition of particulate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 183, 206–211.
30. Huang, X. C., Richards, E. M. & Sumners, C. 1996. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem.* 271, 15635–41.
31. Frey, N. "et al". 2004. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109, 1580–9.
32. Dorn, G. W., Robbins, J. & Sugden, P. H. 2003. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res.* 92, 1171–5.
33. Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L. P. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 56, 56–64.
34. Sadoshima, J. & Izumo, S. 1997. The cellular and molecular response of cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 551–71.

35. Carreño, J. E. "et al". 2006. Cardiac hypertrophy: Molecular and cellular events. *Rev Esp Cardiol.* 59, 473–486.
36. Díez, J. "et al". 2001. Respuestas del miocardio al estrés biomecánico. *Rev Esp Cardiol.* 54, 507–515.
37. Lupu, F. "et al". 2001. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol.* 229, 141–62.
38. Molkenin, J. D. & Dorn II, G. W. 2001. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 391–426.
39. Vandeburgh, H. "et al". 1992. Mechanical forces and their second messengers in stimulating cell growth in vitro. *Am J Physiol.* 262, 350–355.
40. Komuro, I. 2001. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Circ J.* 65, 353–8.
41. Bowman, J. C. "et al". 1997. Expression of protein kinase C in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J. Clin. Invest.* 100, 2189–2195.
42. Molkenin, J. D. "et al". 1998. A Calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215–228.
43. Liang, Q. "et al". 2001. The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 276, 30245–53.
44. Bers, D. M., Despa, S. & Bossuyt, J. 2006. Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1080, 165–77.
45. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 517–29.
46. Bootman, M. D., Berridge, M. J. & Roderick, H. L. 2002. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol.* 12, 563–5.
47. Mikoshiba, K. 2007. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem.* 102, 1426–46.

48. Zissimopoulos, S. & Lai, F. A. 2007. Ryanodine receptor structure, function and pathophysiology. *J Biol Chem.* 12, 287–342.
49. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. 2000. The versatility and signalling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1, 11–21.
50. Kim, D. “et al”. 1997. Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* 389, 290–293.
51. Houser, S.R. & Molkenin, J.D. 2009. Does contractile Ca^{2+} control calcineurin-NFAT signaling and pathological hypertrophy in cardiac myocytes? *Sci Signal.* 1, 1–7.
52. Gao, H. “et al”. 2012. $\text{Ca}(2+)$ influx through L-type $\text{Ca}(2+)$ channels and transient receptor potential channels activates pathological hypertrophy signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 53, 657–67.
53. Xu, H. “et al”. 2012. Effect of distinct sources of $\text{Ca}(2+)$ on cardiac hypertrophy in cardiomyocytes. *Exp Biol Med.* 237, 271–8.
54. Hechenleitner J., A. 2011. Regulación de los niveles intracelulares de calcio por angiotensina (1, 9) en el cardiomiocito. Memoria de Químico Farmacéutico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 48p
55. Gutiérrez T., A. 2012. Estudio de la señalización de insulina en cardiomiocitos hipertróficos. Memoria para postular al grado de magister en bioquímica. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 67p.
56. Contreras-Ferrat, A “et al”. 2010. An inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-IP3 receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology* 151, 4665–77.
57. Manders, E. M. M., Verbeek, F. J. & Aten, A. 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc.* 169, 375–382.
58. Bravo, R. “et al”. 2011. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci.* 124, 2511–2511.

59. Rizzuto, R., Simpson, a W., Brini, M. & Pozzan, T. 1992. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 358, 325–7.
60. Clarke, C. “et al”. 2013. Regulation of cardiovascular remodeling by the counter-regulatory axis of the renin-angiotensin system. *Future Cardiol.* 9, 23–38.
61. Ocaranza, M. P. & Jalil, J. E. 2012. Protective role of the ACE2/Ang-(1-9) axis in cardiovascular remodeling. *Int J Hypertens.* 1–12.
62. Heineke, J. & Molkentin, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 589–600.
63. Wilkins, B. J. & Molkentin, J. D. 2004. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 322, 1178–91.
64. Wu, X. “et al”. 2006. Signaling in cardiac myocyte excitation- transcription coupling. *J Clin Invest.* 116, 675–682.
65. Garrington, T. P. & Johnson, G. L. 1999, Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 211–8.
66. Passier, R. “et al”. 2000. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest.* 105, 1395–406.
67. Zhang, R. “et al”. 2005. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nature Med* 11, 409–17.
68. Zhang, T. “et al”. 2003. The delta C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res.* 92, 912–9.
69. Dorn II, G. W. & Force, T. 2005. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 115, 527–537.
70. Miska, E. a “et al”. 1999. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* 18, 5099–107.

71. Zhang, C. L. "et al". 2002. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110, 479–88.
72. Rizzuto, R. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763–1766.