

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



PAPEL DE LA POLICISTINA-1 EN EL DAÑO INDUCIDO POR LA ISQUEMIA/REPERFUSION CARDIACA

PABLO ROMERO ROMANO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN FISIOPATOLOGIA**

Directoras de Tesis: Prof. Dra. Zully Pedrozo Cibils

Dra. Paulina Donoso Laurent

(2017)

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

PABLO ROMERO ROMANO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiopatología. en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 de Octubre de 2017.

Prof. Dra. Zully Pedrozo Cibils

Prof. Dra. Paulina Donoso Laurent

Directoras de Tesis

Laboratorio de Mecanotransducción en Fisiopatología Cardíaca,

Programa de Fisiología y Biofísica,

Instituto de Ciencias Biomedicas

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Ricardo Bull

Prof. Dr. Mario Chiong

Prof. Dra. Lorena García

Prof. Dr. Ramón Rodrigo

Presidente Comisión

DEDICATORIA

*“A mis padres, Moisés y Jacqueline,
y hermanos, David y Fernando,
por ser mi fuente de inspiración
y los pilares fundamentales
de mi vida”*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis Directoras de Tesis, Prof. Dra. Zully Pedrozo y Prof. Dra. Paulina Donoso, quienes me han guiado, apoyado y confiado en mí para el desarrollo de esta Tesis.

A la Prof. Dra. Gina Sánchez, coordinadora del Magister en Fisiopatología, por dirigirme en mi Unidad de Investigación, orientarme y siempre estar presente durante la realización del magíster.

A los integrantes del laboratorio y colaboradores (Pablo, Ivonne, Adriana, Cristian y Alicia), en especial a Alejandra Vielma, quien me ayudo a la realización de los experimentos, y a Nicole De Gregorio, quien fue clave para la coordinación de los animales requeridos.

A Guillermo Arce y Rodrigo Durán, quienes han tenido una voluntad inagotable para que tuviera todo lo necesario en el laboratorio durante el desarrollo de los experimentos.

A mi familia (Jacqueline, Moisés, Fernando y David), quienes me acompañan, apoyan en el día a día y hacen que todos mis proyectos y desafíos sean más fáciles.

A mi abuela Catalina y tío Pablo, quienes siempre han estado para mí cuando los he necesitado.

A mis docentes y compañeros de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, tanto de pregrado como postgrado, por su apoyo incondicional; en especial a mis tutores, Dr. Marcelo Mardones y Dra. Francisca Donoso, y a compañero de meritancia Matías.

A mis amigos y todos lo que han compartido conmigo durante este periodo, que de una u otra forma han sido un aporte en este proceso.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	
Epidemiología	3
Isquemia reperfusión	3
Cambios en la concentración del ión calcio y estrés oxidativo	4
Cambios en el pH durante la IR	5
Estrés mecánico y protección del daño por isquemia-reperfusión	6
Policistina-1	6
Estructura de la Policistina-1	6
Expresión de la Policistina-1 en diferentes tejidos	7
Policistina-1 y su papel en el sistema cardiovascular	7
Policistina-1, calcio intracelular y estrés oxidativo	8
Policistina-1 y el daño por isquemia-reperfusión	9
IV. HIPÓTESIS	10
V. OBJETIVOS	
General	10
Específicos	10
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
Modelo animal	11
Isquemia-reperfusión <i>ex vivo</i>	11
Cuantificación del tamaño de infarto	13
Medida de los niveles de la Lactato Deshidrogenasa en el perfundido	13
Análisis de proteínas	13

Análisis estadístico y cálculo del tamaño de la muestra	14
Criterios de exclusión	14
VII. RESULTADOS OBTENIDOS	
Tamaño de infarto	15
Medición de LDH	15
Parámetros hemodinámicos	17
Niveles de estrés oxidativo	19
VIII. DISCUSIÓN	21
IX. BIBLIOGRAFÍA	27
X. ANEXOS	
Aprobación Protocolo Comité de Ética	36

I. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares corresponden a una de las mayores causas de muerte en el mundo, donde el infarto agudo del miocardio es responsable de la mayoría de ellas. Diferentes vías confluyen en el daño y muerte del tejido cardíaco durante el infarto. Sin embargo las principales corresponden al aumento descontrolado tanto de especies reactivas de oxígeno (EROS), como de iones calcio (Ca^{2+}) citoplasmáticos. A pesar de esto se desconoce la totalidad de mecanismos implicados durante este tipo de patología.

La policistina-1 (PC1) es una proteína transmembrana, producto del gen *PKD1*, clave en la función cardíaca en condiciones fisiológicas, lo cual podría estar relacionado al hecho de que regula los niveles proteicos de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje tipo-L en la membrana de los cardiomiocitos. Además, se ha reportado que la PC1 regula las concentraciones de Ca^{2+} y de ROS citoplasmáticos y que su ausencia aumenta el daño posterior a la isquemia-reperfusión renal. A pesar de lo anterior, se desconoce el papel de la PC1 en condiciones de isquemia-reperfusión (IR) cardíaca.

En esta tesis se evaluó la hipótesis que la ausencia de la PC1 en los cardiomiocitos aumenta el estrés oxidativo y el daño producido por la IR cardíaca.

Utilizamos un modelo *ex vivo* de IR en corazones de ratones controles ($\text{PC1}^{\text{F/F}}$) y *knockout* para la PC1 en los cardiomiocitos (PC1 KO).

Los resultados indican que los corazones de los ratones PC1 KO sometidos a IR, en comparación a los $\text{PC1}^{\text{F/F}}$, presentan un mayor tamaño de infarto y cantidad de LDH, dando cuenta de una mayor muerte del miocardio posterior a una IR. Sin embargo, al comparar los parámetros hemodinámicos, no existieron diferencias entre ambos grupos. En cuanto a los EROS, los corazones PC1 KO sometidos a IR, presentaron niveles mayores de proteínas carboniladas y nitradas que los ratones $\text{PC1}^{\text{F/F}}$.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que la PC1 es una proteína que evita un mayor daño durante la IR cardíaca, lo cual podría estar asociado con su capacidad para evitar un aumento del estrés oxidativo durante la IR.

II.ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the most important causes of death world wide, and acute myocardial infarction is responsible for the most of them. Different mechanisms are involved in the injury and death of the myocardium during an infarct. However, the main mechanisms are the uncontrolled increase of reactive oxygen species (ROS) and cytoplasmatic calcium (Ca^{2+}). Nevertheless, many of the mechanisms implicated in this pathology are still unknown.

Polycystin-1 (PC1) is a transmembrane protein product of the translation of PKD1 gene, which plays a key role in the cardiac function in physiological conditions; this could be related to the fact that PC1 regulates the voltage-dependent Ca^{2+} channels in the membrane of the cardiomyocytes. It has been reported that PC1 regulates the concentrations of Ca^{2+} and ROS in the cytoplasm, and that the absence of PC1 increases the damage after renal ischemia-reperfusion. In spite of this, the role of PC1 under myocardial ischemia reperfusion (IR) is unclear.

The hypothesis that the absence of PC1 in the cardiomyocytes increases the oxidative stress and the damage produced by myocardial IR was evaluated in this thesis.

An *ex vivo* model of myocardial IR, in control mouse hearts ($\text{PC1}^{\text{F/F}}$) and *knockout* for PC1 mouse hearts (PC1 KO) was used for this purpose.

The results show that the PC1 KO hearts submitted to IR presented bigger infarct size and higher amount of LDH in comparison with $\text{PC1}^{\text{F/F}}$, indicating more death of the myocardium after IR, although they did not show differences in hemodynamic parameters. In relation to the levels of ROS after IR, PC1 KO hearts showed higher levels of protein carbonilation and nitrotyrosination in comparison with $\text{PC}^{\text{F/F}}$.

The results of this investigation suggest that PC1 is a protein that prevents the damage during myocardial IR, and this could be associated to its role in preventing the increase of ROS during IR.

III.INTRODUCCIÓN

Epidemiología

Chile, como país en vía de desarrollo, presenta cambios demográfico-epidemiológicos caracterizado por un predominio de enfermedades crónicas no transmisibles y un marcado aumento de la mortalidad por causas cardiovasculares (1-3). Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las causas más importantes de discapacidad y muerte prematura en todo el mundo y en nuestro país constituyen la primera causa de muerte, correspondiendo aproximadamente al 27 % de las muertes totales (4).

El infarto agudo del miocardio (IAM), responsable del 73,6 % de las muertes nacionales asociadas a enfermedades cardiovasculares, constituye un problema prioritario de salud pública debido a su gran impacto (5). Está caracterizado por un flujo sanguíneo insuficiente a regiones determinadas del miocardio (isquemia), que en consecuencia experimentan necrosis tisular (infarto), (6). Esta entidad clínica se puede desarrollar como consecuencia de una amplia variedad de enfermedades, incluyendo la hipertensión arterial, aterosclerosis, dislipidemia y diabetes mellitus (6). El tratamiento estándar para el IAM implica el uso agudo con drogas trombolíticas o procedimientos intervencionistas (7).

Isquemia-Reperfusión

Posterior a la isquemia del miocardio la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión), es un prerrequisito absoluto para la recuperación, aunque sea parcial del tejido cardiaco (8). Sin embargo, la reperfusión *per se* conlleva a un daño que aumenta la lesión tisular más allá de la producida por la isquemia sola (7, 9). Este daño celular que se produce posterior a la reperfusión del miocardio isquémico previamente viable ha sido definido como daño por isquemia-reperfusión (IR), (9).

Las alteraciones funcionales que se pueden observar posterior a este daño incluyen; depresión de la contractilidad, arritmias de reperfusión, reactividad vascular disminuida y muerte del cardiomiocito, incluyendo el fenómeno de no reflujo (6, 7, 9,

10). Entre éstas, el deterioro de la función contráctil post isquémica puede evidenciarse por alteraciones como la disminución de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) y el aumento de la presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo (PFDVI). Estas alteraciones durante el periodo de reperfusión se relacionan en forma directa con la duración del episodio isquémico previo y la temporalidad en que la reperfusión sea aplicada (8, 11).

Cambios en la concentración del ión calcio y estrés oxidativo

El daño inducido por la IR involucra a un gran número de moléculas y procesos celulares que no han sido completamente dilucidados. No obstante, este daño se puede resumir en dos mecanismos interrelacionados entre sí (10). El primero corresponde al aumento del ión calcio (Ca^{2+}) intracelular secundario a las alteraciones de los sistemas de transporte de las membranas celulares; el segundo corresponde al aumento en la producción y acumulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que provocan la oxidación de proteínas, peroxidación de la membrana celular y la pérdida de la integridad celular, facilitando el aumento de Ca^{2+} citoplasmático (12, 13). En ambos casos, el resultado final es una hipercontractura del cardiomiocito, que lo lleva a su muerte por distintas vías, necrosis y/o apoptosis. La activación plaquetaria y el daño mediado por neutrófilos, el sistema renina angiotensina y la activación del complemento también han sido sugeridas como mecanismos del daño por reperfusión (10).

Durante la reperfusión, el oxígeno molecular es reducido en forma secuencial para formar ROS, incluyendo el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, la descomposición espontánea del ácido peroxinitroso (ONOOH) proporciona una fuente adicional de OH^{\cdot} y dióxido de nitrógeno (NO_2), (14). Por otra parte, el peroxinitrito (ONOO^-) formado durante la reperfusión puede contribuir a amplificar la disfunción miocárdica del corazón isquémico (14). Así, el oxígeno que ingresa durante el inicio de la reperfusión evoca un potente aumento de ROS como se demuestra tanto en procesos experimentales

como en seres humanos sometidos a trombólisis (15), intervención coronaria percutánea (16) y cirugías de corazón abierto (17).

Numerosos mecanismos enzimáticos proporcionan una fuente intracelular de radicales libres, entre los más estudiados están la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa, la vía mitocondrial de la citocromo oxidasa, ciclooxigenasas, lipoxigenasas y la oxidación de las catecolaminas (14). Además, la reperfusión del tejido isquémico conduce a la rápida acumulación de neutrófilos en el sitio de la lesión, los que se adhieren al endotelio vascular, transmigran al espacio extravascular y pueden afectar negativamente el tejido viable a través de la liberación de enzimas proteolíticas y la generación de ROS (14).

El estrés oxidativo puede modificar varias biomoléculas como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (18). La mayoría de las modificaciones proteicas ocurridas durante la IR son irreparables y los cambios oxidativos producidos en su estructura tienen un amplio número de consecuencias en vías transduccionales, la actividad enzimática o el aumento de la susceptibilidad de agregación y proteólisis (18). Entre las modificaciones proteicas inducidas por estrés oxidativo estudiadas frecuentemente y utilizadas como marcadores de este, nos encontramos con algunas que son irreversibles como la carbonilación y la nitración y otras reversibles como la S-Glutationilación, estudiadas frecuentemente y utilizadas como marcadores de estrés oxidativo (18-23).

Cambios en el pH durante la IR

Durante la isquemia, la célula produce altos niveles de ácido láctico debido a que en los tejidos isquémicos la mayor fuente de ATP para la célula es la glicólisis. El producto final de la glicólisis es el piruvato, el que en condiciones de anaerobiosis no puede ser metabolizado por la mitocondria y es convertido en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Esta última reacción lleva a la acumulación de ácido láctico y la consecuente disminución del pH intracelular. Se cree que esta disminución en el pH es la mayor causa de daño durante la isquemia severa en tejido

cerebral y cardiaco (24-27). La detección de la actividad de la LDH en el líquido perfundido de los tejidos durante la reperfusión es usado comúnmente como un marcador de daño tisular (28, 29).

Estrés mecánico y protección del daño por isquemia-reperfusión

El corazón se encuentra sometido constantemente a un estiramiento fisiológico, el cual a través de los mecanosensores, señalizan entre otras cosas para la supervivencia celular (30), el crecimiento y la regulación de los ROS en los cardiomiocitos (30). Se ha reportado además que un estrés mecánico moderado previo al proceso de IR induce protección del tejido cardiaco (31), sugiriendo la importancia del estiramiento mecánico en la fisiopatología de las células que conforman el tejido cardiaco, sin embargo y a pesar de ello hasta el momento no se posee mucha información acerca de los mecanosensores involucrados.

Policistina-1

La policistina-1 es una proteína codificada por el gen *PKD1* (32). Mutaciones en este gen son los responsables de la aparición y desarrollo de la enfermedad poliquística renal autosómica dominante, ADPKD (por su sigla en inglés), (32).

Existen 8 genes que componen esta familia de proteínas asociadas a la membrana plasmática. Tanto la policistina-1 (PC1) como la policistina-2 (PC2), las proteínas más estudiadas de esta familia, son expresadas en diferentes tejidos pero su función ha sido principalmente caracterizada en el cilio primario de las células de los túbulos renales (32). En tanto la PC2 es un canal no selectivo de Ca^{2+} , la PC1 es un mecanosensor. Estas proteínas pueden actuar tanto de forma conjunta, donde la PC1 regula la función de la PC2, como independientemente (32).

Estructura de la Policistina-1

La PC1 es una proteína transmembrana compuesta por un gran extremo N-terminal extracelular (~3000 aminoácidos), 11 dominios transmembrana (~1000 aminoácidos) y un extremo C-terminal citoplasmático de unos 200-225 aminoácidos (33). El

dominio citoplasmático (cola C) posee sitios de interacción con proteínas G heterotriméricas, la cual *in vitro*, activa factores de transcripción como el activador de la proteína 1 y participa en la regulación de la vía de señalización Wnt entre otras (33).

Expresión de la Policistina-1 en diferentes tejidos

Si bien la mayoría de los trabajos acerca de la PC1 estudian su papel en las células de los túbulos renales, ésta proteína también se encuentra presente en el endotelio y las células musculares lisas de los vasos sanguíneos, postulándose un posible papel en la mantención de la integridad vascular y en la maduración del epitelio (34). Estudios recientes han demostrado que la PC1 tiene un papel importante además en el desarrollo y la respuesta del tejido óseo a la carga mecánica, induciendo la actividad osteoblástica a través de vías de señalización asociadas al Ca^{2+} intracelular (35). Se ha reportado además su expresión en páncreas, hígado y cardiomiocitos (32, 35).

Policistina-1 y su papel en el sistema cardiovascular

Los pacientes con ADPKD manifiestan diferentes síntomas extrarenales como la aparición de quistes pancreáticos y hepáticos, aneurismas cerebrales, diverticulitis colónica, infertilidad masculina y enfermedades cardiovasculares (36).

En relación a las alteraciones cardiovasculares, antecedentes previos reportan que un alto porcentaje de pacientes con ADPKD presentan manifestaciones cardíacas como la aparición temprana de hipertensión, hipertrofia ventricular izquierda, efusión pericárdica y anomalías valvulares que anteceden a las alteraciones renales (37).

Datos recientes de nuestro laboratorio indican que la PC1 es una proteína clave en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca inducida por estrés mecánico *in vitro* y por aumento de sobrecarga de presión *in vivo* (32). El mecanismo involucraría, por lo menos en parte, la estabilización de la subunidad $\alpha 1C$ (Cav1.2), de los canales de

Ca²⁺ sensibles a voltaje tipo-L (LTCC) por parte de la PC1 (32). Además, en dicho trabajo se demuestra que la PC1 tiene una función clave en la preservación de la función cardíaca en condiciones fisiológicas ya que, ratones deficientes en la expresión de la PC1 en los cardiomiocitos (PC1 *knockout*, PC1 KO) presentan una contractilidad disminuida con respecto a los controles y un aumento del diámetro del ventrículo izquierdo al final de sístole (32).

El papel de dicha proteína en condiciones patológicas como el de la IR cardíaca es desconocido hasta el momento.

Policistina-1, calcio intracelular y estrés oxidativo

Las alteraciones tanto en las señales de Ca²⁺ como en la generación de ROS intracelular contribuyen a la patogénesis de la hipertrofia y la falla cardíaca, así como al de la IR (32, 38, 39).

La PC1 es una proteína vinculada ampliamente a la regulación del Ca²⁺ intracelular en células epiteliales renales. Un cambio en el flujo en los túbulos renales induce el aumento del Ca²⁺ intracelular regulado por la PC1 en su función de sensor del esfuerzo tangencial generado por fluido tubular (*shear-stress*) (40). Por otro lado, nuestro laboratorio ha descrito que la PC1 es un nuevo regulador del contenido proteico de los LTCC en los cardiomiocitos (32), lo cual sugiere que también es un regulador de las concentraciones de Ca²⁺ en los cardiomiocitos.

Por otro lado, se encuentra descrito que células endoteliales provenientes de ratones *knockout* para la PC1 muestran un alto índice de estrés oxidativo comparado a células obtenidas de ratones controles (41), sugiriendo que la PC1 es capaz de regular los niveles de ROS en las células endoteliales. Se desconoce su función a este nivel en el tejido cardíaco.

Policistina-1 y el daño por isquemia-reperfusión

De acuerdo a los antecedentes anteriores y considerando que la PC1 ha sido reportada como un regulador de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y de ROS, cabe suponer que podría tener algún papel en el daño por IR. De hecho, se encuentra reportado que ratones haploinsuficientes para el gen *Pkd1* muestran un incremento del daño y la formación de quistes posterior a una IR renal (42), sugiriendo que la presencia de la PC1 es importante para evitar un aumento del daño inducido durante la IR.

Siendo la PC1 una proteína clave en la función cardíaca, la misma podría también tener entonces un papel en la protección del tejido cardíaco frente a la I/R, sin embargo dicha hipótesis no ha sido estudiada.

Considerando todos los antecedentes mencionados anteriormente, esta tesis propone estudiar el papel de la PC1 en el daño inducido por la IR cardíaca. Proponemos que la ausencia de la PC1 en los cardiomiocitos aumenta el daño producido por la IR cardíaca y que esto se podría explicar, aunque sea en parte, por un aumento del estrés oxidativo.

IV. HIPÓTESIS

La ausencia de la policistina-1 en los cardiomiocitos de ratones KO para el gen de la policistina- 1 (Pkd1), aumenta el estrés oxidativo y el daño producido por la isquemia-reperfusión cardíaca.

V.OBJETIVOS

General

Determinar el daño inducido por la isquemia-reperfusión cardíaca y el estrés oxidativo en ausencia de la policistina- 1.

Objetivos específicos

1) Evaluar la muerte del tejido cardíaco inducida por la IR en un modelo *ex vivo* de corazón de ratón en ausencia de la policistina-1.

Para responder a este objetivo se evaluó el tamaño de infarto posterior a la IR y la actividad de la lactato deshidrogenasa obtenido desde el perfundido de corazones de ratones controles y *knockout* para la PC1 sometidos a IR *ex vivo*.

2) Determinar la función cardíaca durante la IR inducida en un modelo *ex vivo* de corazón de ratón en ausencia de la policistina-1.

Para responder a este objetivo se registró, durante todo el proceso de IR, el desarrollo de presión en el ventrículo izquierdo (PDVI) y máxima derivada del desarrollo de presión (dP/dt). Los experimentos se desarrollaron en corazones de ratones controles y *knockout* para la PC1 en los cardiomiocitos.

3) Evaluar los niveles de estrés oxidativo inducido por la IR cardíaca en un modelo *ex vivo* de corazón de ratón en ausencia de la policistina-1.

Para desarrollar este objetivo se midieron los niveles de proteínas carboniladas y nitradas provenientes de corazones controles y *knockout* para la PC1, sometidos a IR.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo animal

Se utilizaron ratones (C57BL/6) silenciados para la expresión del gen de la PC1, *Pkd1*, en los cardiomiocitos (PC1 KO) y sus respectivos controles. De acuerdo a lo descrito previamente (32), la obtención de los PC1 KO se realizó a través de la cruce de ratones modificados genéticamente para portar un gen para la recombinasa cre, cuya expresión es controlada por el promotor de la cadena pesada de la α -miosina (α MHC cre), con ratones que poseen los alelos del gen de la PC1 flanqueados por sitios LoxP (PC1^{F/F}). Para comprobar el genotipo de los ratones se realizó la extracción de DNA desde un pequeño segmento de la cola de los mismos para realizar la genotipificación. Como controles se utilizaron los ratones PC1^{F/F}. El rango de edad de los ratones utilizados varió entre las 9 y 11 semanas de nacidos y el peso entre 22-25 g. Se obtuvo la aprobación del Protocolo de Bioética #0890, por parte del Comité de Bioética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ver carta de aprobación en Anexos).

Se utilizaron los siguientes grupos experimentales (todos los corazones perfundidos por 20 min para la estabilización previa al experimento):

Grupo A: Ratones controles (PC1^{F/F}) perfundidos durante 90 minutos.

Grupo B: Ratones PC1 KO perfundidos durante 90 minutos.

Grupo C: Ratones controles (PC1^{F/F}), sometidos a 30 min de isquemia seguidos de 60 minutos de reperfusión.

Grupo D: Ratones PC1 KO, sometidos a 30 min de isquemia seguidos de 60 minutos de reperfusión.

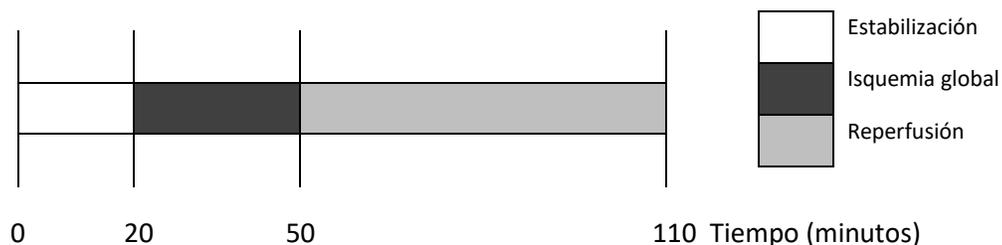
2. Isquemia-reperfusión ex vivo

Los ratones de los grupos descritos previamente en el punto (1) de esta sección fueron anestesiados con pentobarbital sódico intraperitoneal (40 mg/kg con 33 UI de heparina, i.p). Una vez que se determinó que el animal no presentaba signos de dolor se procedió a la apertura del tórax, canulación de la aorta y extracción del corazón. Posteriormente se realizó la perfusión retrógrada (Langendorff) con una

solución Krebs-Henseleit (en mM: 118 NaCl, 4,75 KCl, 2,5 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄ y 11 glucosa), burbujeada con una mezcla de 5 % de CO₂ y 95 % de O₂, mantenida a 37 °C con un flujo constante de perfusión de 3-4 mL/min.

Luego de comenzar la perfusión se procedió a la extracción de la aurícula izquierda y bloqueo de la vía de conducción aurícula-ventricular. Se colocó un marcapaso en la pared del ventrículo izquierdo para mantener una frecuencia cardiaca de 300 latidos por minutos y se procedió a insertar un balón en el ventrículo izquierdo, el cual se encuentra conectado a un transductor que registró los cambios de presión del ventrículo. El balón se llenó con agua de manera a fijar una presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo de 5-10 mm Hg.

Posterior a la estabilización de 20 minutos, los corazones fueron sometidos a 30 minutos de isquemia global producida a través de la interrupción de la perfusión retrógrada, seguido de 60 minutos de reperfusión (43). Los parámetros hemodinámicos se registraron durante todo el experimento a través del programa LabChart (ADInstruments, San Diego, CA). Para evaluar la contractilidad cardiaca se evaluó la presión desarrollada por ventrículo izquierdo (PDVI) y la máxima derivada de la presión ventricular izquierda (+dP/dt).



Protocolo experimental de isquemia-reperfusión *ex vivo* en corazón de ratón. Fases dentro del protocolo: Estabilización (20 minutos), isquemia global (30 minutos) y reperfusión (60 minutos).

3. Cuantificación del tamaño de infarto

Una vez terminado el protocolo de IR, los corazones fueron perfundidos con una solución de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) al 1 % en tampón fosfato (pH 7,4), por 20 minutos. Posteriormente los corazones fueron congelados a -20 °C por 1 hora y cortados de forma transversal en rebanadas a través del eje mayor del ventrículo izquierdo, de aproximadamente 2 mm de grosor. Los cortes se fijaron en formaldehído al 10 % por 24 horas. Las rebanadas fijadas fueron entonces escaneadas y se midió el área infartada (área no teñida) y el área total de la rebanada utilizando el programa ImageJ. Se utilizó el grosor de cada rebanada para calcular los volúmenes respectivos. El tamaño del infarto se expresó como el porcentaje de la zona infartada (zona sin teñir), respecto a la zona de riesgo, que en este caso era el volumen total.

4. Medida de los niveles de lactato deshidrogenasa en el perfundido

Posterior a los 20 min de estabilización y previo al comienzo de la isquemia se tomó una muestra del efluente, cuyo contenido de lactato deshidrogenasa (LDH), correspondió al basal. Posteriormente y durante los 10 primeros minutos del periodo de reperfusión se tomaron alícuotas del efluente de la perfusión cada 1 minuto (43). De esta forma se midió el contenido de LDH, evaluado indirectamente como actividad, lo cual es un indicativo del daño por necrosis celular producido por la IR. Para dicha determinación se ocupó el kit de detección CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), según indicaciones del fabricante.

5. Análisis de Proteínas

Posterior al protocolo de IR, algunos corazones se congelaron en nitrógeno líquido y pulverizados en un mortero, tras lo cual las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

5.1 Preparación de homogenizados

Las muestras mantenidas a -80 °C se utilizaron para la obtención de proteínas. Para ello las muestras fueron homogeneizadas en presencia de un tampón de lisis

comercial, T-PER (Thermo Scientific), conteniendo inhibidores de proteasas (Roche) e inhibidores de fosfatasas (Roche). Los lisados se centrifugaron a 12.000 x g a 4 °C y el sobrenadante se guardó a -80 °C hasta su uso.

5.2 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó previo a los análisis de western blot (Wb) por el método de Bradford (44), utilizando el reactivo Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad), de acuerdo a lo indicado por el fabricante.

5.3 Cuantificación de los niveles de carbonilación y nitración

Para determinar los niveles de estrés oxidativo se midió el contenido de proteínas carboniladas y nitradas en los homogeneizados de tejido cardiaco a través de western blot. Para la determinación de proteínas carboniladas se utilizó el kit de detección OxyBlot™ Protein Oxidation (EMD Millipore), según las indicaciones del fabricante. Para la determinación de proteínas nitradas se utilizó el anticuerpo primario anti- nitrotirosina (EMD Millipore, Billerica, CA, 1:1000), seguida del secundario anti-mouse en una dilución de 1:5000 (EMD Millipore, Billerica, CA).

6. Análisis estadístico y cálculo del tamaño de la muestra

Con la intención de detectar cambios por acción de las intervenciones de por lo menos un 30 %, con un $\alpha = 0,05$ y un poder del 90 %, se necesitaron un mínimo de 8 corazones por grupo. Las diferencias inter-grupales se analizaron a través de un t-Test o un test de ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey o de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni, según correspondía. Se rechazó la hipótesis nula con un valor de $P < 0,05$.

7. Criterios de exclusión:

Corazones que no lograron estabilización en 20 minutos y que no lograron una presión desarrollada mínima de 50 mm Hg.

VII. RESULTADOS

1. Tamaño de infarto posterior a isquemia/reperfusión

Para determinar el tamaño del infarto en los corazones obtenidos de ratones controles ($PC1^{F/F}$) o *knockout* para la PC1 ($PC1^{KO}$), posterior a la IR se procedió a la tinción de los corazones con TTC por 20 min. Nuestros resultados indican un aumento significativo del tamaño del infarto en los corazones provenientes de animales $PC1^{KO}$ con respecto a los controles de IR (Figura 1).

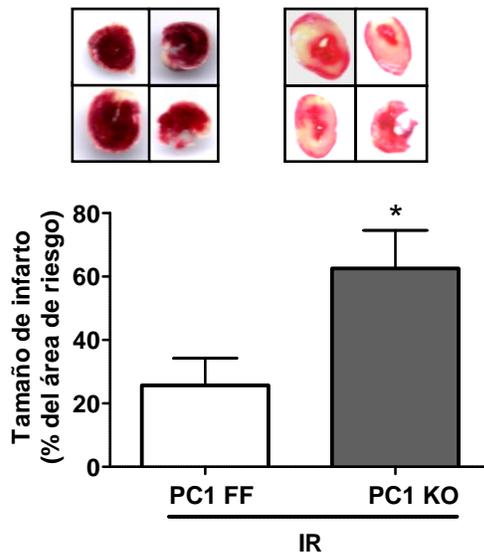


Figura 1. Tamaño de infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, para los grupos $PC1^{F/F}$ y $PC1^{KO}$ sometidos a isquemia/reperfusión (IR, gráfico de barras). En la parte de arriba una foto representativa de la tinción con TTC obtenida de los cortes. Los valores se expresan como promedio \pm SEM, analizados a través de un t-Test (n=5 y 6 respectivamente). * $P < 0,05$ vs. $PC1^{F/F}$ IR.

2. Niveles de lactato deshidrogenasa (LDH)

Para complementar los estudios del papel de la PC1 en la muerte del tejido cardiaco durante la IR medimos los niveles de LDH en el efluído previo y posterior a la IR (1, 5 y 10 min). Los resultados son expresados con respecto a los niveles de LDH pre-isquémicos (basal) de cada animal. Nuestros resultados sugieren un aumento de la liberación de LDH posterior a IR con respecto al grupo $PC1^{F/F}$ control tiempo, ya sea desde corazones provenientes de ratones $PC1^{F/F}$ como $PC1^{KO}$ (Figura 2). Además, al comparar sólo los grupos sometidos a IR (a los 1 min de reperfusión), se observa un aumento de LDH proveniente de los corazones de ratones $PC1^{KO}$ con respecto a los $PC1^{F/F}$ (Figura 3). El conjunto de estos resultados indica que la ausencia de PC1 en los cardiomiocitos induce un aumento del daño del tejido cardiaco posterior a la IR.

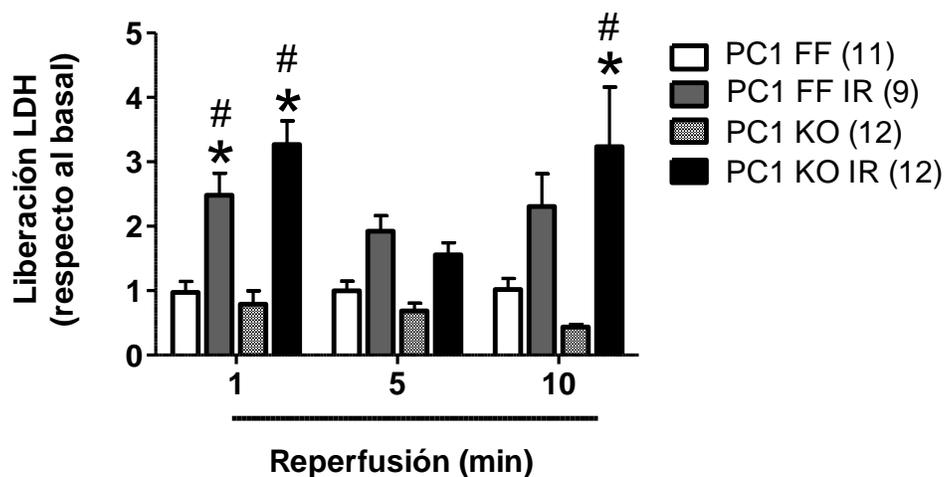


Figura 2. Niveles de LDH a los 1, 5 y 10 minutos de la reperusión para los grupos PC1^{F/F} IR y PC1KO IR y los minutos respectivos para el grupo PC1^{F/F} control. Los resultados son expresados respecto al basal de LDH pre-isquémicos de cada animal. Los valores se muestran como el promedio \pm SEM, analizados a través de un Anova de dos vías, seguido de un post-test de Bonferroni. * $P < 0,05$ vs. PC1^{F/F} control. # $P < 0,05$ vs. PC1 KO control. El número de experimentos se indica entre paréntesis en la identificación de las barras.

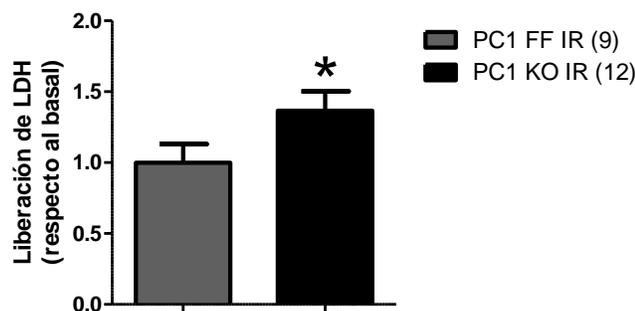


Figura 3. Niveles de LDH medido durante el primer minuto de la reperusión para los grupos PC1^{F/F} IR y PC1KO IR. Los resultados son expresados respecto al basal de LDH pre-isquémicos de cada animal y los valores se muestran como el promedio \pm SEM, analizados a través de un t-test. * $P < 0,05$ vs. PC1^{F/F} IR. El número de experimentos se indica entre paréntesis en la identificación de las barras.

3. Parámetros hemodinámicos

Para determinar la función cardiaca de los corazones sometidos a IR y sus respectivos controles en un modelo *ex vivo*, se midieron los siguientes parámetros hemodinámicos:

3.1. Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI)

Los resultados no mostraron diferencias al comparar los diferentes grupos de estudio a nivel basal en tanto indican una disminución de la PDVI posterior a la IR tanto en los grupos PC1^{FF} como PC1 KO, sin cambios significativos entre estos últimos (Figura 4).

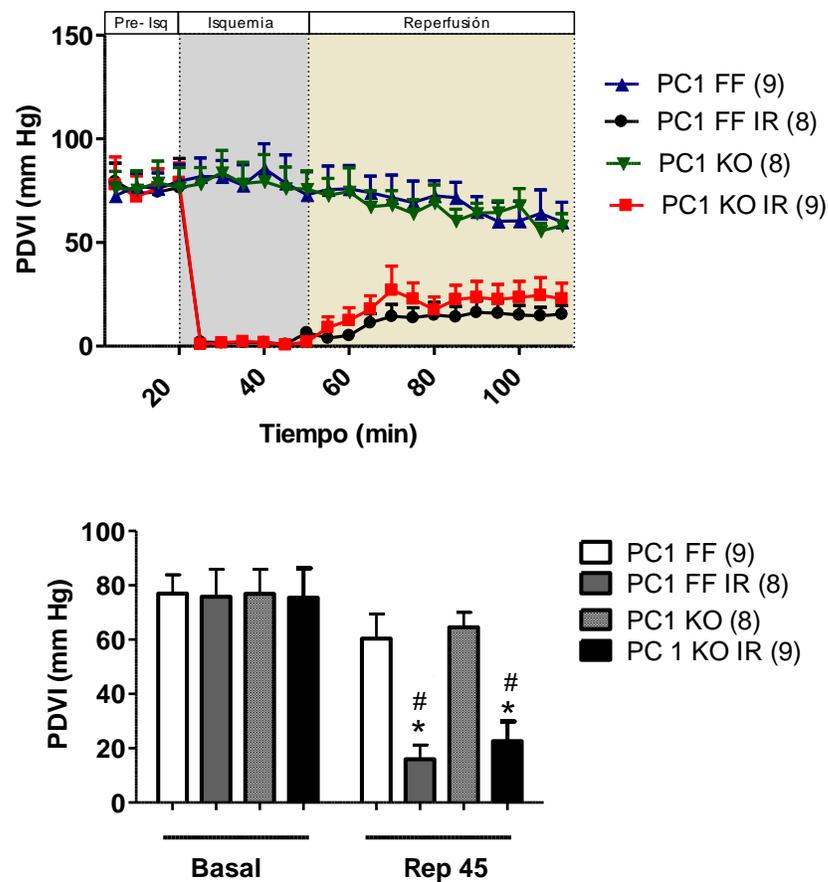


Figura 4. El gráfico de arriba muestra el registro de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) en el tiempo. El gráfico de barras (abajo), indica los valores obtenidos en mm Hg tanto para la condición basal como a los 45 minutos de reperusión o el tiempo correspondiente para los controles tiempo. Los valores son expresados como promedio \pm SEM, analizados a través de Anova de dos vías, seguido de un post-test de Bonferroni. * $P < 0,05$ vs. PC1^{FF} control y # $P < 0,05$ vs. PC1 KO control a los 45 min de reperusión. El número de experimentos se indica entre paréntesis en la identificación de las barras.

3.2. Máxima derivada del desarrollo de presión del ventrículo izquierdo

En el estado basal (previo a la IR, periodo de estabilización), los diferentes grupos no muestran diferencias significativas en la máxima derivada del desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (+dP/dT), sin embargo posterior a IR, tanto los corazones provenientes de animales PC1^{F/F} como PC1 KO presentan diferencias significativas con respecto a los controles tiempo, sin diferencias significativas al compararlos entre ellos (Figura 5).

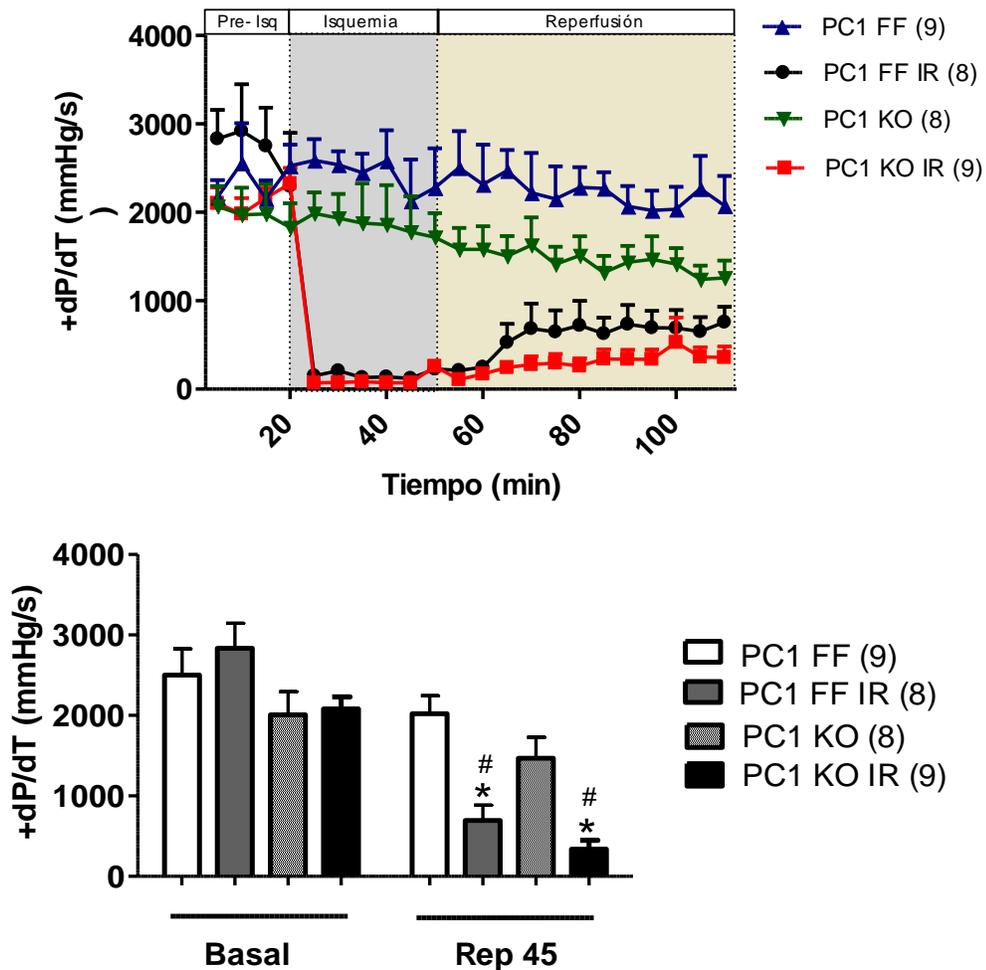


Figura 5. Arriba el registro de la máxima derivada del desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (+dP/dT) en el tiempo. El gráfico de barras indica los valores obtenidos en mmHg/s tanto para la condición basal de los diferentes grupos como a los 45 minutos de reperfusion o el tiempo correspondiente en los controles tiempo. Los valores se expresan como promedio \pm SEM, analizados a través de Anova de dos vías, seguido de un post-test de Bonferroni. * $P < 0,05$ vs. PC1^{F/F} y # $P < 0,05$ vs. PC1 KO a los 45 min de reperfusion. El número de experimentos se indica entre paréntesis en la identificación de las barras.

4. Niveles de estrés oxidativo

Para determinar los niveles de estrés oxidativo se midieron proteínas carboniladas y nitradas en los homogeneizados de tejido cardiaco proveniente de los diferentes grupos estudiados.

4.1. Proteínas carboniladas

El análisis de nuestros datos sugiere un aumento de proteínas carboniladas posterior a la IR en el tejido cardiaco proveniente de corazones de ratones PC1 KO con respecto a los controles respectivos. No se observaron diferencias significativas en los corazones de animales controles sometidos a IR con respecto a los controles (Figura 6). Estos datos sugieren que la ausencia de la PC1 estaría induciendo un aumento del estrés oxidativo posterior a la IR en un modelo *ex vivo*.

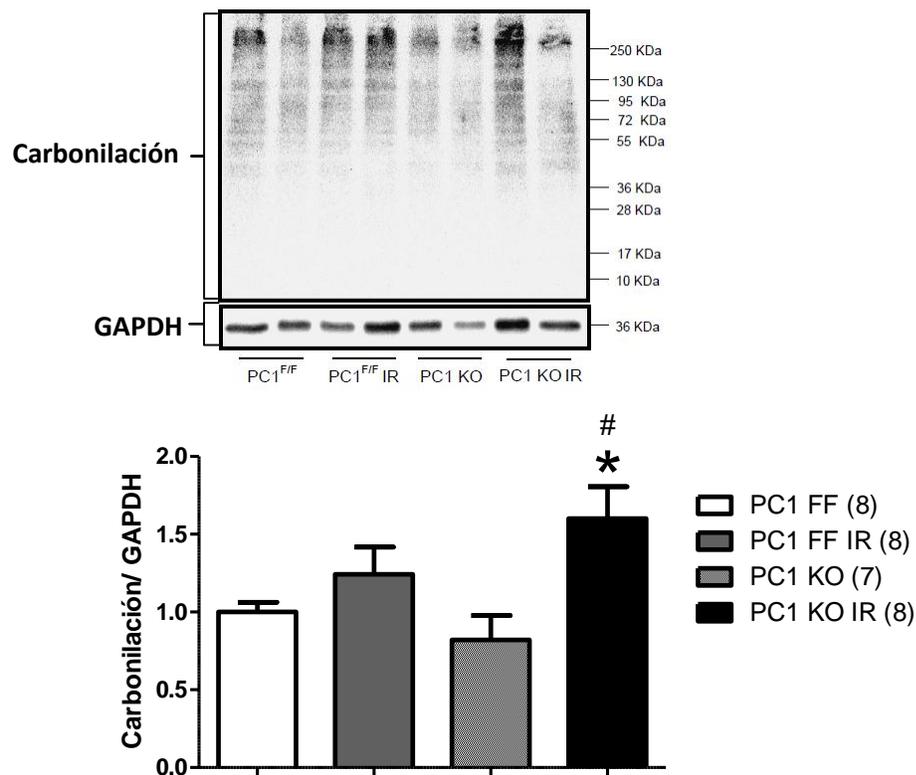


Figura 6. Western blot representativo de proteínas carboniladas y GAPDH como control de carga. El gráfico de barras representa la cuantificación de proteínas carboniladas respecto al GAPDH. * $P < 0,05$ vs. PC1^{F/F} y # $P < 0,05$ vs. PC1 KO. Los valores son expresados como promedio \pm SEM, analizados a través de Anova de una vía, seguido de un post-test de Tukey. El número de experimentos se indica entre paréntesis en la identificación de las barras.

4.2. Proteínas nitradas

Para determinar otro marcador de estrés oxidativo/nitrosativo se analizó los niveles de proteínas nitradas desde homogeneizados provenientes de los corazones de los diferentes grupos de estudio. Los resultados sugieren un aumento de proteínas nitradas posterior a la IR desde muestras de tejido cardiaco proveniente de corazones de ratones PC1 KO, con respecto a los controles tiempo PC1^{F/F} y PC1 KO (Figura 7). El conjunto de los datos sugieren que la ausencia de la PC1 en los cardiomiocitos de los corazones conduce a un aumento del estrés oxidativo posterior a la IR en un modelo *ex vivo*.

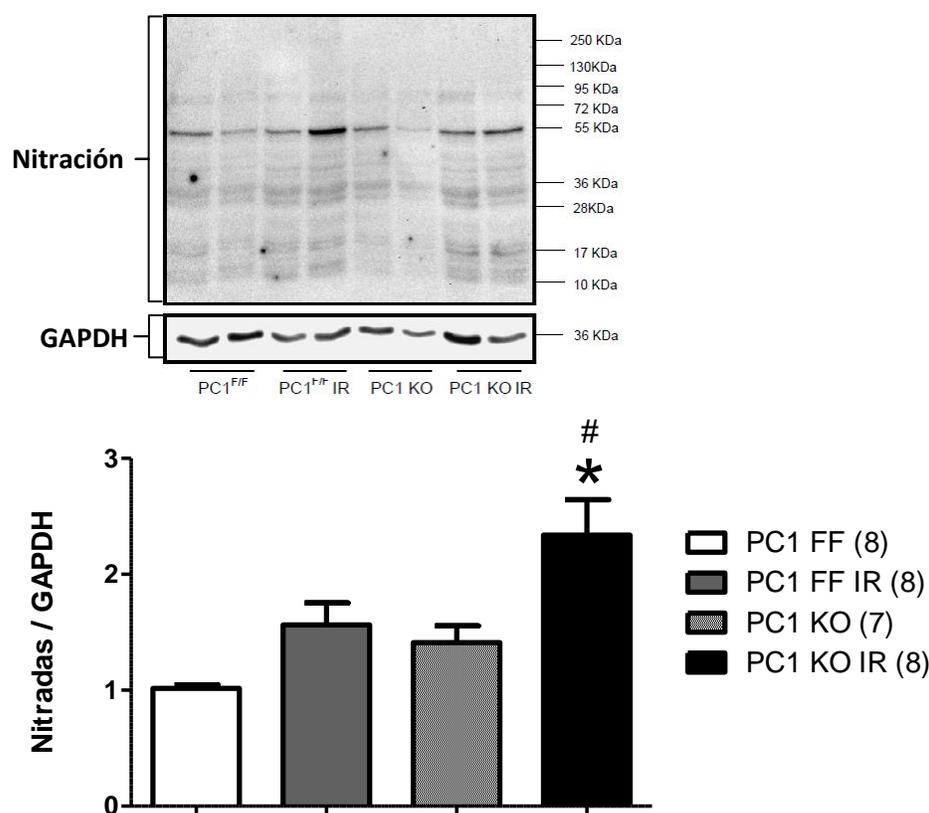


Figura 7. Western blot representativo de las proteínas nitradas y GAPDH utilizado como control de carga. El gráfico de barras representa la cuantificación de proteínas nitradas con respecto al GAPDH. * $P < 0,05$ vs. PC1^{F/F} y # $P < 0,05$ vs. PC1 KO. Los valores son expresados como promedio \pm SEM. El número de experimentos se indica entre paréntesis en la identificación de las barras.

VIII.DISCUSIÓN

La policistina ha sido principalmente estudiada en el cilio primario de los túbulos renales y su rol como mecanosensor se ha relacionado con distintas respuestas frente a cambios en el flujo renal (42). A su vez, su presencia se ha visto relacionada con la regulación de señales de crecimiento, de reparación en respuesta al daño, con la regulación de los niveles de estrés oxidativo y el daño posterior al mismo y con vías de muerte celular como la apoptosis (45, 46, 47).

Existen distintos tipos de mecanosensores que están presentes en el corazón, entre los que podemos mencionar las integrinas, las proteínas de adhesiones focales y el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) (48). La presencia de la PC1 en el tejido cardiaco se ha relacionado a la mantención de la contractilidad cardiaca fisiológica, la estabilización de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje tipo L (LTCC) y la inducción de la hipertrofia como respuesta al estrés mecánico (32). Dado los antecedentes previos, el interés de nuestro trabajo fue estudiar el papel de esta proteína durante la IR cardiaca. Para esto se utilizó un modelo *ex vivo* de IR en corazón de ratones *knockout* para la PC1 (PC1 KO) en los cardiomiocitos, utilizando los controles respectivos.

Los datos obtenidos en esta tesis indican que la ausencia de la PC1 determina un aumento del daño del tejido cardiaco posterior a la IR (modelo *ex vivo*), en comparación al daño inducido por la IR en corazones de animales controles, medidos como tamaño de infarto y liberación de LDH al perfundido al minuto de reperfusión (*figura 1, 2 y 3*). Estos resultados se encuentran en concordancia con la literatura, la cual describe que ratones haploinsuficientes para la PC1 presentan mayor daño y menor supervivencia después de ser sometidos a IR del tejido renal (42). Como control de la técnica implementada en nuestro laboratorio de IR *ex vivo*, se debe mencionar que el tamaño de infarto de los ratones controles es similar a lo reportado en la literatura (43), sugiriendo que nuestros resultados son comparables a lo reportado previamente en cuanto al modelo. Hasta el momento, este es el primer reporte que demuestra que la presencia de la PC1 en los cardiomiocitos del tejido cardiaco

previene un aumento del daño durante la IR. Estos resultados se encuentran en concordancia con resultados previos de nuestro laboratorio, en la que cardiomiocitos neonatos silenciados para PC1 presentan mayor muerte al ser sometidos a IR simulada versus sus controles (datos no publicados).

Con respecto a los resultados obtenidos de LDH, hasta el momento no son comparables con reportes previos ya que no existen trabajos que indiquen el papel de la PC1 sobre la viabilidad de los cardiomiocitos. La liberación del LDH en el perfundido da una idea de la muerte celular por necrosis (49). Si bien nuestros resultados indican entonces a la necrosis como el tipo de muerte presente durante la IR, no podemos descartar otros mecanismos de muerte celular como el de la apoptosis durante nuestros experimentos. Se ha reportado que la PC1 es capaz de inhibir la apoptosis a través de la regulación positiva de los niveles de la proteína anti-apoptótica BCL-2 (50). Además, se ha encontrado que el C-terminal de la PC1 interactúa e inhibe la subunidad $\alpha 12$ de la proteína Gq, impidiendo que al ser estimulada aumente la apoptosis mediante la degradación de BCL-2 y la estimulación de JNK (51). Esto último podría explicar porqué las células renales en cultivo, sobre-expresando PC1, son más resistentes frente a un estímulo apoptótico (51, 52). Se desconoce actualmente si estas vías pueden ser reguladas a través de la PC1 en los cardiomiocitos en condiciones de IR.

En cuanto a los parámetros hemodinámicos, nuestros resultados no muestran diferencias significativas para la PDVI ni para el $+dP/dT$ cuando se comparan los registros provenientes de corazones de ratones controles y PC1 KO sometidos a IR, aunque los mismos sí muestran diferencias significativas con respecto a sus respectivos controles (*figura 6 y 7*).

La disminución en la presión desarrollada y la contractilidad del ventrículo izquierdo es esperable dado el daño que induce la IR en el desarrollo de presión, explicado tanto por el aumento de los ROS como por la hipercontractura generada por la sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático. Esta disminución de la función contráctil debido a

IR ha sido ampliamente reportada (43). Por otro lado, los resultados de los parámetros hemodinámicos no son concordantes con lo reportado previamente por nuestro laboratorio, en donde se señala que los ratones PC1 KO presentan una menor contractilidad que los ratones controles en estado basal medidos por ecocardiografía, con una disminución del 25% de la fracción de acortamiento, junto con un aumento del diámetro del ventrículo izquierdo al final de sístole (32). Esta falta de concordancia puede deberse a los ajustes en los parámetros que se realiza en el periodo de estabilización en el modelo *ex vivo*, de manera a obtener un desarrollo de presión mínimo para el experimento.

A pesar que el daño del tejido cardiaco posterior a IR fue mayor en los corazones procedentes de los ratones PC1 KO, no se registraron diferencias en los parámetros hemodinámicos. Resultados similares en cuanto a la falta de correlación entre el tamaño del infarto y los parámetros hemodinámicos en el modelo *ex vivo* de IR han sido reportados previamente (43). Esto podría atribuirse al hecho que posterior a la IR la recuperación de dichos parámetros fue muy baja para ambos grupos, pudiendo suponerse que los registros no mostraban la sensibilidad para detectar diferencia entre los mismos. Además, debido a que los ratones PC1 KO son constitutivos para su condición, se podría plantear un mecanismo compensatorio en el que los cardiomiocitos PC1 KO que permanecen viables posterior a la IR mantienen una mejor función en comparación a los cardiomiocitos viables provenientes de los animales controles. Otra explicación a la diferencia encontrada entre el tamaño de infarto y los parámetros hemodinámicos, podría ser la disfunción cardiaca dada por la pérdida de concordancia (o “matching” en ingles) entre la perfusión y la contracción (53). En este concepto encontramos al atontamiento miocárdico (o “stunning” en ingles), en la que posterior a una isquemia y restablecida la perfusión del miocardio, existe una recuperación funcional incompleta (54). A pesar de que no hay un daño irreversible la recuperación funcional completa puede demorar horas a días, o incluso semanas (55). Esto podría explicar la disminución en la función contráctil en los ratones controles, en los que hay menor muerte (dado por menor tamaño de infarto y liberación de LDH) y existe una función cardiaca similar a los ratones PC1 KO. En el

caso de nuestro modelo de IR en corazón aislado, se encuentran limitantes para poder corroborar este fenómeno dado que no es posible un seguimiento posterior por mayor tiempo, como sí podría realizarse en modelos de IR *in vivo*.

La enfermedad poliquística autosómica dominante (ADPKD), que se relaciona a nivel molecular por la presencia de una mutación de las policistinas, transcurre con un reducido nivel de enzimas antioxidantes y un daño por estrés oxidativo mayor, el cual se encuentra involucrado con la patogénesis de la enfermedad (56). Se sabe además, que la PC1 en el cilio renal modula la producción de óxido nítrico (57). Junto con estos antecedentes, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que en cardiomiocitos de ratones neonatos que fueron tratadas con un siRNA específico para la PC1, estos presentan un mayor estrés oxidativo dado por un mayor número de proteínas nitradas. Además, los ratones PC1 KO presentan un incremento en la expresión de la NOX4, lo cual podría sugerir que la PC1 estaría regulando el estado oxidativo de los cardiomiocitos (datos no publicados).

Debido a que el aumento de ROS es uno de los mecanismos que explican el daño del tejido cardíaco posterior a IR, nosotros estudiamos la relación entre la PC1 y el estrés oxidativo durante esta patología. Para ello se midieron los niveles de proteínas carboniladas y nitradas en el tejido cardíaco posterior a IR. A pesar de la existencia de otras modificaciones oxidativas, como la S-Glutationilación y la S-Nitrosilación, determinamos las mencionadas anteriormente debido a que las mismas han sido relacionadas directamente con el daño oxidativo y no con la protección cardíaca, como lo son la S-Glutationilación y la S-Nitrosilación (23, 58).

Los datos encontrados en esta tesis señalan un aumento, tanto en los niveles de proteínas carboniladas como nitradas en las muestras provenientes de tejido cardíaco de ratones PC1 KO sometidos a IR, con respecto a los controles (*figura 5 y 6*).

La carbonilación es una oxidación proteica irreversible, existiendo cuatro rutas principales para la oxidación por generación de grupos carbonilos, pudiendo ocurrir directamente sobre los aminoácidos de las proteínas, comúnmente en respuesta la formación del radical hidroxilo (58, 59). Por otro lado, la nitración es un marcador relativamente específico de daño por modificaciones proteicas mediado por la actividad del peroxinitrito (60, 61, 62).

La nitración de distintas proteínas en el corazón ha sido propuesta como un mecanismo importante de disfunción cardíaca. La creatin quinasa (un importante controlador energético de la contractilidad del cardiomiocito) y la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), son rápidamente inactivado por nitración. Esta modificación también afecta a canales de K^+ activados por voltaje y a diversas proteínas estructurales del cardiomiocito como la desmina, la cadena pesada de la miosina y la α actinina, con potenciales efectos deletéreos en la contractilidad (61).

Los resultados obtenidos podrían estar relacionando la ausencia de la PC1 con un incremento de la producción de ROS durante la IR, lo cual podría dar cuenta, aunque sea en parte, del aumento del daño observado en los corazones provenientes de los ratones PC1 KO posterior a la IR. Sugieren además un aumento tanto del estrés oxidativo como nitrosativo en dichas muestras, inducido por la IR en ausencia de la PC1 en los cardiomiocitos. Además, estos resultados están en concordancia con resultados previos de nuestro laboratorio, en el que cardiomiocitos neonatos de ratones tratados con un siRNA específico para la PC1 presentan un aumento en los niveles de proteínas nitradas. Futuros estudios deben desarrollarse para determinar el mecanismo molecular que subyace a este fenómeno. Teniendo en cuenta reportes previos que señalan que en la ADPKD causada por mutación del gen codificante para la PC1, existe una reducción en los niveles de enzimas antioxidantes (56), los estudios podrían estar dirigidos al estado antioxidante del tejido cardíaco durante la IR en los corazones de estos ratones.

En relación al estrés oxidativo y la muerte del tejido miocárdico encontrados en nuestro trabajo, surge la interrogante de cómo la PC1 estaría influyendo en ambos sucesos. Durante la isquemia se acumulan metabolitos en el tejido producto de la privación de oxígeno, el cambio del metabolismo y la falta de irrigación, lo que hace que aumente la osmolaridad del contenido intracelular. Al restituirse la perfusión del tejido con solución salina o sangre de osmolaridad fisiológica se crea un gradiente osmótico transmembrana sarcoplasmática que favorece la entrada de agua al cardiomiocito, aumentando este su volumen, lo que produce un aumento del estrés mecánico de la membrana (63). Diversos estudios han mostrado que el estrés mecánico aumenta los niveles de estrés oxidativo, lo que ha sido principalmente estudiado en la hipertrofia e insuficiencia cardiaca, modulando por ejemplo, la actividad de la NADPH oxidasa (64). En relación al estrés oxidativo, se ha visto que en ausencia de PC1, existe un aumento de los niveles de estrés oxidativo, y que además este ha sido descrito como un mecanosensor en los cardiomiocitos. Considerando los antecedentes previos, se podría plantear que al estar ausente la PC1, como es el caso de los ratones *knockout* de nuestro trabajo, podría por un lado estar disminuyendo la capacidad del cardiomiocito de adaptarse a este aumento del estrés mecánico durante la reperfusión al no poder censarlo correctamente, y por otra parte, la ausencia de PC1 estaría generando un aumento del estrés oxidativo, el que se sumaría al producido por la IR, generando como resultado un aumento de la muerte del tejido cardiaco. Para dilucidar si la PC1 modula los niveles de estrés oxidativo como mecanosensor o funcionando independiente de esta función, se requerirán futuros estudios en los que se estudien las vías de señalización en las que participa, los que han sido estudiados ampliamente en la ADPKD en tejido renal, como son las vías PI3K/Akt, Wnt, CHOP, Ca²⁺/Calcineurina/NFAT, STAT6, mTOR JAK-STAT, entre otros (46, 65-70).

En conclusión, resultados del presente proyecto muestran, por primera vez, que la presencia de la PC1 en los cardiomiocitos es importante para evitar un aumento del daño durante la IR cardiaca, lo cual estaría sucediendo, aunque sea en parte, porque se evita un aumento del daño oxidativo a las proteínas del tejido cardiaco.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Omran AR (1971). The epidemiologic transition: a theory of epidemiology of population change. *Millbank Memorial Fund Q* 49:509-538.
2. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S (2001). Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104:2746-2753.
3. Koch E, Otárola A, Manríquez L, Kirschbaum A, Paredes M, Silva C (2005). Predictors of non fatal cardiovascular events in a Chilean cohort. Results of the San Francisco Project. *Rev Méd Chile* 133:1002-1012.
4. Instituto Nacional de Estadísticas (INE) (2003). Anuario de estadísticas vitales.
5. Bustos P, Amigo H, Arteaga A, Acosta AM, Rona R (2003). Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes. *Rev Med Chile* 13:973-980.
6. Ferdinandy P, Schulz R (2003). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 138:532-543.
7. Zweier JL, Hassan MA (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 70:181-190.
8. García-Dorado D (2004). Myocardial reperfusion injury: a new view. *Cardiovasc Res* 61:363-364.
9. Weiskopf RB (2011). Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia- reperfusion injury. *Anesthesiology* 94:1133-1138.

10. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ (2005). Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 100:179-190.
11. Palmer B, Hadziahmetovic M, Veci T, Angelos MG (2004). Global ischemia duration and reperfusion function in the isolate and reperfused rat heart. *Resuscitation* 62:97-106.
12. Levitsky S (2006). Protecting the myocardial cell during coronary revascularization. *Circulation* 114:339-343.
13. Rodríguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, Garcia-Dorado D (2007). Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 12:207-216.
14. Park JL, Lucchesi BR (1999). Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 68:1905-1912.
15. Beard T, Carrie D, Boyer MJ, Boudjemaa B, Ferrieres J, Delay M, Bernadet P, Thouvenot JP (1994). Production of oxygen free radicals in myocardial infarction treated by thrombolysis. Analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde. *Arch Mal Coeur Vaiss* 87:1289–1296.
16. Roberts MJ, Young IS, Trouton TG, Trimble ER, Khan MM, Webb SW, Wilson CM, Patterson GC, Adgey AA (1990). Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty. *Lancet* 336:143-145.
17. Kim KB, Chung HH, Kim MS, Rho JR (1994). Changes in the antioxidative defensive system during open heart operations in humans. *Ann Thorac Surg* 58:170-175.

18. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Leize-Wagner E (2005). Oxidative stress response: a proteomic view. *Expert Rev Proteomics* 2:949–956.
19. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329:23–38.
20. McDonagh B, Tyther R, Sheehan D (2005). Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat Toxicol* 73:315–326.
21. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233: 346-357.
22. Brioschi M, Polvani G, Fratto P, Parolari A, Agostoni P, Tremoli E, Banfi C (2012). Redox proteomics identification of oxidatively modified myocardial proteins in human heart failure: implications for protein function. *PLoS ONE* 7:e35841.
23. Cai Z, Yan L (2013). Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res* 1:15–26.
24. Halestrap AP (1998). The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp* 66:181–203.
25. Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E, Babior BM (1996). Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:654–658.
26. Thatte HS, Rhee J-H, Sofija E, Zagarins SE, Treanor PR, Birjiniuk V, Crittenden MD, Khuri SF (2004). Acidosis-induced apoptosis in human and porcine heart. *Ann Thorac Surg* 77:1376–1383.

27. Czene S, Tiback M, Harms-Ringdhal M (1997). pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochem J* 323:337–341.
28. Kotlyar AB, Randazzo A, Honbo N, Jin ZQ, Karliner JS, Cecchini G (2010). Cardioprotective activity of a novel and potent competitive inhibitor of lactate dehydrogenase. *FEBS Lett* 584:159–165.
29. Starnes JW (2008). Effect of storage conditions on lactate dehydrogenase released from perfused hearts. *Int J Cardiol* 127:114–116.
30. Maillet M, van Berlo JH, Molkenin JD (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:38-48.
31. Stein AB, Tang XL, Guo Y, Xuan YT, Dawn B, Bolli R (2004). Delayed Adaptation of the Heart to Stress Late Preconditioning. *Stroke* 35:2676-2679.
32. Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras-Ferrat A, Fernández C, Jiang N, Luo X, Caplan MJ, Somlo S, Rothermel BA, Gillette TG, Lavandero S, Hill JA (2015). Polycystin-1 is a cardiomyocyte mechanosensor that governs L-Type Ca²⁺ channel protein stability. *Circulation* 131:2131-2142.
33. Binu P, Gregory B (2014). Kidney: polycystic kidney disease. *WIREs Dev Biol* 3:465–487.
34. Kim K, Drummon I, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, and Arnaout MA (2000). Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *PNAS* 97:1731-1736.
35. Wang H, Sun W, Ma J, Pan Y, Wang L, Zhang W (2014). Polycystin-1 mediates mechanical strain-induced osteoblastic mechanoresponses via potentiation of intracellular calcium and Akt/b-catenin pathway. *PLoS ONE* 9:e91730.

36. Randy L, Dahl N (2014). Extra-renal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): considerations for routine screening and management. *Nephrol Dial Transplant* 29:247–254.
37. Ecker T, Schrier RW (2009). Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5:221–228.
38. Wickenden AD, Kaprielian R, Kassiri Z, Tsoporis JN, Tsushima R, Fishman GI, Backx PH (1998). The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res* 37:312–323.
39. Frey N, McKinsey TA, Olson EN (2000). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 6:1221–1227.
40. Kotsis F, Boehlke C, Kuehn E (2013). The ciliary flow sensor and polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 28:518–526.
41. Jones TJ, Pung YF, Adapala RK, Burke JR, Thodeti CK, Chilian WM (2012). The importance of Polycystin 1 (PC1) in endothelial mitochondrial bioenergetics. *FASEB J* 26:887.10.
42. Bastos AP, Piontek K, Silva AM, Martini D, Menezes LF, Fonseca JM, Fonseca II, Germino GG, Onuchic LF (2009). Pkd1 Haploinsufficiency Increases Renal Damage and Induces Microcyst Formation following Ischemia/Reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 20:2389–2402.
43. Di Carlo MN, Said M, Ling H, Valverde CA, De Giusti VC, Sommese L, Palomeque J, Aiello EA, Skapura DG, Rinaldi G, Respress JL, Brown JH, Wehrens XH, Salas MA, Mattiazzi A (2014). CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 74:274–283.

44. Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
45. Piperi C y Basdra E (2015). Polycystins and mechanotransduction: From physiology to disease. *World J Exp Med* 20; 5:200–205.
46. Boca M, D'Amato L, Diestefano G, Polishchuk R, Germino G, Boletta A (2007). Polycystin-1 Induces Cell Migration by Regulating Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent Cytoskeletal Rearrangements and GSK3 β -dependent Cell–Cell Mechanical Adhesion. *Mol Biol Cell* 18:4050–4061.
47. Bhunia A, Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG (2002). PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 109:157-168.
48. Dostal D, Feng H, Nizamutdinov D, Golden H, Afroze S, Dostal J, Jacob J, Foster D, Tong C, Glaser S, Gerilechaogetu F (2014). Mechanosensing and Regulation of Cardiac Function *J Clin Exp Cardiol* 5:314-326.
49. Chan F, Moriwaki K, De Rosa M (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* 979:65-70.
50. Yu W, Ritchie B, Su X, Zhou J, Meigs T, Denker B (2011). Identification of polycystin-1 and G α 12 binding regions necessary for regulation of apoptosis. *Cell Signal* 23:213-221.
51. Yu W, Kong T, Beaudry, S, Tran M, Negoro H, Yamadala V, Denker, B (2010). Polycystin-1 protein level determines activity of the G α 12/JNK apoptosis pathway. *J Biol Chem* 285:10243–10251.

52. Boca M, Distefano G, Boletta A (2006). Polycystin-1 induces resistance to apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Am Soc Nephrol* 17: 637–647.
53. Ross J. Myocardial Perfusion- Contraction Matching. Implications for Coronary Heart Disease and Hibernation. *Circulation* 1991; 83 (3).
54. Bhat A, Gan G, Than T, Hsu C, Denniss A (2016). Myocardial Viability: From Proof of Concept to Clinical Practice. *Cardiology Research and Practice* 2016.
55. Sherman A, Harris K, Dehdjbell S, Yaroshenko Y, Schaffer D, Shroff S, Sung J, Klocke F (1997). Proportionate Reversible Decreases in Systolic Function and Myocardial Oxygen Consumption After Modest Reductions in Coronary Flow: Hibernation Versus Stunning. *JACC* 29 (7): 1623-1630.
56. Maser R, Vassmer D, Magenheimer B, Calvet J (2002). Oxidant stress and reduced antioxidant enzyme protection in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 991-999.
57. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J (2008). Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through Polycystin-1. *Circulation* 117:1161–1171.
58. Diaz A, Membrillo J (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 9:34-44.
59. Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ (2010). Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxid Redox Signal* 12:393-404.

60. Cai Z, Yan L (2013). Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health. *J Biochem Pharmacol Res* 1:15–26.
61. Palcher P, Beckam J, Liaudet L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315–424.
62. Ahsan H (2013). 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol* 74:1392–1399.
63. Ruiz- Meana M, Garcia-Dorado D (2009). Pathophysiology of Ischemia-reperfusion Injury: New Therapeutic Options for Acute Myocardial Infarction. *Rev Esp Cardiol* 62(2): 199-209.
64. Kerr J, Robinson P, Shi G, Bogush A, Kampema A, Hexum J, Becerra N, Harki D, Martin S, Raiteri R, Prosser B, Ward C (2015). Detyrosinated microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle. *Nature Communications* 8.
65. Seddon M, Looi Y, Shah A (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93: 903-907.
66. Bhunia A, Piontek K, Boletta A, Li L, Qian F, Xu P, Germino J (2002). PKD1 Induces p21waf1 and Regulation of the Cell Cycle via Direct Activation of the JAK-STAT Signaling Pathway in a Process Requiring PKD2. *Cell* 109: 157-168.
67. Shillingford J, Murcia N, Larson C, Low S, Hedgepeth R, Brown N, Flask C, Novick A, Goldgarb D, Kramer-Zucker A, Walz G, Piontek K, Germino G, Welms T (2006). The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *PNAS* 103 (4).

68. Low S, Vasanth S, Larson C, Mukherjee S, Sharma N, Kinter M, Kane M, Obara T, Weimbs T (2006). Polycystin-1, STAT6, and P100 Function in a Pathway that Transduces Ciliary Mechanosensation and Is Activated in Polycystic Kidney Disease. *Developmental Cell* 10: 57-69.

69. Puri S, Magenheimer B, Maser R, Ryan E, Zien C, Walker D, Wallace D, Hempson S, Calvet J (2004). Polycystin-1 Activates the Calcineurin/NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (53): 55455- 55464.

70. Merrick D, Bertuccio C, Chapin H, Lal M, Chauvet V, Caplan M (2014). Polycystin-1 Cleavage and the Regulation of Transcriptional Pathways. *Pediatr Nephrol* 29(4): 505–511.

X.ANEXOS

Carta aprobación del Comité de Bioética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE INVESTIGACION EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en la tesis de Investigación titulada “**Rol de la policistina-1 en el daño inducido por la isquemia/reperfusión cardiaca**”, del **Dr. Pablo Romero**, Tesista del Programa Magíster en Fisiopatología y cuyo Patrocinante-Responsable es la **Dra. Zully Pedrozo Cibils** del Laboratorio de Mecanotransducción en la Fisiopatología Cardíaca, Programa Disciplinario de Fisiología y Biofísica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones que contravengan las Normas Bioéticas Básicas de Manejo y Cuidados de los Animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (CBA 0890 FMUCH).

Ambos investigadores se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por **24** meses, tiempo estimado de ejecución de su proyecto de tesis, el cual será financiado con fondos del Proyecto FONDECYT 1150887.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 13 miembros con experiencia en bioética asociada a experimentación animal: 3 veterinarios, 8 académicos de diversas disciplinas y 2 personas ajenas a la academia. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “**PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO**” después de un estudio acucioso por sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*

Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 28 de septiembre de 2016.