

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**EFEECTO CARDIOPROTECTOR DE N-ACETILCISTEÍNA
EN EL DAÑO PRODUCIDO POR ISQUEMIA, SOBRE EL
CONTENIDO DE MITOFUSINA 2,
EN CORAZÓN AISLADO DE RATA.**

STEFANIE GRACE CHALMERS ESPINOZA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
MENCIÓN EN FISIOPATOLOGÍA**

Directoras de Tesis

**Dra. Gina Sánchez V.
Dra. Ivonne Olmedo A.**

Universidad de Chile

**SANTIAGO – CHILE
2016**

**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 la candidata

STEFANIE GRACE CHALMERS ESPINOZA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Médicas y Biológicas, con Mención en Fisiopatología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día _____, _____, _____

Directores de Tesis:

Dra. Gina Sánchez V. _____

Dra. Ivonne Olmedo A. _____

Comisión informante de tesis:

Dr. Ramón Rodrigo (Presidente) _____

Dr. Mario Chiong _____

Dr. Rodrigo Castillo _____

Dr. Emilio Herrera _____

*Dedicada a esa hermosa luz,
que algún día volverá.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos quienes sin tener nada que ganar o perder, ofrecieron una espontánea sonrisa o un gesto amable, logrando que el rigor de lo académico y lo científico, se mantenga en la dimensión de lo humano.

Gracias a mis amigos Jaime Riquelme y Tortelini, que con su cariño manifiesto en cada presencia, y en las más oportunas ausencias, han sido fuente de confianza para perseverar en el camino.

A los que como mis profesores, fueron grandes inspiradores de los aspectos positivos en mi evolución académica: Dra. Pilar Barja, Dr. Ramón Rodrigo, Dra. Gladis Tapia, Dr. Luis Vidal. Gracias a la doctora Ivonne Olmedo, por su agudo y constructivo sentido crítico, y por renovar en mí la energía en el proceso, cuando más lo necesitaba.

Gracias a la persona que con pasión por su trabajo, y gran paciencia, respondía mis preguntas con un café cargado a las 07:15, y con otro más cargado a las 22:00, en esas eternas y enormemente productivas jornadas, gracias doctora Gina Sánchez por haber confiado en mí.

Gracias a Luis Montecinos por enseñarme los detalles más cuidadosos y perfectos de cada técnica, y a Guillermo Arce por esos otros detalles que son más valiosos que cualquier técnica. Y por supuesto doy gracias a las doctoras Paulina Donoso, y Zully Pedrozo, por esos consejos y palabras clave, que llegaron en el momento justo.

Gracias a la comisión evaluadora de esta tesis: Dr. Mario Chiong, Dr. Rodrigo Castillo, Dr. Emilio Herrera, y nuevamente gracias al Dr. Ramón Rodrigo, porque en la difícil misión de conciliar observaciones tan diversas como valiosas, crecí y aprendí que las pequeñas luces pueden valer tanto o más que el mismo sol.

A toda la fundación D.D., por entender este proceso y perdonar mis ausencias.

A los que han sido mi familia: R. Darío., Romi, Mónica, Icha y José, gracias por quererme, y no olvidarme, a pesar de todo lo que dejé de dar. Los adoro desde lo más profundo.

Gracias a mi familia de origen y a quienes la hacen crecer, gracias por apoyarme en cada paso a la distancia, por ser parte de mí. Gracias Marila Espinoza, John Chalmers, Cinthia, Jéssica, Matías, Paolo, Fabi, Coty, Tata, Carmen Gloria, Angélica, Arantza y pequeño Julián.

A todos gracias, porque por ustedes, soy mejor, y soy feliz.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiopatología Cardíaca de la Dra. Gina Sánchez, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

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

- Proyecto FONDECYT 1130407 (Dra. Gina Sánchez).
- Proyecto FONDECYT de postdoctorado 3140449 (Dra. Ivonne Olmedo).

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
TABLA DE CONTENIDOS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Mitocondrias y dinámica mitocondrial.....	4
1.2. Estrés oxidativo durante la isquemia.....	6
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVO GENERAL.....	10
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1. Reactivos.....	11
5.2. Animales.....	11
5.3. Modelo ex vivo de isquemia global.....	11
5.4. Protocolos experimentales.....	13
5.5. Medición de tamaño de infarto.....	14
5.6. Medición de la función del ventrículo izquierdo.....	14
5.7. Obtención de homogeneizados de tejido cardiaco.....	15
5.8. Aislamiento de mitocondrias desde tejido cardiaco.....	15
5.9. Cuantificación de proteínas.....	16

5.10. Consumo basal de oxígeno.....	16
5.11. Potencial de membrana mitocondrial.....	16
5.12. Contenido de Mitofusina 2 en homogeneizados de rata adulta.....	16
5.13. Contenido de glutatión.....	17
5.14. Cuantificación de malondialdehido.....	17
5.15. Análisis estadístico.....	17
6. RESULTADOS.....	18
6.1. N-Acetilcisteína mejora la función ventricular en corazón aislado de rata adulta sometido a isquemia y reperfusión.....	18
6.2. N-Acetilcisteína disminuye el tamaño de infarto en corazón aislado de rata adulta sometido a isquemia y reperfusión.....	18
6.3. N-Acetilcisteína evita la disminución de glutatión y el aumento de MDA que se produce durante la reperfusión.....	21
6.4. N-Acetilcisteína reduce la disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que se genera después de isquemia.....	23
6.5. El contenido de Mitofusina 2 disminuye con la isquemia y no se recupera durante la reperfusión.....	25
6.6. N-Acetilcisteína no modifica los niveles de Mitofusina 2 en condiciones basales.....	26
6.7. N-Acetilcisteína atenúa la disminución del contenido de Mitofusina 2 ocurrida en isquemia.....	27
6.8. Mitofusina 2, durante la isquemia, forma agregados proteicos mediante puentes disulfuro.....	28
6.9. N-Acetilcisteína disminuye la formación de agregados de Mitofusina 2, que se producen durante la isquemia.....	29
6.10. Mitofusina 2 aumenta su fosforilación durante la isquemia global de 30 minutos.....	30
6.11. La inhibición de CAMKII y AMPK, evita la degradación de Mitofusina	31

7. DISCUSIÓN.....	32
7.1. N-Acetilcisteína mejora la función ventricular y disminuye el tamaño de infarto en corazón aislado de rata adulta sometido a isquemia y reperfusión.....	32
7.2. N-Acetilcisteína evita la disminución de glutatión y el aumento de MDA que se produce durante la reperfusión.....	32
7.3. N-Acetilcisteína reduce la disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que se genera después de 30 minutos de isquemia.....	33
7.4. N-Acetilcisteína atenúa la disminución del contenido de Mitofusina 2 ocurrida en isquemia, e impide la formación de los agregados proteicos que se producen durante isquemia.....	33
7.5. Mitofusina 2 aumenta su fosforilación durante la isquemia global de 30 minutos, y las quinasas CAMKII y AMPK probablemente influyen en su degradación.....	35
8. CONCLUSIONES.....	37
9. REFERENCIAS.....	38
10. GLOSARIO.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema de las proteínas involucradas en la fusión mitocondrial.....	6
Figura 2: Efecto de N-Acetilcisteína en el daño producido por isquemia y reperfusión.....	19
Figura 3: Efecto de N-Acetilcisteína en el tamaño de infarto.....	20
Figura 4: Indicadores de estrés oxidativo en presencia y ausencia de N-Acetilcisteína.....	22
Figura 5: Efecto de N-Acetilcisteína en el daño mitocondrial generado por isquemia.....	24
Figura 6: Efecto de la isquemia y la reperfusión en el contenido de Mfn2 en homogeneizados de corazón.....	25
Figura 7: Efecto de N-Acetilcisteína en el contenido de Mitofusina 2 en grupos control.....	26
Figura 8: Efecto de N-Acetilcisteína en la disminución del contenido de Mitofusina 2 generada durante isquemia.....	27
Figura 9: Modificaciones <i>redox</i> de Mitofusina 2, durante isquemia.....	28
Figura 10: Formación de agregados de Mitofusina 2, en presencia y ausencia de N-Acetilcisteína.....	29
Figura 11: Aumento de la fosforilación de Mitofusina 2 en condición de isquemia.....	30
Figura 12: Efecto del inhibidor de CAMKII (KN-93) y del inhibidor de AMPK (Compuesto C), sobre los niveles de Mitofusina 2.....	31

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio es la principal causa de muerte por enfermedad isquémica coronaria en Chile. Durante isquemia predomina el metabolismo anaeróbico, disminuye la síntesis de ATP y se generan especies reactivas del oxígeno (EROs). La disfunción de la mitocondria tiene un papel central en el daño producido durante isquemia, incidiendo deletéreamente en la viabilidad del cardiomiocito. Fundamentales en la mantención de la función mitocondrial, son los procesos de fusión, que da origen a mitocondrias interconectadas y con elevada eficiencia energética, y de fisión, que genera fragmentación de la red mitocondrial, favoreciendo su degradación. En la fusión participa Mitofusina 2 (Mfn2), la cual en condiciones fisiológicas es ubiquitinada y degradada por el proteosoma. Se desconoce si durante isquemia Mfn2 puede sufrir modificaciones *redox* que actúen como señales que la lleven a su degradación, y como esto podría afectar la función mitocondrial.

N-Acetilcisteína (NAC) es un antioxidante de uso clínico, cuyo rol cardioprotector es atribuido a su capacidad de donar grupos SH, y de restituir los niveles de glutatión intracelular. A nivel experimental NAC ha demostrado proteger la estructura y función mitocondrial, por lo que podría influir en la regulación de las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial. Los objetivos de este trabajo se enfocaron en estudiar si NAC era capaz de evitar el efecto deletéreo de la isquemia sobre el contenido de Mfn2, en corazones aislados de rata, sometidos a isquemia global, mejorando así la función mitocondrial y disminuyendo el tamaño de infarto.

Los resultados obtenidos sugieren que NAC mejora la función ventricular durante la reperfusión, y disminuye el tamaño de infarto, además de mejorar la función mitocondrial y limitar la degradación de Mfn2 que se genera durante la isquemia. Así también se demostró que NAC disminuye el daño oxidativo generado por el fenómeno de isquemia-reperfusión y la oxidación de Mfn2 durante isquemia. Los resultados sugieren además que la fosforilación de Mfn2 podría estar involucrada en su degradación mediante la actividad de CAMKII y AMPK durante isquemia.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction is the leading cause of death by Coronary Ischemic Disease in Chile. Ischemia is characterized by anaerobic metabolism, reduced ATP synthesis and generation of Reactive Oxygen Species (ROS). Mitochondrial dysfunction plays a central role in ischemic injury, deleteriously affecting cardiomyocyte viability. Fusion processes are of paramount importance to maintain mitochondrial function, since they generate interconnected mitochondria with high energetic efficiency. On the other hand, fission processes elicit the fragmentation of the mitochondrial network, promoting their degradation. Mitofusin-2 (Mfn2) is a key fusion protein and under normal physiological conditions, is degraded by the ubiquitin-proteasome system. Moreover, the effects of *redox* modifications that may signal Mfn2 degradation and its effect in mitochondrial function remain largely unknown.

N-Acetylcysteine (NAC) is a clinically used antioxidant and its cardioprotective role is attributed to its capacity to donate sulfhydryl (SH) groups and restore intracellular glutathione levels. On an experimental level, NAC has been described to trigger structural and functional protection of the mitochondria, which suggests that it may also be involved in the regulation of proteins associated to mitochondrial dynamics. The aim of this work was focused in studying if NAC was able to prevent the harmful effect of ischemia upon the content of Mfn2 in isolated rat hearts subjected to global ischemia, by improving mitochondrial function and reducing the infarct size.

The results show that NAC improves left ventricle function recovery during reperfusion, reduces the infarct size, increases mitochondrial function and limits the degradation of Mfn2 generated during ischemia. Additionally, NAC reduced the oxidation of Mfn2 during ischemia and oxidative damage produced by ischemia-reperfusion injury. Furthermore, phosphorylation of Mfn2 may also be involved in its degradation during ischemia through a mechanism mediated by CAMKII and AMPK.

1. INTRODUCCIÓN

En Chile, gran cantidad de muertes en la población adulta son generadas por enfermedades cardiovasculares de origen isquémico. Entre ellas, el infarto agudo de miocardio (IAM), corresponde a la primera causa de muerte (73,6%) (1); por lo que ya desde el año 2005 fue incorporado al listado de condiciones con Garantías Explícitas en Salud (GES) (2). Así mismo, los datos informan que la enfermedad isquémica del corazón también continúa siendo la primera causa específica de AVISA (Años de Vida Saludable perdidos por muerte prematura y discapacidad), posicionando a la patología cardíaca como el principal problema de salud pública a nivel país (3).

La isquemia generada a raíz de la oclusión de una arteria coronaria determina la hipoxia y muerte de cardiomiocitos, afectando la funcionalidad cardíaca general y determinando el riesgo de muerte (4, 5). El progreso del daño en un IAM, es detenido y paradójicamente potenciado por la restauración del flujo sanguíneo, generando un fenómeno de daño por reperfusión (6). El efecto potenciador de la lesión, producido por la reperfusión, se relaciona con el deterioro funcional que sufrió la célula durante la isquemia, lo cual promueve la generación de un estado de estrés oxidativo (EOX) durante la reperfusión, cuyo impacto involucra daño estructural en lípidos, proteínas y ADN (7). Es así como el fenómeno de isquemia-reperfusión (IR) se constituye como un escenario responsable del aumento del área de infarto, en un 50% en relación al generado originalmente por la hipoxia, lo que se asocia clínicamente, a mayor frecuencia de arritmias (8, 9).

El agotamiento de las reservas intracelulares de ATP, generado por la isquemia, se traduce en una serie de eventos perjudiciales para la célula, tales como: incapacidad para mantener el balance iónico, disfunción mitocondrial, alteración de la homeostasis del calcio, y aumento de las especies reactivas del oxígeno (EROs), entre otros (10). La disminución en la oferta de oxígeno, limita la fosforilación

oxidativa, generando mayor fuga de electrones en la cadena respiratoria, y mayor producción de EROs, siendo la mitocondria una de las principales fuentes de EROs intracardiaca (11).

Durante isquemia, las proteínas y lípidos mitocondriales, así como también el ADN mitocondrial (ADNmt), son altamente vulnerables a las modificaciones oxidativas, lo cual afecta la capacidad de este organelo para mantener un adecuado potencial de membrana mitocondrial y consumo de oxígeno, influyendo deletéreamente en su eficiencia metabólica (12, 13). Datos de la literatura indican que en modelos *ex vivo*, corazones sometidos a IR aumentan la fragmentación de la red mitocondrial (14, 15). Así mismo, existen antecedentes que sugieren que la pérdida de la capacidad de fusión mitocondrial tiene un efecto nocivo para los cardiomiocitos (16).

1.1 MITOCONDRIAS Y DINÁMICA MITOCONDRIAL

Las mitocondrias son organelos celulares encargados del metabolismo aerobio, son responsables del 90% de la producción energética cardiaca, razón por la cual ocupan un 25-35% del volumen total en los cardiomiocitos (17). En paralelo a la producción de ATP, la mitocondria es una fuente productora permanente de bajas, e inocuas, cantidades de EROs, situación que en determinadas circunstancias, puede verse incrementada y constituirse como un evento potenciador del daño, como ocurre en el contexto isquémico (18). La mitocondria también participa en la homeostasis del calcio, en la proliferación celular, y se le adjudica un rol regulador en la muerte celular por apoptosis y necrosis (19, 20).

Las mitocondrias son organelos altamente dinámicos, capaces de intercambiar su morfología entre estructuras redondeadas, y redes mitocondriales elongadas, consecuencia de los procesos de **fisión y fusión** mitocondrial respectivamente (21). El equilibrio de dichos procesos opuestos es un componente fundamental para la conservación de las características morfológicas, y las competencias fisiológicas de la mitocondria, por lo que están estrechamente relacionados con la bioenergética (20). En este contexto, en el tejido cardiaco, se ha descrito que cuando los cambios

morfológicos de la mitocondria, limitan la capacidad mitocondrial de oxidar sustratos, se determina la transición a la lesión irreversible (18), por lo que la interrupción de la fusión mitocondrial ha sido identificada como causante de insuficiencia cardíaca letal (22), y así también, la disminución de los procesos de fisión mitocondrial han demostrado un efecto cardioprotector del daño por isquemia reperfusión (15). Así mismo, el funcionamiento mitocondrial eficiente, también requiere una estrecha asociación física con el retículo sarcoplasmático, a fin de permitir la transferencia de calcio hacia la mitocondria, y con ello, la funcionalidad de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (23). Una de las proteínas involucradas en mantener esta asociación es Mitofusina 2 (Mfn2), proteína de la membrana externa mitocondrial (24, 25).

La regulación de la fisión mitocondrial en mamíferos, es dependiente de la actividad de la proteína relacionada con la Dinamina 1 (Drp1) y la proteína de fisión 1 (Fis1). Drp1 es una proteína que reside principalmente en el citoplasma, y su localización en puntos específicos de la membrana mitocondrial externa, representa futuros sitios de fisión (26). La translocación de Drp1 desde el citoplasma a la mitocondria, es promovida por el aumento de los niveles de calcio (27), en un reclutamiento aparentemente dirigido por Fis1, ya que Drp1 carece de una secuencia de destino mitocondrial (28).

Las proteínas encargadas de concretar la fusión de las membranas de mitocondrias contiguas, son la Mitofusina 1 (Mfn1), y Mfn2, que se encuentran ancladas en la membrana mitocondrial externa; mientras el acercamiento y fusión de la membrana mitocondrial interna, está regulada por la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), que se localiza en el espacio intermembrana, adherida a la membrana mitocondrial interna, permitiendo el remodelado de las crestas mitocondriales (21) (Figura 1).

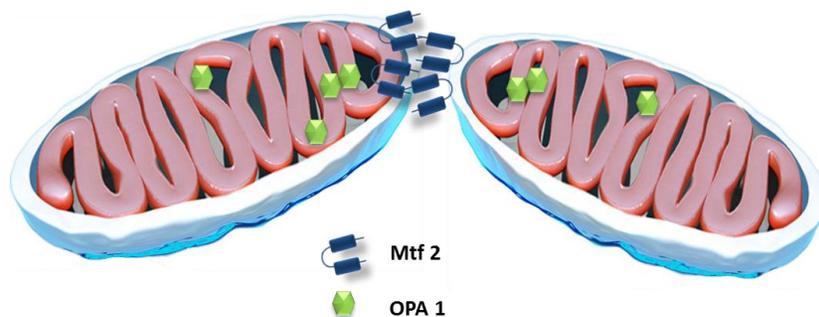


Figura 1: Esquema de las proteínas involucradas en la fusión mitocondrial

Mfn2: Mitofusina 2 (proteína de la membrana externa), Opa1: proteína de atrofia Óptica Tipo 1 (proteína de la membrana interna).

En los últimos años, el avance en el estudio de la regulación postraduccional de Mfn2, ha permitido establecer el vínculo entre los fenómenos de estrés celular, la disminución de Mfn2, la fragmentación mitocondrial, y la muerte por apoptosis. A este respecto, se ha identificado que Mfn2 puede ser fosforilada, y que esta fosforilación podría ser una señal que determine su ubiquitinación y consecuente degradación proteosomal (19), así también se ha señalado que la proteína Parkina, permite la ubiquitinación de Mfn2, facilitando con ello, la eliminación de las mitocondrias dañadas, a través del proceso de macroautofagia (mitofagia) (29). Considerando que en un contexto oxidativo, se generan alteraciones en la morfología mitocondrial, determinantes de su deterioro funcional (30), es posible que el daño oxidativo afecte a Mfn2, estimulando su degradación, y que esto sea una causa de la pérdida de la indemnidad mitocondrial.

1.2 ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA ISQUEMIA

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EROs/ERNs), son moléculas muy reactivas, cuyas propiedades oxidantes les confieren la capacidad de modificar covalentemente a lípidos, proteínas y ADN, y de participar como señalizadores en diversas vías que regulan tanto la supervivencia como la muerte celular (31, 32). En circunstancias en que su presencia alcanza niveles que superan la capacidad de respuesta antioxidante celular, la acción de las especies reactivas fomenta un caos homeostático, que condiciona un comportamiento celular patológico, y pone en

riesgo la funcionalidad y viabilidad celular, fenómeno reconocido como estrés oxidativo (33). El daño oxidativo, es causa de deterioro cardiaco durante la isquemia y durante la IR en los seres humanos (34), algunas de las fuentes involucradas normalmente en su generación son: las mitocondrias (30), la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa (XO) y la óxido nítrico sintasa (NOS) (35). Considerando la gran densidad mitocondrial en el cardiomiocito, y el deterioro que ésta sufre durante la isquemia, que afecta su capacidad de aprovechar apropiadamente el oxígeno residual (36), este organelo adquiere un rol aún más importante en la producción EROs, aumentado la generación del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y colaborando con la generación de estrés oxidativo en la isquemia (37).

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Existen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (metabólicos, o de origen nutricional). Sin embargo, son los sistemas antioxidantes enzimáticos, los que constituyen la primera línea de defensa para la neutralización de EROs/ERNs. A nivel intracelular, la superóxido dismutasa (SOD), con presencia citoplasmática y mitocondrial, cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$, en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), agente oxidante que es transformado en agua y oxígeno (O_2) por acción de la catalasa (CAT) de ubicación peroxisomal, o por la glutatión peroxidasa (GP_x). La GP_x es capaz de eliminar el H_2O_2 al utilizar como cofactor al glutatión reducido (GSH), transformándolo en glutatión oxidado (GSSG), el cual, puede ser nuevamente reducido a GSH, por acción de otras enzimas colaboradoras del sistema antioxidante. Éstas son la: glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), y gamma glutamil cisteinil sintetasa (YGCS) (38).

El glutatión es el principal antioxidante celular, puede ser sintetizado a partir de los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina. El grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína, sirve como donador de electrones y es responsable de la actividad biológica del glutatión, el cual reduce el enlace disulfuro formado dentro de proteínas, al actuar como un donante de electrones. La gran necesidad de glutatión para la mantención del estado reducido del ambiente intracelular, ha llevado al uso de N-Acetilcisteína

(NAC), precursor del aminoácido cisteína, como medio para favorecer la síntesis de glutatión, y evitar el estrés oxidativo (39, 40). Se ha demostrado que el efecto antioxidante del NAC es protector. Permite la reducción de la apoptosis (41), tanto por eliminación directa de EROs y la reposición del contenido de glutatión intracelular (42), como por mecanismos que sugieren un efecto positivo de NAC en la conservación mitocondrial. Su administración ejerce un efecto preventivo sobre la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y la inhibición de la activación de la vía de muerte intrínseca inducida por tóxicos (43).

Es importante recordar que la presencia de las especies reactivas de oxígeno puede cumplir un rol fisiológico (44); sin embargo, si sus niveles aumentan, como resultado del daño oxidativo, las proteínas oxidadas modifican o pierden su función, y pueden ser degradadas por mecanismos homeostáticos intracelulares como las proteasas, los lisosomas, y por el proteosoma. El proteosoma es un complejo multiproteico que responde principalmente al marcaje de proteínas generado por el sistema de ubiquitinización, dependiente de ATP, constituyendo el sistema ubiquitin-proteosoma (UPS). Sin embargo, existe evidencia de su capacidad de mediar la eliminación de proteínas oxidadas durante la isquemia miocárdica, sin necesidad de ATP o Ubiquitina (45). Esto dependería de la interacción directa de las proteínas con el núcleo catalítico del proteosoma (20S), dirigida por ciertas modificaciones oxidativas, determinantes de un aumento de la hidrofobicidad proteica, ya sea por introducción de grupos hidrófobos o desplegamiento (46).

Considerando que: a) durante la isquemia se genera un aumento en la producción de EROs, y que además se afecta negativamente la función mitocondrial, de la cual depende la vida del cardiomiocito, y b) que dicha función se encuentra estrechamente vinculada a la mantención del proceso de fusión, dependiente de Mfn2; se hace interesante investigar, si en el contexto oxidativo condicionado por la isquemia, Mfn2 sufre modificaciones *redox*, y si estas modificaciones a su vez, son estímulo para su degradación. Además, determinar si esta degradación puede ser revertida por el uso de antioxidantes como NAC, y si estos resultados se acompañan

de un efecto positivo sobre el funcionamiento mitocondrial y la recuperación coronaria.

2. HIPÓTESIS

El antioxidante N-Acetilcisteína previene la disminución de los niveles de Mitofusina 2 inducida por isquemia, en corazones aislados de rata, sometidos a isquemia global, mejorando la función mitocondrial y disminuyendo el tamaño de infarto.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del N-Acetilcisteína sobre el contenido de Mitofusina 2, función mitocondrial y tamaño de infarto, en corazones aislados de rata sometidos a isquemia.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1** Determinar el efecto de la perfusión con N-Acetilcisteína en el tamaño de infarto y recuperación de la contractilidad.
- 4.2** Determinar el efecto de la perfusión con N-Acetilcisteína en indicadores de estrés oxidativo.
- 4.3** Determinar el efecto de N-Acetilcisteína en la función mitocondrial de corazones sometidos a isquemia.
- 4.4** Determinar el efecto de N-Acetilcisteína en el contenido Mitofusina 2, en homogenizados de corazones sometidos a isquemia.
- 4.5** Determinar el efecto de N-Acetilcisteína en las modificaciones *redox* de Mitofusina 2.
- 4.6** Determinar posibles vías de señalización involucradas en la degradación de Mitofusina 2.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Anticuerpo contra Mitofusina 2 (catálogo #ab56889) fue obtenido desde *Thermo Fisher Scientific*. Anticuerpo contra HSP70 mitocondrial (mtHSP70), fue obtenido desde *Abcam*. Anti-fosfo Mfn2 (Ser442, catálogo #ABC963) se obtuvo de *Millipore*. El kit para la medición de TBARS (Método TCA, catálogo #700870) y el kit para la medición del consumo de oxígeno (MitoXpress®, catálogo #600800) fueron obtenidos desde *Cayman Chemical*. N-Etilmaleimida, Ditiotreitól, N-acetilcisteína, Anti-Miro 1, Anti-GAPDH y el kit para detectar cambios en el potencial de membrana mitocondrial (catálogo #CS0390) fueron obtenidos de *Sigma Aldrich*. Compuesto C (catálogo #CAS-866405-64-3) y KN-93 (catálogo #422708) se obtuvieron de *Calbiochem*.

5.2 Animales

Se utilizaron ratas macho adultas, Sprague-Dawley con un peso de 250 a 300 g obtenidas desde el Bioterio Central, del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Con un protocolo de manejo de animales ajustado a lo descrito en las Guías de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio, publicadas por el *U.S National Institutes of Health* (NIH, Publication No. 85-23, revisadas en 1996), y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Chile (Protocolo CBA#541 FMUCH).

5.3 Modelo ex vivo de isquemia global

Se utilizó el sistema Langendorff de perfusión coronaria retrógrada (47). Para la extracción de los corazones, las ratas fueron previamente anestesiadas con pentobarbital intraperitoneal (65 mg/Kg). Posteriormente, se realizó una esternotomía para exponer el corazón, administrándose 0,1 mL de heparina (100 U/Kg), en la cavidad de la aurícula derecha. Los corazones fueron rápidamente canulados a través de la aorta ascendente, y escindidos para ser montados en el sistema

Langendorff, donde fueron inmediatamente perfundidos con solución de tampón Krebs-Henseleit bicarbonato modificado que contiene (en mM): NaCl (128); KCl (4,7); CaCl₂ (27); MgSO₄ (1,1); NaH₂PO₄ (0,4); NaHCO₃ (20,2); glucosa (11,1) a flujo constante (10–14 mL/min) con una bomba de infusión peristáltica (Gilson Minipuls3, Francia), a temperatura controlada de 37 °C por un sistema de recirculación de agua entibiada por termostato (B. Braun Thermomix 1420, Alemania Occidental) y equilibrado con una mezcla de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ para ajustar el pH a 7,35 – 7,45.

Una vez montado en el sistema Langendorff, al corazón se le eliminaron las aurículas, y en el ventrículo izquierdo se insertó un balón hecho de film plástico conectado a un transductor de presión (Puente Amp ADInstruments ML221, Australia). Durante la estabilización, el balón se llenó con agua destilada hasta conseguir una presión diastólica final de ventrículo izquierdo (PDFVI) entre 5-10 mmHg. El volumen del balón se mantuvo constante durante todo el experimento. Se mantuvo una frecuencia cardiaca de 240 pulsos por minuto, con apoyo de estimulación eléctrica.

Fueron excluidos del estudio los corazones que no lograron una presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) o una presión de perfusión mayor a 60 mmHg en el periodo de estabilización (10 minutos). Posteriormente los corazones fueron sometidos a los diferentes protocolos experimentales, registrándose en forma constante el desarrollo de presión, +dP/dt, -dP/dt, frecuencia cardiaca y la presión de fin de diástole.

Algunos corazones de rata se destinaron a la medición del tamaño de infarto, y otros se congelaron a -80°C para análisis bioquímico.

5.4 Protocolos experimentales

Todos los corazones, pertenecientes a los distintos grupos experimentales, fueron estabilizados por 10 minutos con solución tampón Krebs-Henseleit, previo al inicio del protocolo.

C₅₀: Los corazones se perfundieron por 50 minutos con solución tampón Krebs-Henseleit.

C₁₁₀: Los corazones se perfundieron por 110 minutos con solución tampón Krebs-Henseleit.

I₃₀: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con solución tampón Krebs-Henseleit, y luego fueron sometidos a isquemia global por 30 minutos.

IR: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con solución tampón Krebs-Henseleit, luego se sometieron a isquemia global por 30 minutos, y finalmente se perfundieron con solución tampón Krebs-Henseleit por 60 minutos.

C₅₀ + NAC: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con NAC 1 mM, y los siguientes 30 minutos con solución tampón Krebs-Henseleit.

C₁₁₀ + NAC: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con NAC 1 mM, y los siguientes 90 minutos con solución tampón Krebs-Henseleit.

I₃₀ + NAC: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con NAC 1 mM, y luego se sometieron a isquemia global.

IR + NAC pre Isquemia: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con NAC 1 mM, luego se sometieron a isquemia global por 30 minutos, y finalmente se perfundieron con solución tampón Krebs-Henseleit por 60 minutos.

IR + NAC durante la reperfusión: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con solución tampón Krebs-Henseleit, luego se sometieron a isquemia global por 30 minutos, y finalmente se perfundieron con NAC 1 mM, durante 60 minutos.

IR + KN-93 pre Isquemia: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con KN-93 (2,5 μ M), luego se sometieron a isquemia global por 30 minutos, y finalmente se perfundieron con solución tampón Krebs-Henseleit por 60 minutos.

IR + Compuesto C pre Isquemia: Los corazones se perfundieron por 20 minutos con Compuesto C (5 μ M), luego se sometieron a isquemia global por 30 minutos, y finalmente se perfundieron con solución tampón Krebs-Henseleit por 60 minutos.

5.5 Medición de tamaño de infarto

En algunos corazones, al final del protocolo, se perfundieron con 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1% (Sigma Chemical) en tampón fosfato, ajustado a pH 7,4, 37°C (48). Posteriormente los corazones se conservaron a -20°C por 1 hora, luego, se cortaron en rebanadas y se suspendieron en formalina al 10% toda la noche para su fijación. Al día siguiente, las rebanadas se colocaron entre dos placas de vidrio, con un espaciador de 1,5 mm, y se escanearon para finalmente ser medidos por planimetría utilizando el software Image J. El tamaño del infarto se expresó como porcentaje del volumen infartado (área no teñida) respecto del volumen total de ventrículo (sumatoria de los volúmenes de cada rebanada).

5.6 Medición de la función del ventrículo izquierdo

Se midió la PDVI y la máxima derivada del desarrollo de presión en el tiempo (+dP/dt). Los datos obtenidos se registraron utilizando el software PowerLab (ML866 ADInstrument, Australia).

5.7 Obtención de homogeneizados de tejido cardiaco

Los ventrículos de ratas adultas congelados en nitrógeno líquido se homogeneizaron en tampón frío compuesto por (en mM): MOPS-TRIS (20) pH=7,4, Sacarosa (300), EDTA (2), EGTA (2), PMSF (1), benzamidina (1), NP-40 (1%), SDS (1%), leupeptina (2 µg/mL), pepstatina (1 µg/mL). Las muestras se homogeneizaron en Douncer vidrio-teflón y posteriormente se centrifugaron a 1.000 x g por 20 minutos a 4° C. Las fracciones solubles se almacenaron a -80° C para su posterior análisis.

5.8 Aislamiento de mitocondrias desde tejido cardiaco

Los corazones de rata se homogeneizaron en Douncer vidrio-teflón utilizando una solución **tampón A** compuesta por (en mM): Manitol (225), Sacarosa (75), EGTA-K (0,5), TRIS-HCl (30) pH= 7,4, y BSA 0,5%; en una relación 1:6 (tejido: tampón). Una vez homogeneizados, éstos se sometieron a dos centrifugaciones sucesivas de 740 x g por 5 minutos a 4°C, conservando en ambos casos el sobrenadante. Posteriormente los sobrenadantes obtenidos en el punto anterior se centrifugaron a 9.000 x g por 10 minutos a 4°C, obteniéndose así un pellet enriquecido en mitocondrias. Con el fin de eliminar las contaminaciones provenientes del entorno celular, el pellet obtenido se resuspendió primero en una solución **tampón B** compuesta por (en mM): Manitol (225), Sacarosa (75), TRIS-HCl (30) pH= 7,4, con BSA 0,5%; seguido de una centrifugación a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en una solución **tampón C** compuesto por (en mM): Manitol (225), Sacarosa (75) y TRIS-HCl (30) pH= 7,4, seguido de una centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido corresponde al crudo de mitocondrias, el cual finalmente se resuspendió en 250 µL de **tampón D** compuesto por (en mM): Manitol (250), HEPES (5), EGTA-K (0,5). El crudo de mitocondrias obtenido se utilizó para el análisis inmediato de la función mitocondrial (consumo de oxígeno y potencial de membrana mitocondrial) (47).

5.9 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas tanto de los homogeneizados como de las fracciones enriquecidas en mitocondrias obtenidas, se realizó por el método colorimétrico de *Hartree* (49).

5.10 Consumo basal de oxígeno

Se evaluó el consumo de oxígeno en las mitocondrias, en presencia de succinato, glutamato, malato y ADP, con una sonda fluorescente (MitoXpress) sensible a oxígeno, en un medio acuoso cubierto con una capa de aceite mineral (50). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de Fluorescencia/min/mg de proteínas.

5.11 Potencial de membrana mitocondrial

Para medir el potencial de membrana mitocondrial se utilizó la sonda JC-1 (5,5', 6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianuro), la cual ingresa a la matriz mitocondrial cuando éstas tienen un potencial de membrana adecuado (polarizadas) (51).

Las mitocondrias obtenidas de cada grupo experimental fueron incubadas con la sonda JC-1 en un tampón compuesto por succinato, glutamato, malato y ADP, por 10 minutos a 37°C. Para identificar los monómeros de JC-1 en la muestra se utilizó una longitud de onda de 490 nm para excitación y 530 nm para emisión. Para identificar los agregados de JC-1 se utilizó una longitud de onda de excitación de 525 nm y 590 nm para emisión. Los resultados se expresaron como razón de fluorescencia entre la sonda agregada y la soluble.

5.12 Contenido de Mitofusina 2 en homogeneizados de rata adulta

El contenido de Mfn2 se evaluó en homogeneizados, para lo cual se utilizaron 30 µg de proteína de cada condición, los cuales se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (DTT en el tampón de carga) y transferidos a membranas de PVDF para ser incubadas con los anticuerpos Anti-Mfn2 en una

dilución 1: 3000. Como control de carga se utilizó GAPDH en una dilución 1:20.000. Para cuantificar los agregados de Mfn2 se reemplazó el DTT del tampón de carga por NEM (N-etilmaleimida). Para cuantificar la Mfn2 fosforilada se utilizó el anticuerpo anti-fosfo Mfn2 capaz de reconocer en Serina 442, en una dilución 1:1000. Para cuantificar mtHSP70 y la proteína Miro 1 se utilizó el anticuerpo respectivo en una dilución de 1:1000.

5.13 Contenido de glutatión

La determinación del contenido de GSH, se realizó utilizando el método espectrofotométrico de Griffith (52).

5.14 Cuantificación de malondialdehido

Se cuantificó el malondialdehido (MDA) en homogeneizado de tejido cardiaco, por medio de un método colorimétrico (TBARS) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.15 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de $p < 0,05$. Para comparar dos grupos experimentales se utilizó un t-test.

Para comparar más de dos grupos experimentales se utilizó un ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey. En los casos en que no fue posible asegurar una distribución normal de los datos, se utilizó test de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos experimentales, seguido del test de Dunns.

6. RESULTADOS

6.1 N-Acetilcisteína mejora la función ventricular en corazón aislado de rata adulta sometido a isquemia y reperfusión.

Para evaluar el efecto de la perfusión con NAC (1 mM) sobre la función ventricular, se registraron y evaluaron los parámetros contráctiles al final de la reperfusión (Figura 2). En un grupo experimental NAC se utilizó por 20 minutos, previo a la isquemia, y en otro se utilizó durante los 60 minutos de reperfusión.

Los resultados muestran que en las dos condiciones en que se utilizó NAC, se aumentó la recuperación del desarrollo de presión (sin mostrar diferencias significativas entre los dos grupos), respecto a los corazones sometidos a IR sin tratamiento. También se evidenció que sólo los corazones tratados con NAC durante la reperfusión, muestran un significativo aumento en la recuperación de la máxima derivada del desarrollo de presión.

6.2 N-Acetilcisteína disminuye el tamaño de infarto en corazón aislado de rata adulta sometido a isquemia y reperfusión.

Se midió el tamaño de infarto en los corazones sometidos a los tres protocolos de isquemia y reperfusión: sin tratamiento (IR), con NAC previo a la isquemia (NAC-IR), y con NAC durante la reperfusión (IR-NAC). Los resultados indican que, en coherencia con los parámetros de función coronaria, el tamaño del infarto se redujo, aproximadamente en un 42%, en los corazones tratados con NAC, sin observarse diferencias significativas entre el uso de NAC previo a la isquemia y su uso durante la reperfusión (Figura 3).

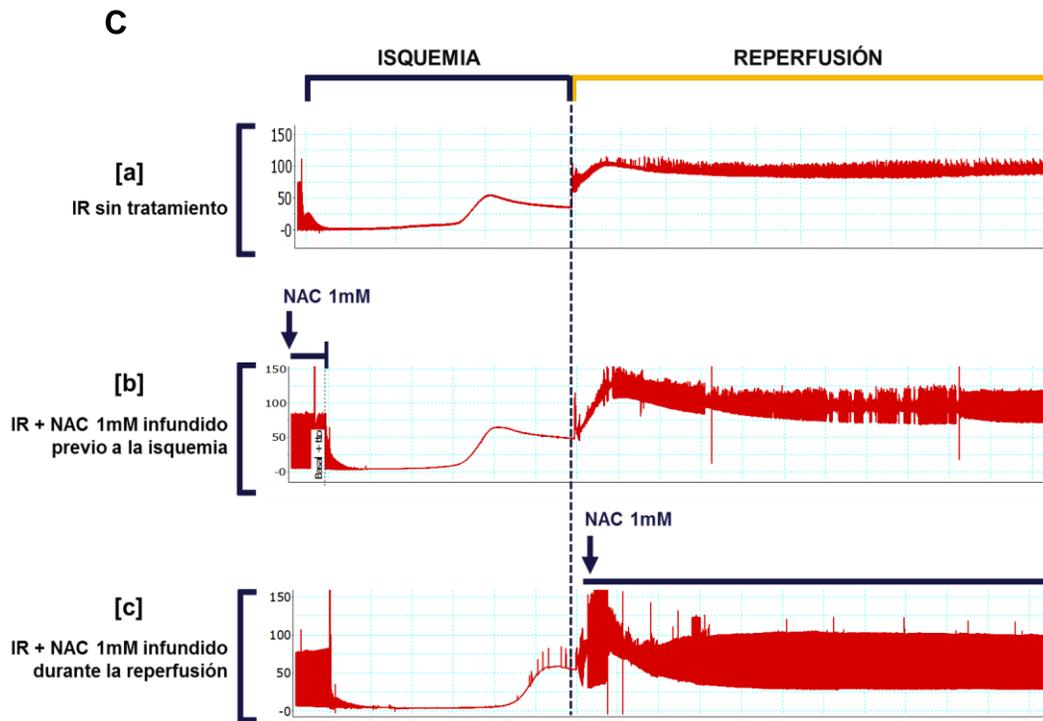
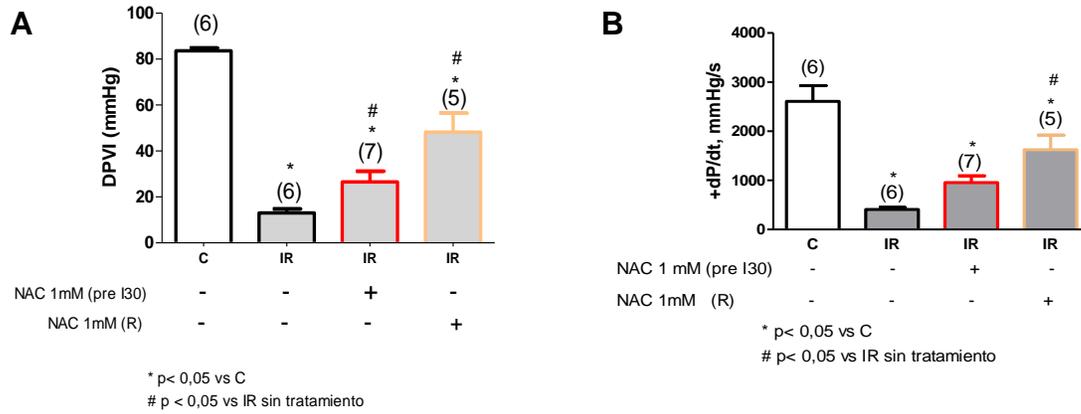
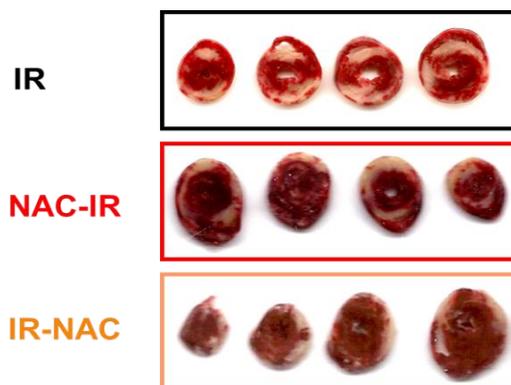


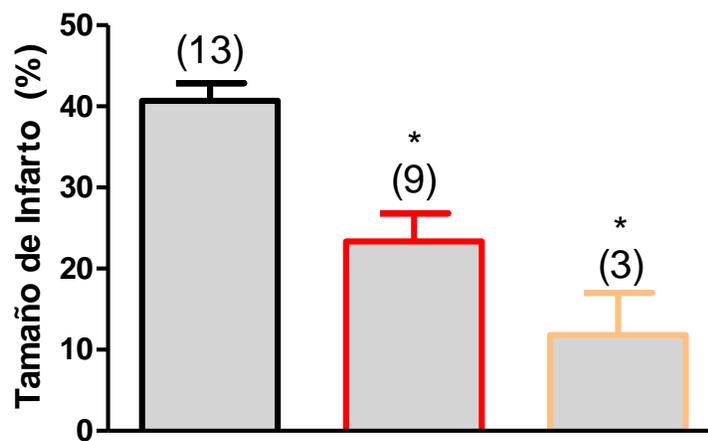
Figura 2: Efecto de N-Acetilcisteína en el daño producido por isquemia y reperfusion.

Las barras representan el promedio \pm SEM del desarrollo de presión (A) y de la máxima derivada del desarrollo de presión (B) en controles (C) y al final de la reperfusion (IR), de corazones con y sin tratamiento de NAC. Se utilizó ANOVA de una vía, Test de Tukey como post test. * p < 0,05 vs Control, # p < 0,05 vs IR, el número entre paréntesis corresponde al número de muestras. En la figura (C) se muestran tres registros representativos del desarrollo de presión en el tiempo, el superior [a] corresponde a un corazón sin tratamiento, el del medio [b] a un corazón tratado con NAC por 20 minutos previo a la isquemia, y el inferior [c] a un corazón tratado con NAC durante toda la reperfusion.

A



B



NAC 1mM pre Isquemia	-	+	-
NAC 1mM en reperusión	-	-	+

* $p < 0,05$ vs sin tratamiento

Figura 3: Efecto de N-Acetilcisteína en el tamaño de infarto.

Las imágenes del panel superior (A) son representativas de rebanadas de corazón pertenecientes a los grupos sometidos a isquemia reperusión sin tratamiento (IR), isquemia reperusión con NAC previo a la isquemia (NAC-IR), e isquemia reperusión con NAC durante la reperusión (IR-NAC). Las barras (B) representan el tamaño del infarto expresado como volumen de la zona infartada respecto del volumen total del corazón (promedio \pm SEM) en presencia y ausencia de NAC. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras. Para establecer diferencias entre los grupos se utilizó: test de Kruskal-Wallis y un post test de Dunns para múltiples comparaciones.

6.3 N-Acetilcisteína evita la disminución de glutatión y el aumento de MDA que se produce durante la reperfusión.

Para evaluar el efecto de NAC sobre el daño oxidativo producido por IR, se cuantificaron los niveles de glutatión total y de malondialdehído en homogeneizados obtenidos de los corazones pertenecientes a los protocolos control, isquemia, e IR, con o sin tratamiento con NAC previo a la isquemia. Los resultados mostraron que el contenido de glutatión no disminuyó durante la isquemia, pero sí durante la reperfusión, y que la perfusión con NAC antes de la isquemia, permite evitar dicha disminución. Los resultados de la medición de malondialdehído obtenidos en los distintos grupos experimentales, muestran un aumento significativo del daño por lipoperoxidación que se manifiesta durante la reperfusión, lo que puede ser evitado parcialmente cuando se utiliza NAC como tratamiento previo a la isquemia. Estos resultados sugieren un efecto protector de NAC sobre los niveles de antioxidantes, y sobre el daño oxidativo generado por el fenómeno de IR (Figura 4).

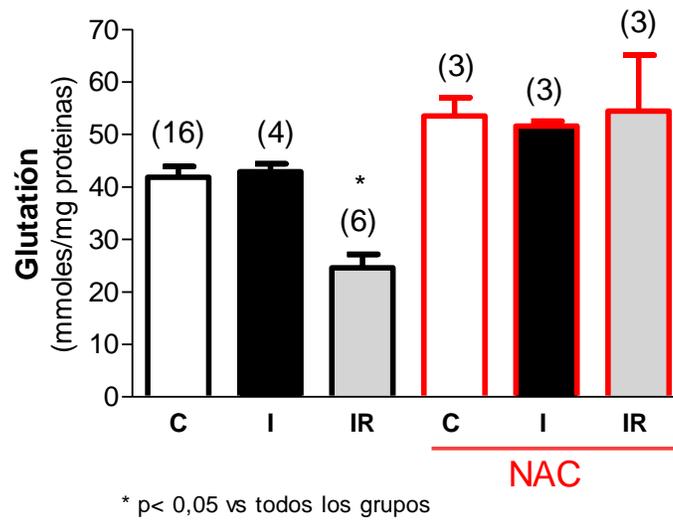
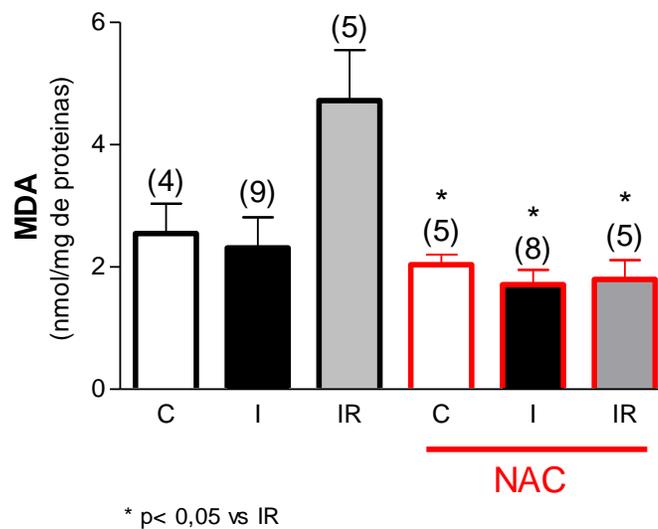
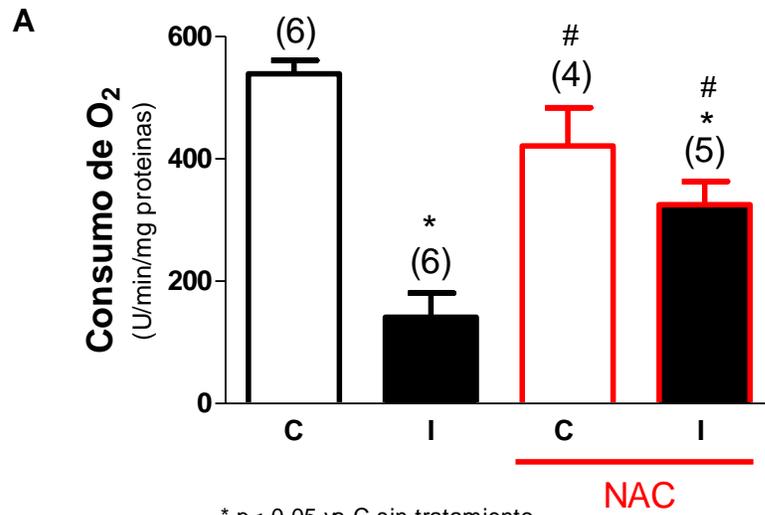
A**B**

Figura 4: Indicadores de estrés oxidativo en presencia y ausencia de N-Acetilcisteína

Las barras representan el promedio \pm SEM del contenido de glutatión de homogenizados de corazones controles (C), isquémicos (I), y sometidos a isquemia y reperusión (IR) en presencia o ausencia de NAC previo a la isquemia (A). Para comparar los distintos grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía, como post test Tukey. * p < 0,05 vs todos los grupos. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras. Las barras de la figura (B) muestran el contenido (promedio \pm SEM) de Malondialdehído (MDA) medido en corazones sometidos a los distintos protocolos, el valor entre paréntesis corresponde al número de muestras. Para comparar los distintos grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía, como post test Tukey.

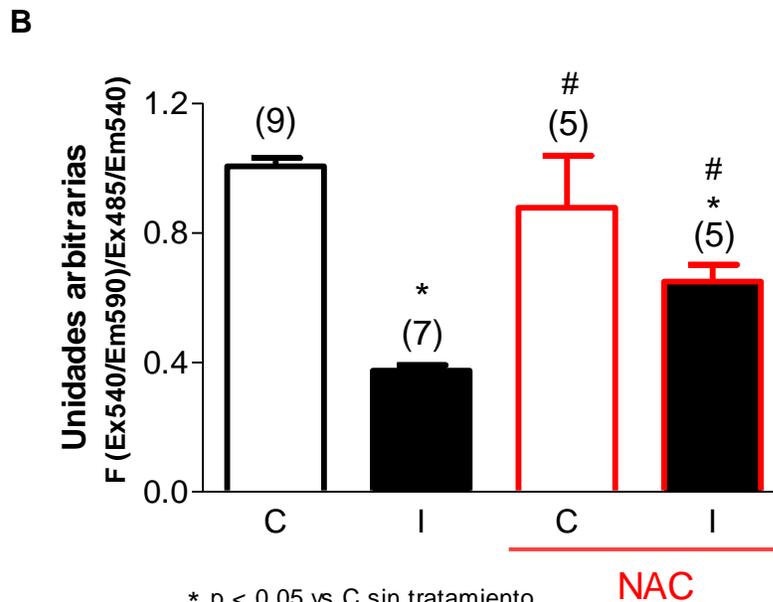
6.4 N-Acetilcisteína reduce la disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que se genera después de isquemia.

Los resultados muestran que la isquemia produce una disminución en el consumo de oxígeno basal por las mitocondrias, efecto que se redujo significativamente cuando se utilizó NAC (Figura 5A). Paralelamente, se observó que luego de la isquemia, se genera una disminución significativa en el potencial de membrana mitocondrial, lo cual fue parcialmente evitado por el tratamiento previo con NAC (Figura 5B).



* p < 0,05 vs C sin tratamiento

p < 0,05 vs I sin tratamiento



* p < 0,05 vs C sin tratamiento

p < 0,05 vs I sin tratamiento

Figura 5: Efecto de N-Acetilcisteína en el daño mitocondrial generado por isquemia.

Las barras representan el promedio \pm SEM del consumo de oxígeno (A) y el potencial de membrana (B) de mitocondrias aisladas de corazones controles (C) y sometidos a isquemia (I) en presencia y ausencia de NAC. Para comparar los grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía, Test de Tukey como post test. * p < 0,05 vs Control, # p < 0,05 vs Isquemia. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras.

6.5 El contenido de Mitofusina 2 disminuye con la isquemia y no se recupera durante la reperfusión.

Los datos demuestran una significativa disminución del contenido de Mfn2 en los homogeneizados provenientes de corazones sometidos a 30 minutos de isquemia, disminución que no se recupera durante los siguientes 60 minutos de reperfusión (Figura 6).

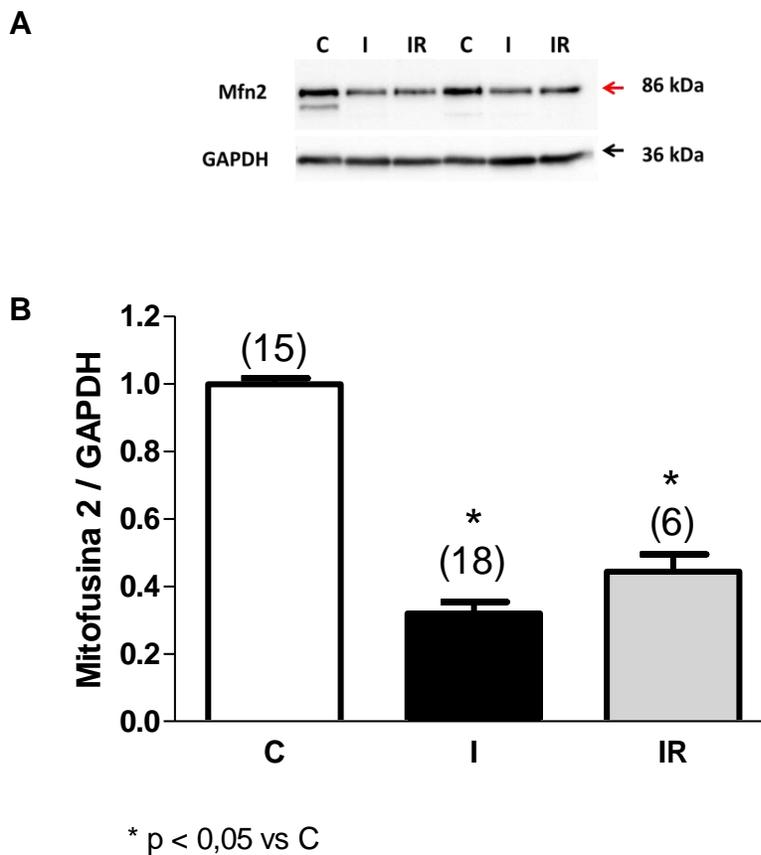


Figura 6: Efecto de la isquemia y la reperfusión en el contenido de Mfn2 en homogeneizados de corazón. En la imagen (A) se presenta: Westerns blot representativo de Mfn2 y el control de carga GAPDH. Las barras (B) representan el promedio \pm SEM del contenido de Mfn2/GAPDH de westerns blot de homogeneizados de tejidos corazones controles (C), sometidos a 30 minutos de Isquemia global (I), y corazones sometidos a 30 minutos de isquemia, seguidos de 60 minutos reperfusión (IR). Para comparar los grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía, como post test Tukey. * p < 0,05 vs control. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras.

6.6 N-Acetilcisteína no modifica los niveles de Mitofusina 2 en condiciones basales.

Para verificar que bajo condiciones control, NAC no modifica los niveles de Mfn2, se midió el contenido de esta proteína en homogeneizados de corazones perfundidos con solución tampón Krebs-Henseleit por 50 minutos, y en los corazones cuyo protocolo incluye 20 minutos de perfusión con NAC 1mM seguido de 30 minutos de perfusión con solución Krebs-Henseleit, identificándose que NAC no genera variación sobre los niveles basales de Mfn2 (Figura 7).

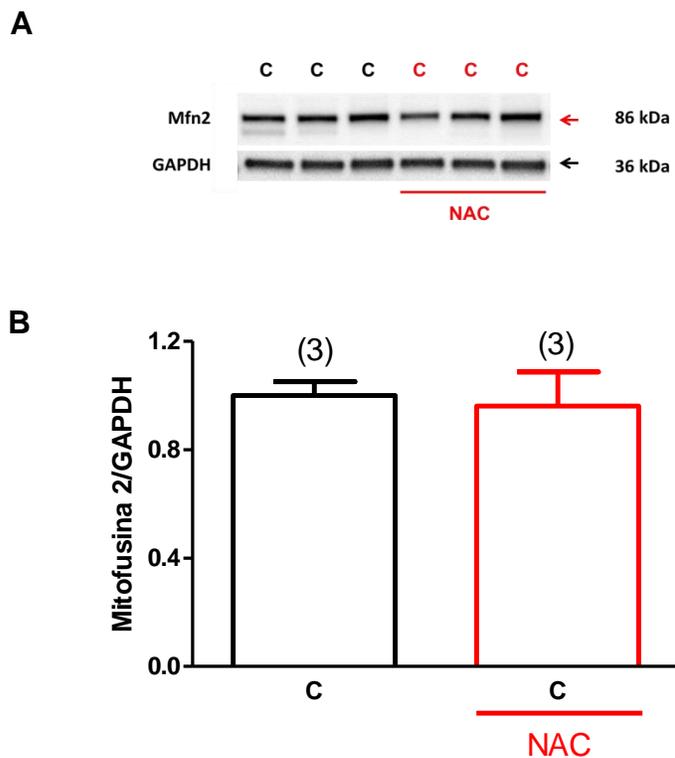


Figura 7: Efecto de N-Acetilcisteína en el contenido de Mitofusina 2 en grupos control.

En la imagen **(A)** se presenta: Westerns blot representativo de Mfn2 y el control de carga GAPDH. **(B)** Las barras representan el promedio \pm SEM del contenido de Mfn2/GAPDH de Westerns blot de homogeneizados de tejidos corazones controles (C), con o sin uso de NAC. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras.

6.7 N-Acetilcisteína atenúa la disminución del contenido de Mitofusina 2 ocurrida en isquemia.

Para evaluar el efecto de NAC sobre los niveles de Mfn2, se evaluaron sus niveles en homogeneizados de corazones pertenecientes al grupo control, y del grupo sometido a isquemia global por 30 minutos, con o sin tratamiento con NAC. Los resultados indican que NAC fue capaz de reducir la pérdida de Mfn2, en un 24% durante la isquemia (Figura 8)

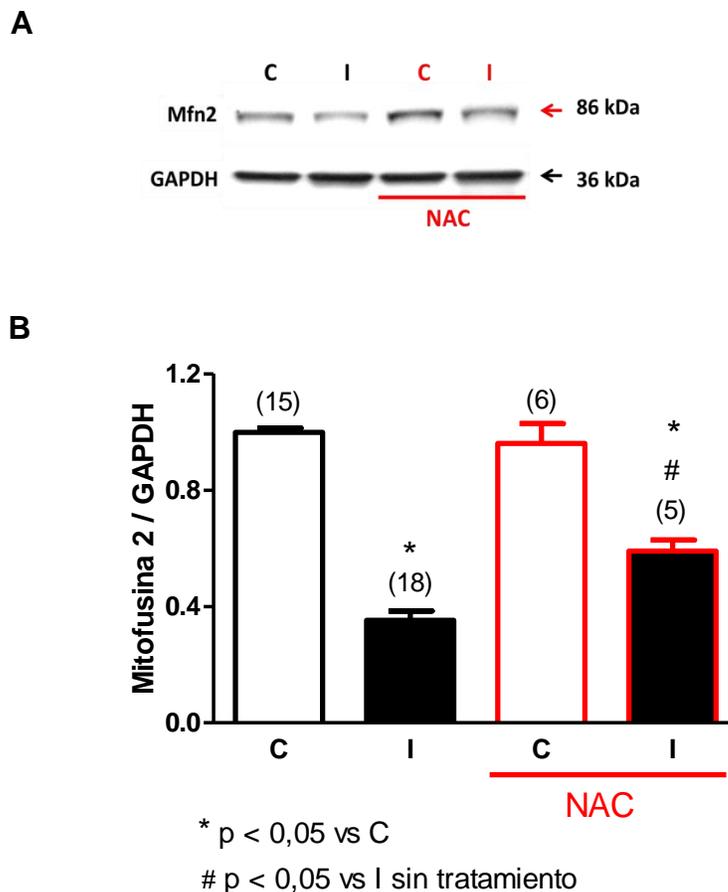


Figura 8: Efecto de N-Acetilcisteína en la disminución del contenido de Mitofusina 2 generada durante isquemia.

En la imagen **(A)** se presenta: Westerns blot representativo de Mfn2 y el control de carga GAPDH. **(B)** Las barras representan el promedio \pm SEM del contenido de Mfn2/GAPDH de Westerns blot de homogeneizados de tejidos corazones controles (C), sometidos a 30 minutos de Isquemia global (I) en condición control y tratados con NAC (1 mM) previo a la isquemia. Para comparar los grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía, como post test Tukey. * p < 0,05 vs Control, # p < 0,05 vs Isquemia. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras.

6.8 Mitofusina 2, durante la isquemia, forma agregados proteicos mediante puentes disulfuro.

Para verificar si el estado *redox* genera modificaciones en Mfn2, se evaluó la presencia de la proteína mediante una electroforesis realizada en condiciones no reductoras (sin DTT en el tampón de carga), y se logró identificar que Mfn2 forma agregados mediante puentes disulfuro, los cuales no son identificables al agregar un agente reductor al tampón de carga de la electroforesis (DTT o Tiorredoxina reductasa).

Para indagar sobre las proteínas que forman parte del agregado, se evaluó, bajo las mismas condiciones de electroforesis (con uso de NEM), la presencia de otras proteínas mitocondriales tales como mtHSP70 y Miro1, identificándose que solo Mfn2 y mtHSP70 co-migraron en la formación de agregados de 170 kDa (Figura 9).

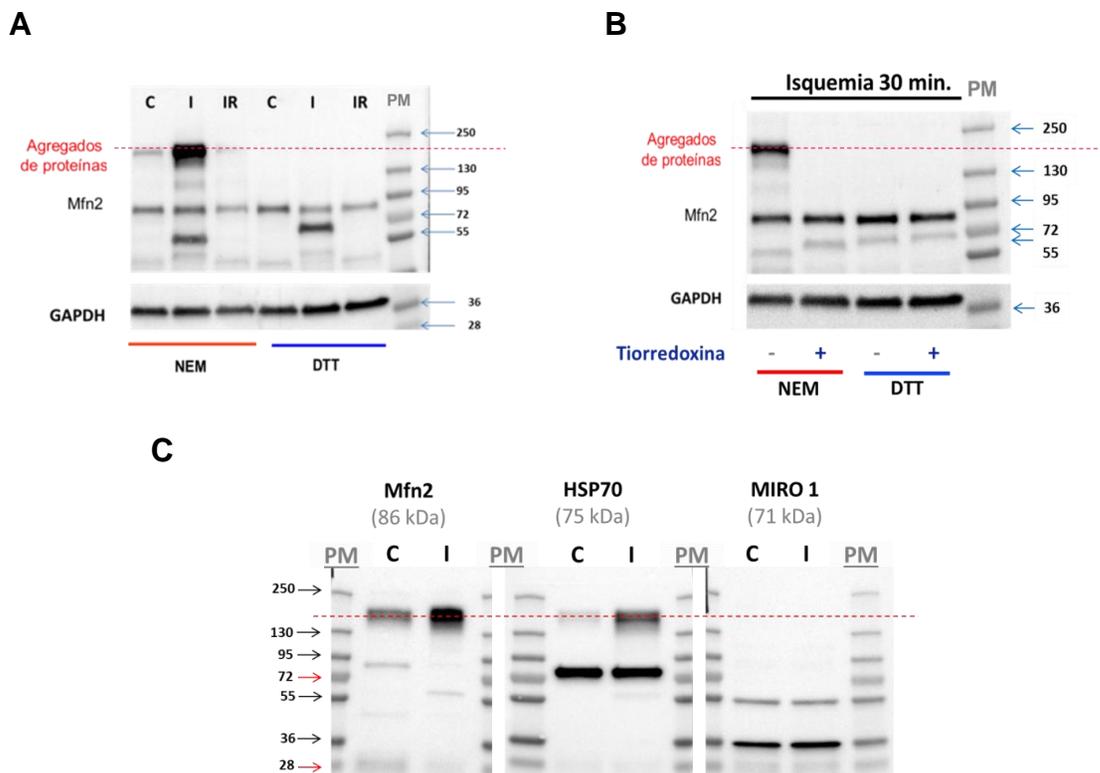


Figura 9: Modificaciones *redox* de Mitofusina 2, durante isquemia.

En la imagen (A y B) se presentan dos Westerns blot, de grupo control (C), y sometidos a isquemia de 30 minutos (I), representativos de la presencia de agregados proteicos de Mfn2. En la imagen (C) se presenta un Western blot, en condiciones no reductoras, donde se detectan tres proteínas mitocondriales Mfn2, mtHSP70, Miro1.

6.9 N-Acetilcisteína disminuye la formación de agregados de Mitofusina 2, que se producen durante la isquemia.

Con la finalidad de identificar si NAC logra modificar las condiciones *redox* que influirían en la formación de agregados de Mfn2 durante la isquemia, se realizó una electroforesis en condiciones no reductoras, y se cuantificaron los agregados formados en condición control, e isquemia global de 30 minutos, con o sin uso de NAC, identificándose que el tratamiento antioxidante limita significativamente la formación de los agregados de Mfn2 (Figura 10).

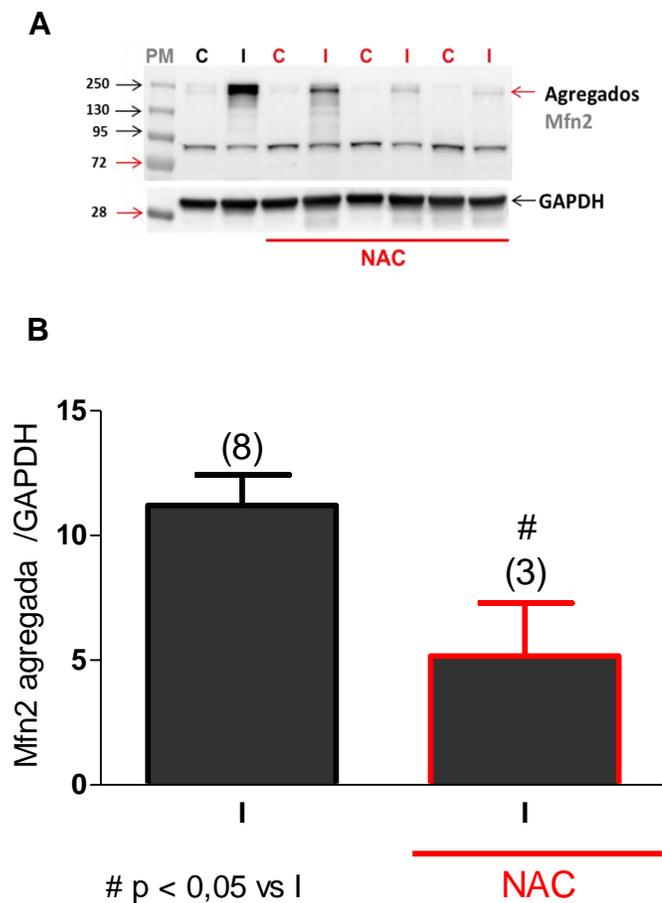


Figura 10: Formación de agregados de Mitofusina 2, en presencia y ausencia de N-Acetilcisteína. En la imagen **(A)** se presenta: Westerns blot representativo de Mfn2 y el control de carga GAPDH. **(B)** Las barras representan el promedio \pm SEM del contenido de Mfn2/GAPDH de westerns blot de homogeneizados de tejidos corazones sometidos a 30 minutos de Isquemia global (I), con o sin uso de NAC. Para comparar los grupos experimentales se utilizó el análisis estadístico t de Student, # $p < 0,05$ vs Isquemia. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras.

6.10 Mitofusina 2 aumenta su fosforilación durante la isquemia global de 30 minutos.

Para evaluar las modificaciones que afectan a Mfn2 durante la isquemia, se cuantificaron los niveles de Mfn2 fosforilada, en relación a Mfn2 total, en homogeneizados de corazones pertenecientes al grupo control, y en aquellos que fueron sometidos a isquemia global por 30 minutos. Los resultados demuestran que los niveles de Mfn2 fosforilada, aumentaron significativamente en condición de isquemia (Figura 11).

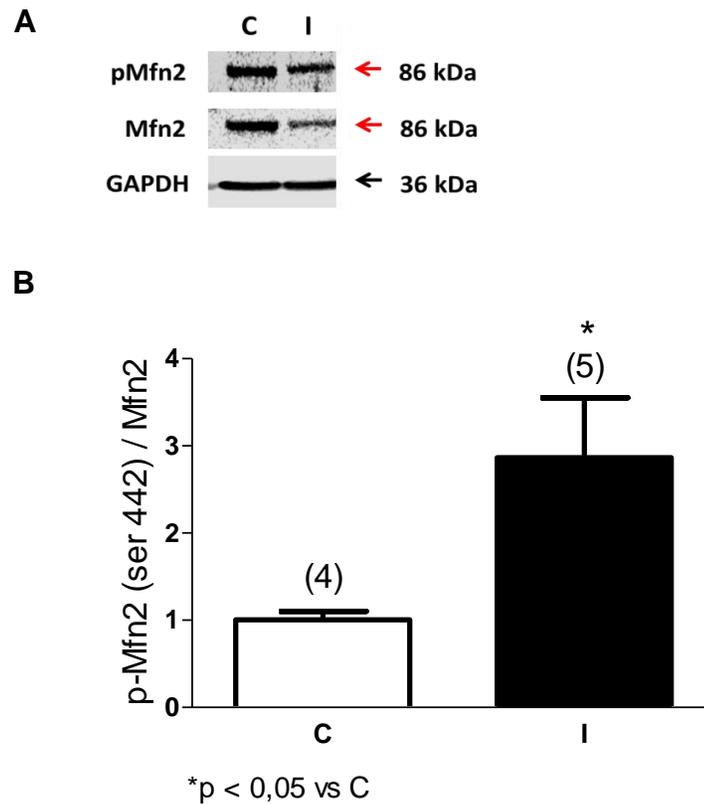


Figura 11: Aumento de la fosforilación de Mitofusina 2 en condición de isquemia.

En la imagen **(A)** se presenta: Westerns blot representativo de Mfn2 fosforilada, Mfn2 total, y el control de carga GAPDH. **(B)** Las barras representan el promedio \pm SEM del contenido de Mfn2/GAPDH de Westerns blot de homogeneizados de tejidos corazones en condición control (C), y de corazones sometidos a 30 minutos de Isquemia global (I) ; Para comparar los grupos experimentales se utilizó el análisis estadístico t de Student, * p < 0,05 vs Control. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras.

6.11 La inhibición de CAMKII y AMPK, evita la degradación de Mitofusina 2.

Para indagar sobre las posibles señales y vías moleculares que conducen a la degradación de Mfn2 durante la isquemia, se utilizaron 2 protocolos de tratamiento previo a la isquemia global de 30 minutos, en los cuales se buscó inhibir a dos quinasas que probablemente podrían aumentar su actividad durante un contexto isquémico. En el primer protocolo se utilizó KN-93, inhibidor de CAMKII, y en el segundo protocolo se utilizó Compuesto C, con la finalidad de inhibir a AMPK. En ambos protocolos se pudo apreciar la tendencia hacia una menor degradación de Mfn2 durante isquemia, aunque se requiere aumentar el número de muestras para dar validez estadística a estos hallazgos (Figura 12).

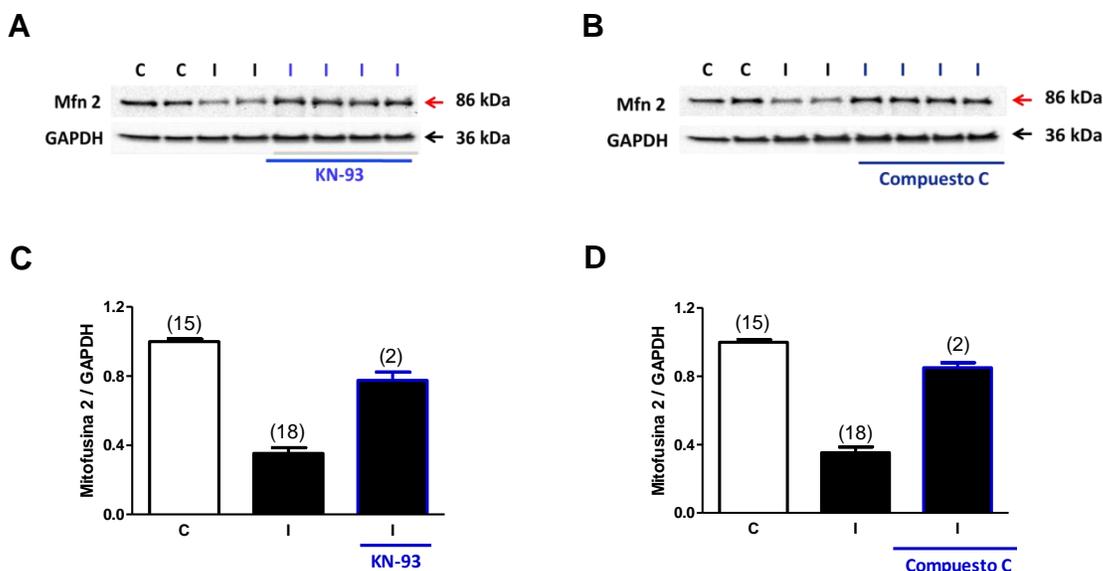


Figura 12: Efecto del inhibidor de CAMKII (KN-93) y del inhibidor de AMPK (Compuesto C), sobre los niveles de Mitofusina 2.

En la imagen (A y B) se presenta: Westerns blot representativo de Mfn2 y el control de carga GAPDH. Las barras de la figura (C) representan el promedio \pm SEM del contenido de Mfn2/GAPDH de Westerns blot de homogeneizados de tejidos corazones en condición control (C), y de corazones sometidos a 30 minutos de Isquemia global (I), con o sin uso de KN-93. Las barras de la figura (D) representan el promedio \pm SEM del contenido de Mfn2/GAPDH de Westerns blot de homogeneizados de tejidos corazones en condición control (C), y de corazones sometidos a 30 minutos de Isquemia global (I), con o sin uso de Compuesto C. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras.

7. DISCUSIÓN

En esta tesis se logró determinar que en el modelo de corazón de rata aislado, sometido a isquemia (30 minutos), y reperfusión (60 minutos), NAC es capaz de prevenir parcialmente el daño generado por isquemia, en lo referente a la recuperación funcional del ventrículo izquierdo y la disminución del tamaño final de infarto. Así también se identificó que en este modelo, NAC puede limitar el deterioro de la función mitocondrial y evitar parcialmente la disminución de los niveles de la proteína de fusión mitocondrial, Mfn2.

Los resultados también sugieren que Mfn2 sufre modificaciones *redox* durante la isquemia, asociándose mediante puentes disulfuro con la proteína de shock térmico mtHSP70, situación que es evitada con el uso del antioxidante NAC.

7.1 N-Acetilcisteína mejora la función ventricular y disminuye el tamaño de infarto en corazón aislado de rata adulta sometido a isquemia y reperfusión.

Los resultados demuestran que NAC mejora la capacidad funcional del ventrículo izquierdo y disminuye la generación de arritmias durante la reperfusión (Figura 2), y disminuye el tamaño de infarto en el corazón sometido a IR (Figura 3). Estos resultados son coherentes con los hallazgos clínicos descritos en la literatura (53), y que refuerzan el efecto cardioprotector en la modulación del sistema antioxidante, como coadyuvante en la terapéutica clínica (54).

7.2 N-Acetilcisteína evita la disminución de glutatión y el aumento de MDA que se produce durante la reperfusión.

Aunque es conocido que la presencia de EROs, puede desencadenar respuestas protectoras o deletéreas dependiendo de sus concentraciones, los resultados de esta tesis indican que el uso de un antioxidante (NAC 1 mM) previo a la isquemia global de 30 minutos, es beneficioso para la conservación de los niveles de glutatión durante la reperfusión (Figura 4A), y la disminución del daño derivado de la

lipoperoxidación en este mismo periodo (Figura 4B). Esto coincide con lo descrito en la literatura, en donde utilizando un modelo IR en músculo esquelético, NAC logró proteger al hígado de la depleción de glutatión y el aumento de MDA característicos de este fenómeno de daño (55). Además permite proponer que NAC previene el desarrollo de condiciones nocivas durante la isquemia, que lleven a un aumento del daño oxidativo durante la reperfusión, como podría ser la activación de enzimas generadoras de especies radicalarias, cuya producción se hace principalmente evidente durante la reperfusión (56).

7.3 N-Acetilcisteína reduce la disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que se genera después de 30 minutos de isquemia.

Los resultados sugieren que la administración de NAC previo a la isquemia, ejerce un efecto protector de la función mitocondrial, mediante la limitación de la caída en el consumo de oxígeno (Figura 5A), y la prevención parcial de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Figura 5B). Estos efectos protectores de NAC sobre la función mitocondrial, ya habían sido descritos y relacionados con la recuperación de los niveles de glutatión frente al daño citotóxico inducido por acroleína (43).

7.4 N-Acetilcisteína atenúa la disminución del contenido de Mitofusina 2 ocurrida en isquemia, e impide la formación de los agregados proteicos que se producen durante isquemia.

Datos no publicados de nuestro laboratorio, muestran que no solo Mfn2 disminuye por isquemia, sino que también esto ocurre Mfn1, disminución que también se ha reportado cultivos celulares, por efecto del peróxido de hidrogeno (66).

Es razonable esperar que, en concordancia con lo descrito en la literatura, la disminución del contenido de determinadas proteínas de la membrana mitocondrial externa, contribuyan a la pérdida de la función mitocondrial y el daño celular (16, 57).

Según los resultados obtenidos, esta proteína podría ser blanco de modificaciones *redox* durante la isquemia. Esta modificación en Mfn2, es evitada cuando se utiliza el antioxidante NAC previo a la isquemia, lo que podría tener relación con el efecto protector de este antioxidante en la conservación de los niveles de Mfn2, identificados también en esta tesis.

Así mismo, los resultados de esta tesis han demostrado que Mfn2, durante la isquemia, forma agregados proteicos, de aproximadamente 170 kDa, y que estos se establecen mediante puentes disulfuro, ya que se desagregan al ser tratados con un agente reductor en el tampón de carga para la electroforesis (Figura 9).

Los datos sugieren que los agregados incluyen a Mfn2 (86 kDa) y mtHSP70 (75 kDa), cuya suma de pesos moleculares coinciden con el peso final del agregado, que en ambos casos, solo se evidencia en condición de isquemia (Figura 9C). mtHSP70, es una proteína de la familia de las proteínas de shock térmico, implicada en estabilización de proteínas en estado de plegamiento parcial, y el mantenimiento de la función mitocondrial (58, 59), por lo que la formación de agregados con Mfn2 podría tener relación con el control o las alteraciones de la función mitocondrial identificadas en isquemia, e inclusive con la degradación de Mfn2, ya que aunque no está descrito que mtHSP70 tenga un rol activo en ello, sí es conocido que otro miembro de la familia de mtHSP70, conocida como HSC70, de expresión constitutiva y ubicua, colabora en la degradación de proteínas mediante la autofagia mediada por chaperonas (60), rol que en condición de isquemia, podría ser realizado por mtHSP70, que es inducida por este fenómeno (61).

Esta modificación *redox* de Mfn2, es evitada cuando se utiliza el antioxidante N-Acetilcisteína previo a la isquemia (Figura 10), lo que podría tener relación con el efecto protector de N-Acetilcisteína en la conservación de los niveles de Mitofusina 2, identificados también mediante este trabajo (Figura 8).

7.5 Mitofusina 2 aumenta su fosforilación durante la isquemia global de 30 minutos, y las quinasas CAMKII y AMPK probablemente evitan su degradación.

Se conocido el efecto del estado *redox* en la dinámica mitocondrial, donde el aumento de las EROs son las responsables de la activación de quinasas tales como PKA, PINK1, PKG o JNK, las cuales, según datos de la literatura, fosforilan a Mfn2 (30), y que esta fosforilación, en distintos aminoácidos y bajo distintas condiciones de estrés celular, desencadenan su degradación proteosomal (19, 62). A pesar de esta evidencia, no se ha estudiado el efecto que podría ocasionar tanto el estado *redox* como las fosforilaciones sobre Mfn2 durante isquemia, las que podrían eventualmente afectar su función y/o degradación. Nuestros resultados señalan que la fosforilación de Mfn2, en serina 442, aumenta significativamente durante la isquemia (Figura 11), y también sugieren que probablemente la fosforilación puede tener relación con la actividad de la proteína quinasa II dependiente de Calcio/Calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$), reconocida como CAMKII, y/o la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK), estableciendo un probable vínculo con su degradación, ya que nuestros resultados sugieren que al utilizar inhibidores de CAMKII (KN-93), o de AMPK (Compuesto C), la disminución de los niveles de la Mfn2 durante la isquemia, es menor (Figura 12).

El incluir a CAMKII y AMPK entre las posibles involucradas en las vías de señalización que pueden determinar la degradación de Mfn2, se basa en el previo conocimiento respecto a los estímulos que activan a las mencionadas serina-treonina quinasas, los cuales están presentes durante el fenómeno isquémico. Respecto a esto, es importante recordar, que CAMKII modula funciones básicas de la fisiología cardíaca, como la actividad marcapasos del nodo sinusal (63), y también es altamente dependiente de la bioquímica medioambiental del corazón, por lo que ha emergido como una proteína clave también en condiciones patológicas (64), y se ha señalado que su inhibición sería protectora frente al daño generado por IR (65). CAMKII es activada por el aumento de las concentraciones de calcio intracelular y/o de las EROs, por lo que es probable que en condición de isquemia, se vea involucrada en vías que intervengan en el daño característico de este evento. Así

también, AMPK, que responde a la carencia energética, mediante la fosforilación de distintas proteínas involucradas en las vías metabólicas, y es clave en la regulación de la homeostasis energética del cardiomiocito (66), podría estar vinculada en la degradación patológica de Mfn2 en condición de daño isquémico.

8. CONCLUSIONES

NAC disminuye el daño producido por isquemia, lo cual se ve reflejado en una menor pérdida de glutatión, menor generación de MDA, disminución del tamaño de infarto, aumento de la recuperación del desarrollo de presión, disminución del daño mitocondrial, y finalmente una disminución en la pérdida y oxidación de Mfn2.

9. REFERENCIAS

1. Departamento de Estadísticas e Información de Salud. D, SALUD MD. INDICADORES BÁSICOS DE SALUD CHILE. 2013.
2. Nazzari NC, Campos TP, Corbalan HR, Lanús ZF, Bartolucci JJ, Sanhueza CP, et al. "The impact of Chilean health reform in the management and mortality of ST elevation myocardial infarction (STEMI) in Chilean hospitals". *Revista médica de Chile*. 136(10):1231-9, 2008.
3. Vallebuona S., Dra. Pilar Vicuña P. Reporte de Vigilancia de Enfermedades No Transmisibles (ENT), Situación Epidemiológica de las ENT en Chile. 2011.
4. Jennings RB, Murry CE.; Steenbergen C, Jr. Reimer KA. "Development of cell injury in sustained acute ischemia". *Circulation*. 82(3):2-12, 1990.
5. Tullio F, Angotti C, Perrelli MG, Penna C, Pagliaro P. "Redox balance and cardioprotection". *Basic research in cardiology*. 108(6):392, 2013.
6. Yellon DM, Hausenloy DJ. "Myocardial reperfusion injury". *The New England journal of medicine*. 357(11):1121-35, 2007.
7. Yue R, Hu H, Yiu KH, Luo T, Zhou Z, Xu L, et al. "Lycopene protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction in primary neonatal mouse cardiomyocytes". *PloS one*. 7(11):50778, 2012.
8. Zhang C, Xu Z, He XR, Michael LH, Patterson C. "CHIP, a cochaperone/ubiquitin ligase that regulates protein quality control, is required for maximal cardioprotection after myocardial infarction in mice". *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 288(6):2836-42, 2005.
9. Bolli R. "Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview". *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 5(2):249-68, 1991.
10. Shen Z, Ye C, McCain K, Greenberg ML. "The Role of Cardiolipin in Cardiovascular Health". *BioMed research international*. 2015.
11. Chen YR, Zweier JL. "Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation". *Circulation research*. 114(3):524-37, 2014.
12. Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. "Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes". *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 15(10):209-19, 2009.

13. Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. "The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning". *Biochimica et biophysica acta*. 1767(8):1007-31, 2007.
14. Disatnik MH, Ferreira JC, Campos JC, Gomes KS, Dourado PM, Qi X, et al. "Acute inhibition of excessive mitochondrial fission after myocardial infarction prevents long-term cardiac dysfunction". *Journal of the American Heart Association*. 2(5):461, 2013.
15. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. "Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury". *Circulation*. 121(18):2012-22, 2010.
16. Chen H, Chomyn A, Chan DC. "Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction". *The Journal of biological chemistry*. 280(28):26185-92, 2005.
17. Dobson GP, Himmelreich U. "Heart design: free ADP scales with absolute mitochondrial and myofibrillar volumes from mouse to human". *Biochimica et biophysica acta*. 1553(3):261-7, 2002.
18. Solaini G, Harris DA. "Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion". *The Biochemical journal*. 390(2):377-94, 2005.
19. Leboucher GP, Tsai YC, Yang M, Shaw KC, Zhou M, Veenstra TD, et al. "Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis". *Molecular cell*. 47(4):547-57, 2012.
20. Hwang SJ, Kim W. "Mitochondrial dynamics in the heart as a novel therapeutic target for cardioprotection". *Chonnam medical journal*. 49(3):101-7, 2013.
21. Ni HM, Williams JA, Ding WX. "Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control". *Redox biology*. 4:6-13, 2015.
22. Chen Y, Liu Y, Dorn GW, 2nd. "Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis". *Circulation research*. 109(12):1327-31, 2011.
23. Griffiths EJ, Rutter GA. "Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells". *Biochimica et biophysica acta*. 1787(11):1324-33, 2009.
24. de Brito OM, Scorrano L. "Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria". *Nature*. 456(7222):605-10, 2008.
25. Dorn GW, 2nd, Song M, Walsh K. "Functional implications of mitofusin 2-mediated mitochondrial-SR tethering". *Journal of molecular and cellular cardiology*. 78:123-8, 2015.

26. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. "Dynamain-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells". *Molecular biology of the cell*. 12(8):2245-56, 2001.
27. Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. "Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging". *Current opinion in cell biology*. 15(6):706-16, 2003.
28. Dietrich MO, Liu ZW, Horvath TL. "Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate Agrp neuronal activity and diet-induced obesity". *Cell*. 155(1):188-99, 2013.
29. Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. "Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy". *Human molecular genetics*. 19(24):4861-70, 2010.
30. Willems PH, Rossignol R, Dieteren CE, Murphy MP, Koopman WJ. "Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics". *Cell metabolism*. 2015.
31. Azad MB, Chen Y, Gibson SB. "Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment". *Antioxidants & redox signaling*. 11(4):777-90, 2009.
32. Mari M, Colell A, Morales A, von Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. "Redox control of liver function in health and disease". *Antioxidants & redox signaling*. 12(11):1295-331, 2010.
33. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. "Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy". *Antioxidants & redox signaling*. 16(11):1295-322, 2012.
34. Rodrigo R, Prieto JC, Castillo R. "Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications". *Clinical science*. 124(1):1-15, 2013.
35. Bedard K, Krause KH. "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology". *Physiological reviews*. 87(1):245-313, 2007.
36. Becker LB, vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. "Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion". *The American journal of physiology*. 277(2):2240-6, 1999.
37. Bartz RR, Suliman HB, Piantadosi CA. "Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection". *Frontiers in physiology*. 6:291, 2015.

38. Apostolova N, Victor VM. "Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications". *Antioxidants & redox signaling*. 22(8):686-729, 2015.
39. Brigelius-Flohe R. "Commentary: oxidative stress reconsidered". *Genes & nutrition*. 4(3):161-3, 2009.
40. Deepmala, Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, et al. "Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review". *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 55:294-321, 2015.
41. Dean O, Giorlando F, Berk M. "N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action". *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*. 36(2):78-86, 2011.
42. Peng YW, Buller CL, Charpie JR. "Impact of N-acetylcysteine on neonatal cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury". *Pediatric research*. 70(1):61-6, 2011.
43. Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, Cuccovillo I, Doni M, Laragione T, et al. "Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats". *Journal of molecular and cellular cardiology*. 37(5):959-68, 2004.
44. Tanel A, Averill-Bates DA. "Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant N-acetylcysteine". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 321(1):73-83, 2007.
45. Halliwell B. "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life". *Plant physiology*. 141(2):312-22, 2006.
46. Divald A, Powell SR. "Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia". *Free radical biology & medicine*. 40(1):156-64, 2006.
47. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJ. "Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome". *The Journal of biological chemistry*. 278(1):311-8, 2003.
48. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. "Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion". *Journal of molecular and cellular cardiology*. 50(6):940-50, 2011.
49. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, et al. "Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique". *American heart journal*. 101(5):593-600, 1981.
50. Hartree EF. "Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response". *Analytical biochemistry*. 48(2):422-7, 1972.

51. Hynes J, Marroquin LD, Ogurtsov VI, Christiansen KN, Stevens GJ, Papkovsky DB, et al. "Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes". *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 92(1):186-200, 2006.
52. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, et al. "Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(9):3671-5, 1991.
53. Griffith OW. "Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine". *Analytical biochemistry*. 106(1):207-12, 1980.
54. Sochman J. "N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know?!" *Journal of the American College of Cardiology*. 39(9):1422-8, 2002.
55. Rodrigo R. "Prevention of postoperative atrial fibrillation: novel and safe strategy based on the modulation of the antioxidant system". *Frontiers in physiology*. 3:93, 2012.
56. Takhtfooladi MA, Jahanshahi G, Jahanshahi A, Sotoudeh A, Samiee Amlashi O, Allahverdi A. "Effects of N-acetylcysteine on liver remote injury after skeletal muscle ischemia reperfusion in rats". *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 25 (1):43-7, 2014.
57. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. "The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion". *Pharmacology & therapeutics*. 133(2):230-55, 2012.
58. Honda S, Aihara T, Hontani M, Okubo K, Hirose S. "Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2". *Journal of cell science*. 118(14):3153-61, 2005.
59. Wadhwa R, Taira K, Kaul SC. "An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where?". *Cell stress & chaperones*. 7(3):309-16, 2002.
60. Lee B, Ahn Y, Kang SM, Park Y, Jeon YJ, Rho JM, et al. "Stoichiometric expression of mtHsp40 and mtHsp70 modulates mitochondrial morphology and cristae structure via Opa1L cleavage". *Molecular biology of the cell*. 26(12):2156-67, 2015.
61. Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S. "HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting". *Autophagy*. 9(12):1937-54, 2013.

62. Awad H, Suntres Z, Heijmans J, Smeak D, Bergdall-Costell V, Christofi FL, et al. "Intracellular and extracellular expression of the major inducible 70kDa heat shock protein in experimental ischemia-reperfusion injury of the spinal cord". *Experimental neurology*. 212(2):275-84, 2008
63. Dasgupta A, Chen KH, Munk RB, Sasaki CY, Curtis J, Longo DL, et al. "Mechanism of Activation-Induced Downregulation of Mitofusin 2 in Human Peripheral Blood T Cells". *Journal of immunology*. 195(12):5780-6, 2015.
64. Li Y, Sirenko S, Riordon DR, Yang D, Spurgeon HA, Lakatta EG, et al. "CaMKII-dependent Phosphorylation Regulates Basal Cardiac Pacemaker Function via Modulation of Local Ca²⁺ Releases". *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2016.
65. Erickson JR. "Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart". *Frontiers in pharmacology*. 5:59, 2014.
66. Vila-Petroff M, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, et al. "CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury". *Cardiovascular research*. 73(4):689-98, 2007.
67. Bairwa SC, Parajuli N, Dyck JR. "The role of AMPK in cardiomyocyte health and survival". *Biochimica et biophysica acta*. 2016.

10. GLOSARIO

ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	: ADN mitocondrial
ADP	: Adenosín difosfato
AMPK	: Proteína quinasa activada por adenosina monofosfato
ATP	: Adenosina trifosfato
AVISA	: Años de Vida Saludable perdidos por muerte prematura y discapacidad
BSA	: Albúmina de suero bovino
CAMKII	: Kinasa dependiente de Calcio/Calmodulina
CAT	: Catalasa
DTT	: Ditionitrosol
-dP/dt	: Mínima derivada del desarrollo de presión en el tiempo
+dP/dt	: Máxima derivada del desarrollo de presión en el tiempo
Drp1	: Proteína relacionada con la Dinamina 1
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	: Ácido tetraacético del glicol de etileno
EOX	: Estrés oxidativo
ERNs	: Especies reactivas del nitrógeno
EROs	: Especies reactivas del oxígeno
Fis1	: Proteína de fisión 1
GAPDH	: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GES	: Garantías explícitas en salud
GP _x	: Glutación peroxidasa
GR	: Glutación reductasa
GSH	: Glutación reducido
GSSG	: Glutación oxidado
GST	: Glutación-S-transferasa
H ₂ O ₂	: Peróxido de hidrógeno

HEPES	: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil]-etanosulfónico
HSC70	: Proteína de choque térmico, cognado, de 70 kDa
HSP70	: Proteínas de shock térmico de 70 kDa
IAM	: Infarto agudo de miocardio
IR	: Isquemia-reperfusión
JC-1	: 5,5', 6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbo Cianuro
MDA	: Malondialdehído
Mfn1	: Mitofusina 1
Mfn2	: Mitofusina 2
Miro 1	: Mitocondrial Rho - GTPasa 1
MOPS	: Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico
mtHSP70	: Proteína de shock térmico de 70 kDa, mitocondrial
NAC	: N-acetilcisteína
NADPH	: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
NEM	: N-etilmaleimida
NOS	: Óxido nítrico sintasa
O ₂	: Oxígeno
O ₂ ^{•-}	: Anión superóxido
OPA1	: Proteína de atrofia óptica 1
PDFVI	: Presión diastólica final de ventrículo izquierdo
PDVI	: Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo
PMSF	: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	: Fluoruro de polivinilideno
SEM	: Error estándar de la media
SH	: Grupos sulfhidrilos
SOD	: Superóxido dismutasa
TBARS	: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TRIS	: Tris(hidroximetil)-aminometano
UPS	: Sistema ubiquitin-proteosoma
XO	: Xantina oxidasa
YGCS	: Gamma glutamil cisteinil sintetasa

