

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



**EFEECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD QUIMOTRIPSINA
DEL PROTEOSOMA DURANTE LA ISQUEMIA, EN LA FUNCIÓN DE
VENTRÍCULO IZQUIERDO Y ESTRUCTURA MITOCONDRIAL, EN
CORAZÓN AISLADO DE RATA**

XAVIER RICCIARDY AHUMADA CORTÉS

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN FISIOPATOLOGÍA**

Directora de Tesis

Dra. Gina Sánchez V.

Dra. Ivonne Olmedo A.

Universidad de Chile

SANTIAGO – CHILE

2017

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

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

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

XAVIER RICCIARDY AHUMADA CORTÉS

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiopatología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día Miércoles 26 de julio de 2017.

Prof. Dra. Gina Sánchez V.
Directora de Tesis

Prof. Dra. Ivonne Olmedo A.
Co-Directora de Tesis

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Dr. Emilio Herrera

Dr. Mario Chiong

Dr. Jorge Ferreira

AGRADECIMIENTOS

A mis mentoras y directoras de tesis, Gina Sánchez e Ivonne Olmedo, en este proceso formativo les agradezco enormemente y me saco el sombrero frente a ustedes. Son verdaderas mentes brillantes que me mostraron el rigor que existe detrás de esta tesis y sin ellas no hubiese descubierto la complejidad y lo enriquecedor del mundo científico.

En el laboratorio, Guillermo y Rodrigo, siempre dispuestos en cada experimento hicieron de cada día un momento más relajado con sus historias y anécdotas.

Todo este trabajo te lo dedico a ti Jesu, el amor de mi vida. Agradezco cada momento de tolerancia, comprensión y entrega que tuviste durante estos años, siempre has sido y serás el motor generador de mi ATP.

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Fisiopatología Cardíaca de la Dra. Gina Sánchez V. de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile

La realización de esta tesis contó con el apoyo y financiamiento de:

- Proyecto FONDECYT 1130407 (Dra. Gina Sánchez V.)
- Proyecto FONDECYT de Post Doctorado 3140449 (Dra. Ivonne Olmedo A.)

TABLA DE CONTENIDOS	Página
TABLA DE CONTENIDOS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Problemática global.....	3
1.2 Daño por isquemia.....	4
1.3 Daño por reperfusión.....	5
1.4 Mitocondria e isquemia.....	6
1.5 Cambios morfológicos de la mitocondria.....	8
1.6 Función diastólica durante la isquemia.....	10
1.7 Proteosoma.....	10
1.8 Inhibidores del proteosoma.....	12
1.9 Inhibidores del proteosoma durante la isquemia.....	13
2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS	
2.1 HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVO GENERAL.....	15
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Aislamiento de corazones y perfusión cardiaca.....	16
5.2 Grupos experimentales para microscopía electrónica de transmisión.....	17

5.3 Grupos experimentales para presión diastólica final de ventrículo izquierdo.....	18
5.4 Criterios de inclusión.....	18
5.5 Procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.....	18
5.6 Microscopía electrónica de transmisión.....	19
5.7 Análisis de la morfología mitocondrial.....	19
5.8 Procesamiento de los datos.....	21
5.9 Análisis estadístico.....	21
6. RESULTADOS	
6.1 Efecto del inhibidor del proteosoma MLN9708 en la función contráctil de ventrículo izquierdo.....	22
6.2 Efecto del inhibidor del proteosoma MLN9708 en la forma y tamaño de las mitocondrias.....	24
6.2.1 Área mitocondrial.....	24
6.2.2 Perímetro mitocondrial.....	25
6.2.3 Circularidad mitocondrial.....	27
6.2.4 Relación de aspecto mitocondrial.....	28
6.2.5 Redondez mitocondrial.....	30
6.2.6 Imágenes de microscopía electrónica.....	31
6.2.7 Densidad poblacional de mitocondrias por unidad de área.	33
6.2.8 Densidad electrónica de mitocondrias.....	35
7. DISCUSIÓN.....	37
8. CONCLUSIONES.....	44
9. ANEXOS.....	46
10. REFERENCIAS.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Esquema 1: Sitios de toma de muestra en tejido cardiaco de ventrículo izquierdo.....	19
Figura 1: Presión diastólica final de ventrículo izquierdo (PDFVI) en presencia y ausencia de 0,1 μ M de MLN9708.....	22
Figura 2: Presión de desarrollo de ventrículo izquierdo (PDVI) en presencia y ausencia de 0,1 μ M de MLN9708.....	23
Figura 3: Distribución de las mitocondrias por área.....	24
Figura 4: Distribución de las mitocondrias por perímetro.	26
Figura 5: Distribución de las mitocondrias por circularidad.....	28
Figura 6: Distribución de las mitocondrias por relación de aspecto.....	29
Figura 7: Distribución de las mitocondrias por redondez.....	30
Figura 8: Imágenes representativas obtenidas en TEM con magnitud x40.000 de mitocondrias vistas en cortes longitudinales de tejido cardiaco de rata adulta.....	32
Figura 9: Imágenes representativas de mitocondrias obtenidos por TEM a una magnitud x40.000 en cortes longitudinales de tejido cardiaco de rata adulta sometidos a isquemia global de 30 minutos.....	33
Figura 10: Densidad de mitocondrias por unidad de área en los grupos control, control con MLN9708, isquemia e isquemia con MLN9708.....	34
Figura 11: Imágenes representativas de la densidad de mitocondrias por unidad de área, obtenidas por TEM en cortes longitudinales de tejido cardiaco.....	35
Figura 12: Electrodensidad mitocondrial en los grupos control, control con MLN9708, isquemia e isquemia con MLN9708.....	36
Figura 13: Distribución de las mitocondrias por redondez en los grupos Control, Isquemia e Isquemia con MLN9708.....	40

Tabla1: Resumen de los resultados obtenidos en las variables de morfología mitocondrial, densidad celular de mitocondrias por unidad de área y electrodensidad.....

44

LISTADO DE ABREVIATURAS

AFAP-1:	Factor de proteasa activadora-1
ATP:	Adenosín trifosfato
Drp1:	Proteína relacionada con la dinamina tipo 1
ECV:	Enfermedades cardiovasculares
ERNs:	Especies reactivas de nitrógeno
EROs:	Especies reactivas de oxígeno
FC:	Frecuencia cardiaca
Fis1:	Proteína de fisión 1
IAM:	Infarto agudo de miocardio
ICa-L:	Canales de calcio de tipo L
IR:	Isquemia y reperfusión
KFERQ:	Código pentapéptido de la secuencia de aminoácidos Lys-Phe-Glu-Arg-Gln
OPA1:	GTPasa de atrofia óptica tipo 1
FDA:	United State Food and Drug Administration
Parkin:	Proteína de la enfermedad juvenil de Parkinson 2
PDFVI:	Presión diastólica final de ventrículo izquierdo
PDVI:	Presión diastólica de ventrículo izquierdo
PEST:	Secuencias peptídicas ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina
PINK1:	La quinasa putativa inducida por PTEN 1
TEM:	Microscopía electrónica de transmisión
RyR ₂ :	Receptor de rianodina de tipo 2
UPS:	Sistema ubiquitina-proteosoma

RESUMEN

La literatura actual refiere que durante la isquemia ocurren una serie de fenómenos que afectan la sobrevivencia del cardiomiocito. Actualmente, se desconoce si la administración pre isquémica del inhibidor del proteosoma MLN9708, en concentraciones de 0,1 μM , es capaz de preservar la morfología mitocondrial y evitar el aumento de la presión diastólica final de ventrículo izquierdo al término de una isquemia global de 30 minutos. Nuestro trabajo se llevó a cabo en un modelo de corazón aislado de rata adulta, perfundidos en un sistema de tipo Langendorff durante 110 minutos de protocolo, se registraron variables hemodinámicas (PDFVI y PDVI) con un $N = 3$ para cada grupo experimental. Se extrajeron cortes longitudinales de ventrículo izquierdo para luego ser observados bajo TEM en busca de medir las siguientes variables en mitocondrias: área, perímetro, circularidad, relación de aspecto y redondez. Además, se determinó la densidad celular de mitocondrias por unidad de área y su electrodensidad. Nuestros resultados determinaron que la perfusión pre isquémica de MLN9708 no redujo el aumento de PDFVI al final de la isquemia, pero sí la disminuyó en un 42% al final de la reperfusión, además de permitir una recuperación de la PDVI en un 34%. El aumento en la forma y tamaño de las mitocondrias observado al final de la isquemia no pudo ser disminuido con el uso de MLN9708. La densidad celular de mitocondrias intermiofibrilares (mitocondria/ μm^2) aumentó en un 52% al final de la isquemia y que en presencia de MLN9708 aumentó un 85% en comparación al control, sugiriendo un aumento de la fisión mitocondrial. Como índice de la integridad de las mitocondria, medimos su electrodensidad comparada con la de los sarcómeros. Encontramos que las mitocondrias controles fueron muy electrodensas, con la isquemia la electrodensidad disminuyó en un 40% y la perfusión pre isquémica de MLN9708 evitó parcialmente esta disminución, evidenciando un efecto protector de este inhibidor del proteosoma.

Conclusión: Los resultados sugieren que las mitocondrias fueron fragmentadas durante la isquemia, aumentando la tasa de fisión mitocondrial. La administración pre-isquémica de MLN9708 no impidió el aumento de la fisión. Sin embargo, MLN9708 protegió parcialmente la organización de la matriz mitocondrial.

ABSTRACT

The current literature reports that during the ischemia a series of phenomena that affect the survival of the cardiomyocyte occur. It is not known whether pre-ischemic administration of the protease inhibitor MLN9708 at concentrations of 0.1 μM is capable of preserving mitochondrial morphology and preventing the increase of left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) at the end of a global ischemia of 30 minutes. Our work was performed in an isolated adult rat heart model, perfused in a Langendorff system for 110 minutes of protocol, hemodynamic variables (LVDP and LVEDP) were recorded with an $N = 3$ for each experimental group. Longitudinal sections of the left ventricle were extracted to be observed under transmission electron microscopy. In mitochondria the following parameters were measured: area, perimeter, circularity, aspect ratio and roundness. The density of the mitochondria and the electron density were measured in the cells. Our results determined that preischemic infusion of MLN9708 did not reduce the increase in LVEDP at the end of ischemia, but decreased it by 42% at the end of reperfusion, in addition to allowing recovery of LVDP by 34%. The increase in mitochondrial shape and size observed at the end of ischemia could not be decreased with the use of MLN9708. The cellular density of mitochondria (mitochondria / μm^2) increased by 52% at the end of ischemia and in the presence of MLN9708 increased by 85% compared to the control, suggesting an increase in mitochondrial fission. As an index of mitochondrial integrity, we measure the relative electron density compared to sarcomere. We found that the control mitochondria were very electron dense, with ischemia the electron density decreased by 40% and the preischemic MLN9708 perfusion partially prevented this decrease, evidencing a protective effect of this proteasome inhibitor. Conclusion: The results suggest that mitochondria were fragmented during ischemia, increasing the mitochondrial fission rate. Preischemic administration of MLN9708 did not prevent the increase of fission. However, MLN9708 partially protected the organization of the mitochondrial matrix.

1. INTRODUCCIÓN

El término isquemia, referido como una deficiencia en el suministro de sangre a los tejidos debido a una obstrucción del flujo arterial, fue utilizado por primera vez a principios del siglo XIX. Desde entonces, las investigaciones biomédicas se han esforzado por comprender mejor los mecanismos de daño celular que subyacen a la isquemia, con la esperanza de desarrollar terapias que limiten los riesgos de la enfermedad y las devastadoras consecuencias socioeconómicas que derivan de estos trastornos. Los avances reportados en las últimas décadas han permitido avanzar enormemente en la comprensión molecular de los eventos producidos en la isquemia.

1.1 PROBLEMÁTICA GLOBAL

La principal causa de muerte en la población adulta chilena son las enfermedades cardiovasculares. Entre ellas, el infarto agudo de miocardio (IAM) corresponde a la primera causa de muerte, con un total de 5.895 fallecidos (tasa de 36 por 100.000 habitantes), en el año 2006 ¹. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen una de las causas más importantes de discapacidad y muerte prematura en todo el mundo, además de ser una de las principales causas de morbilidad y deterioro de la calidad de vida. El IAM, responsable del 73,6 % de las muertes nacionales asociadas a enfermedad cardiovascular, constituye un problema prioritario de salud pública debido a su gran impacto ².

La isquemia, definida como una deficiencia en el suministro de sangre a los tejidos debido a una obstrucción del flujo arterial, constituye la base de variados procesos anatomopatológicos presentes en la actualidad, incluyendo el IAM, accidente cerebrovascular trombótico, cirugía cardíaca y trasplante de órganos ³. Afortunadamente en la actualidad muchos de los episodios isquémicos pueden ser resueltos en etapas tempranas, por medio de reperfusión farmacológica o quirúrgica, con el objetivo de reducir el tamaño de infarto y la necrosis celular del

tejido isquémico ¹. La evidencia ha demostrado que una vez que el miocardio se torna severamente isquémico, la restauración del flujo sanguíneo es un prerrequisito absoluto para la recuperación miocárdica ⁴. Sin embargo, la reperfusión por si misma puede acelerar y profundizar el daño más allá de la isquemia, ya que se asocia con cambios deletéreos importantes a nivel cardiaco tales como arritmias de reperfusión, muerte del miocito y disfunción microvascular-endotelial, incluyendo el fenómeno de no reflujo ⁵, cambios que actualmente determinan la "lesión por reperfusión".

1.2 DAÑO POR ISQUEMIA

La privación de oxígeno y nutrientes durante la isquemia desencadena una serie de cambios bioquímicos y metabólicos dentro del miocardio. Durante la isquemia, uno de los principales desequilibrios iónicos que se instauran es el aumento sostenido de la concentración intracelular de Na^+ debido al fallo de la bomba Na^+/K^+ ATPasa del sarcolema, que no puede operar en ausencia de energía, y la acidificación progresiva del citoplasma por la puesta en marcha de la glucólisis anaeróbica ⁶. Esto resulta en la acumulación de lactato y reducción del pH intracelular ⁷. Para amortiguar esta acumulación de hidrogeniones, el intercambiador Na^+/H^+ extruye el exceso de protones a costa de introducir Na^+ hacia el intracelular ⁸. En respuesta, la activación en su modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ extruye Na^+ a expensas del aumento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular ⁹. Este fenómeno reduce el flujo de salida de Ca^{2+} y limita su recaptación por el retículo sarcoplasmático ¹⁰, disminuyendo progresivamente la disponibilidad de sustrato para una siguiente contracción miocárdica.

Estos cambios, junto con los que ocurren en la reperfusión, determinan la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) que disipa el potencial de membrana mitocondrial y deteriora la producción de adenosín trifosfato (ATP) ^{6,10}. En el cardiomiocito estos cambios se acompañan de activación de proteasas que dañan tanto a las miofibrillas como a aquellas que

regulan la homeostasis del Ca^{2+} y que contribuyen al aumento de la presión diastólica final de ventrículo izquierdo (PDFVI) observada durante la isquemia. Estas alteraciones y el grado de tejido comprometido varían en extensión y magnitud dependiendo de la disminución del aporte de sangre y de la duración del periodo de isquemia⁷.

1.3 DAÑO POR REPERFUSIÓN

La reenergización de las células que se encuentran en esta situación de riesgo puede precipitar un empeoramiento abrupto del control catiónico, principalmente por la puesta en marcha de mecanismos dirigidos a corregir la acidosis intracelular que perjudica aún más la sobrecarga citoplasmática de Na^+ ⁶. Además, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EROs / ERNs) durante los primeros minutos de la reperfusión serían los principales involucrados en la lesión miocárdica por reperfusión⁶.

La llegada de flujo sanguíneo produce un lavado rápido de los catabolitos (fundamentalmente H^+) al medio extracelular, causando la activación de los mecanismos de corrección de la acidosis intracelular (principalmente a través del intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática y del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$). Esta respuesta de corrección de la acidosis intracelular empeora aún más la sobrecarga citoplasmática de Na^+ que, de nuevo, es manejada por la célula activando el modo inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que produce un influjo adicional de Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} a través del modo inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es poco relevante en condiciones fisiológicas en los miocitos humanos, pero puede ser deletérea cuando la célula se encuentra sobrecargada de Na^+ ⁶.

Otros mecanismos como la activación plaquetaria, daño mediado por neutrófilos, el sistema renina angiotensina y la activación del complemento también contribuyen al daño⁵. 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 puede afectar negativamente el tejido viable a través de la liberación de enzimas proteolíticas y generación EROs / ERNs ⁷. Las alteraciones en las proteínas de membrana por radicales libres y el desequilibrio en la regulación *redox* endógena conducen a peroxidación lipídica y pérdida de la integridad de membrana (plasmática y de organelos subcelulares) resultando en necrosis y muerte celular ⁵. Como resultado de todos estos mecanismos la célula reoxigenada acumula una gran cantidad de Ca^{2+} en su interior, comprometiendo seriamente su propia supervivencia ⁶.

1.4 MITOCONDRIA E ISQUEMIA

La mitocondria pertenece al grupo de organelos subcelulares más importantes por cuanto su rol funcional y metabólico ¹¹. Además de la síntesis de ATP, las mitocondrias regulan la homeostasis de Ca^{2+} citoplasmático, ambas funciones realizadas utilizando la misma fuente de energía: la gradiente electroquímica de electrones ⁸. Este organelo está involucrado en la oxidación final de muchas fuentes de energía con formación de coenzimas reducidas, que liberan sus electrones a la cadena transportadora de la membrana mitocondrial interna. Este proceso que se asocia con la formación de ATP, también está implicado en otros procesos celulares como la producción de grandes cantidades de EROs que toman parte en la apoptosis y en muchas otras funciones ¹¹.

La mitocondria tiene una importancia predominante en la función de los cardiomiocitos, éstas representan cerca del 30% del volumen total y aportan aproximadamente el 90% de la energía celular ¹². Estos organelos representan una de las estructuras más importantes de la célula ya que son una fuente esencial de ATP para la función celular ¹¹.

Durante la isquemia las alteraciones en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) llevan a que la mitocondria secuestre grandes cantidades de este ión, lo

que disminuye su capacidad de síntesis de ATP ^{13,14}. El daño directo a los complejos proteicos de la membrana interna mitocondrial conduce a una caída en la fracción de sustratos oxidados ¹⁴, por disipación del potencial de membrana mitocondrial ¹³, perjudicando la producción de ATP. La pérdida de función mitocondrial también resulta en la acumulación de metabolitos tóxicos. La disminución en la oxidación de piruvato conduce a la producción de lactato y la acidosis observada en isquemia, la disminución en la oxidación de sustratos lipídicos bloquean la oxidación de carbohidratos, potenciando la sobrecarga de Ca^{2+} que conduce a arritmias ⁸. Este desbalance oxidativo, no sólo modifica a proteínas sino que también a lípidos de membrana ¹⁵.

Las múltiples alteraciones que sufre la mitocondria pueden desencadenar la apoptosis. Diversos estudios han demostrado que la apoptosis está precedida por cambios en la membrana mitocondrial, que resulta en una caída del gradiente electroquímico, producción de EROs y liberación de factores apoptóticos tales como citocromo-c ^{14,15}. La liberación del citocromo-c es el paso clave en la muerte celular programada. Sin embargo, su liberación podría preceder a la apertura del poro de transición de la membrana mitocondrial el que conduce a la pérdida del potencial de membrana, tumefacción de la matriz con eventual disrupción de las membranas mitocondriales y posterior liberación de citocromo-c ⁸. El citocromo-c liberado activa directamente los efectores río abajo de la muerte celular ¹⁴ formando un complejo citoplasmático con presencia del factor de proteasa activadora-1 (AFAP-1), deoxi-ATP y caspasa-9, los que desencadena la vía apoptótica intrínseca ⁸.

Cuando el daño al tejido cardíaco causado por isquemia es reversible y el miocardio conserva su viabilidad después de que se reestablece la perfusión coronaria, las reservas de ATP todavía pueden estar al margen del 60% de lo normal ¹⁶. Cuando el daño al tejido cardíaco causado por isquemia se asocia a una caída en las concentraciones de ATP por debajo del 20% de su valor normal, las células no son capaces de regenerar el ATP necesario para mantener los

gradientes iónicos fisiológicos y el volumen celular ¹⁶. La activación intracelular de Ca^{2+} y ATPasas aceleran el consumo de ATP y activan fosfolipasas en el sarcolema comprometiendo la integridad de membrana ¹⁷. Las reducciones en ATP, la hinchazón mitocondrial y el daño del sarcolema son decisivas en la muerte celular por isquemia ¹⁵.

1.5 CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA MITOCONDRIA

Estudios realizados en células diferentes a los cardiomiocitos adultos han descrito que, además de las numerosas reacciones bioquímicas esenciales en la homeostasis energética ¹⁸, las mitocondrias son organelos altamente móviles capaces de cambiar su morfología entre redes elongadas e interconectadas y arreglos fragmentados y desordenados mediante fenómenos permanentes, opuestos y balanceados de fusión y fisión mitocondrial ^{18,19} de acuerdo a las necesidades metabólicas de las células.

La fusión mitocondrial implica la participación de ciertas proteínas GTPasa tales como mitofusinas 1 y 2 (Mfn1-2) y la GTPasa de atrofia óptica tipo 1 (OPA1), que se ubican tanto en la membrana mitocondrial externa como interna respectivamente ¹⁸. Estas proteínas han demostrado regular la arquitectura de la red mitocondrial mediante la inmovilización y fusión de las membranas mitocondriales vecinas ¹⁹. Por otra parte, la fisión mitocondrial, necesaria para eliminar mitocondrias viejas y dañadas de la célula por medio de mitofagia, atribuye su importancia tras la identificación de la proteína relacionada con la dinamina tipo 1 (Drp1) y la proteína de fisión 1 (Fis1) ^{18,20}

Los estudios de mitocondrias en el cardiomiocito adulto se han centrado principalmente en evaluar el tamaño y la forma del organelo en condiciones fisiopatológicas, dada la influencia en la capacidad metabólica de la célula ¹⁸. La fragmentación de la red mitocondrial en respuesta a estímulos apoptóticos es un hallazgo observado en un gran número de tipos celulares, por lo que se ha

postulado una asociación entre la activación de la maquinaria de la fisión mitocondrial y el proceso de muerte celular dado que la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial favorece la liberación de factores proapoptóticos comprometiendo la supervivencia de las células cardíacas ²¹

Eventualmente, la isquemia y reperfusión (IR) causa una amplia gama de alteraciones funcionales y estructurales en las mitocondrias, desde el remodelamiento de las crestas, hinchazón de la matriz y cambios en membrana externa hasta las alteraciones que derivan de la apertura del poro de transición de la membrana mitocondrial (PTPM) ²². Los cambios en la morfología mitocondrial se han asociado con importantes funciones biológicas y patologías ²³. En particular, es ampliamente conocido que la hinchazón mitocondrial es uno de los indicadores más importantes de la apertura del PTPM ^{24,25}. La apertura de canales que permiten una hinchazón suficiente para romper la membrana mitocondrial externa puede causar la liberación del citocromo c, que a su vez conduce a la muerte celular ²⁶.

Además, aunque la evidencia histopatológica de lesión por reperfusión miocárdica se ha descrito en modelos animales, se ha prestado menos atención a los cambios directos en las mitocondrias cardíacas, a pesar de su papel central en el metabolismo celular. Debido a que las mitocondrias están estrechamente implicadas en el proceso de muerte celular, se han identificado como el organelo diana responsable de la lesión celular durante la isquemia y la reperfusión ²⁷⁻²⁹. Recientemente, las mitocondrias han surgido como objetivos terapéuticos para conseguir una cardioprotección frente a los efectos perjudiciales de la lesión miocárdica aguda ¹⁸, motivo por el que la cuantificación de sus cambios en la forma y tamaño será útil para evaluar el grado de lesión, así como los efectos protectores de diversos agentes terapéuticos.

1.6 FUNCIÓN DIASTÓLICA DURANTE LA ISQUEMIA

Los daños ocasionados por la isquemia también se traducen en complicaciones funcionales para el rendimiento cardiaco. La literatura establece que una función diastólica normal permite el llenado de los ventrículos sin incremento exagerado de la presión, asegurando un volumen sistólico adecuado por medio del mecanismo de Frank Starling ³⁰. La PDFVI es reflejo de la relajación y la compliancia ventricular la que traduce la relación entre las variaciones de volumen y presión dentro de la cámara ventricular ³¹. En condiciones patológicas agudas como un infarto agudo de miocardio, la isquemia puede resultar en disfunción sistólica y disfunción diastólica ³². Esta última con elevación de la PDFVI que puede ir en directa relación con el tiempo de isquemia, afectando las propiedades mecánicas vinculadas con la diástole: la relajación y la compliancia ventricular ³³. Cualquier proceso que interfiera con el desacoplamiento de los puentes cruzados de actina y miosina, que altere la remoción del Ca^{2+} citoplasmático o que produzca modificaciones en las proteínas contráctiles y sarcoméricas tiene la potencialidad de retardar la relajación ^{34,35} y en consecuencia aumentar la PDFVI, la que puede deteriorar el flujo sanguíneo miocárdico al aumentar la presión coronaria y llevar el flujo a cero ³⁶. También se ha documentado que una elevada PDFVI se asocia con mayor riesgo de isquemia subendocárdica por estrés de la pared ventricular, en sujetos sin pre existencia de enfermedad coronaria ³⁷.

1.7 PROTEOSOMA

Los proteosomas son complejos proteolíticos responsables de la degradación de más del 90% de las proteínas celulares en condiciones fisiológicas. El proteosoma 26S, compuesto por un núcleo catalítico 20S más el complejo regulador 19S, media la degradación dependiente de ATP de proteínas ubiquitinadas mientras que el proteosoma 20S, que contiene las subunidades catalíticas, degrada proteínas oxidadas independiente de ubiquitinación y de ATP. Ambos, proteosoma 20S y proteosoma 26S, coexisten en el corazón ³⁸.

El recambio proteico, como proceso fisiológico constante y necesario para el correcto desempeño de los distintos tipos celulares es también necesario para proteger a las células de la acumulación de proteínas defectuosas. En la actualidad se conocen varias señales moleculares determinantes de la tasa de recambio proteico: ubiquitinación, oxidación de determinados residuos, secuencias peptídicas ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST), cajas de destrucción de ciclinas determinados por residuos N-terminales y la presencia del pentapéptido KFERQ³⁹.

En las células eucariotas un gran número de proteínas se degradan a través de la vía UPS (sistema ubiquitina-proteosoma) la que se caracteriza por ser un sistema altamente regulado para la eliminación de proteínas mal plegadas o dañadas, teniendo un papel central en la proliferación celular, regulación transcripcional, apoptosis, inflamación, inmunidad y desarrollo⁴⁰. La ubiquitina es un péptido ubicuo que puede unirse a muchas proteínas mediante el proceso de ubiquitinación. Molecularmente el proceso por el cual la ubiquitina marca a una proteína para su degradación es un proceso dependiente de ATP, las proteínas ubiquitinadas son dirigidas hacia el proteosoma 26S para la degradación o experimentar cambios en la ubicación y/o actividad de la proteína⁴⁰.

Cada complejo regulador o subunidad 19S es capaz de reconocer a la cadena poliubiquitinada y escindir el sustrato de proteína el que es desnaturalizado o "desplegado" para luego introducirse en el núcleo catalítico 20S^{40,41}. Este núcleo corresponde a un cilindro compuesto de 4 anillos apilados, dos anillos centrales β y dos anillos externos α ⁴¹. La cámara catalítica, contiene seis actividades catalíticas, tres en cada uno de los anillos centrales β . Las actividades catalíticas del proteosoma son: actividad tipo quimotripsina situada en las subunidades β_5 , actividad de tipo tripsina localizados en las subunidades β_2 y actividad de tipo caspasa situadas en las subunidades β_1 ⁴².

1.8 INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA

Se han descrito numerosas drogas como inhibidores del proteosoma, varias de ellas con interferencia directa sobre la actividad catalítica de 20S, pudiendo ser reversibles o no sobre el centro catalítico y muestran distintos niveles de afinidad sobre el proteosoma 26S⁴². En los últimos años se han desarrollado diferentes tipos de inhibidores del proteosoma para usarlos clínicamente en el tratamiento de enfermedades oncológicas y autoinmunes⁴³. En el uso de estos en la terapia contra el cáncer, la aprobación por la FDA (*US Food and Drug Administration*) en el 2003 del inhibidor del proteosoma: Bortezomib (Velcade® (PS-341) o Kyprolis®) sentó un precedente en cuanto al uso de inhibidores del proteosoma ya que actualmente es utilizado como tratamiento de primera línea para el mieloma múltiple⁸.

Pese a esto, varios estudios han reportado una inesperada toxicidad cardíaca asociada con la administración crónica de Bortezomib (Velcade®) para el tratamiento del mieloma múltiple^{44,45}. Los problemas con la primera generación de inhibidores del proteosoma es su falta de especificidad. Sin embargo, es concebible que inhibidores de segunda generación, con efectos más selectivos, tales como ONYX-0914 o MLN9708 puedan ser de gran valor debido a su potencial antiinflamatorio⁴⁶.

MLN9708 pertenece a una segunda generación inhibidores del proteosoma que inhibe reversiblemente la actividad quimotripsina de la subunidad β_5 del complejo proteosomal 20S⁴⁷. En comparación con la primera generación, los inhibidores del proteosoma de segunda generación pueden tener un perfil farmacocinético mejorado con una mayor potencia, selectividad y menor toxicidad. MLN9708 inhibe preferentemente a la actividad de tipo quimotripsina del proteosoma (IC_{50} 3,4 nmol / L), por sobre la actividad de tipo caspasa (IC_{50} 31 nmol / L) y de tipo tripsina (IC_{50} 3500 nmol / L)⁴⁸.

1.9 INHIBICIÓN DEL PROTEOSOMA DURANTE LA ISQUEMIA

La disfunción del proteosoma en el IAM fue descrita por primera vez en el año 2001 por Bulteau et al ⁴⁹, en ratas macho *Sprague Dawley*. Se ha descrito que después de 30 minutos de isquemia regional y 60 minutos de reperfusión *in vivo* el proteosoma exhibió una disminución de las actividades quimotripsina, caspasa y tripsina junto con un aumento en las proteínas ubiquitinadas al final de la reperfusión ⁴⁹. Esta observación fue confirmada en los estudios de isquemia global realizados por Powell et al ^{50,51}, en un modelo experimental de corazón aislado de rata, quienes demostraron que la actividad del proteosoma dependiente de ATP se ve preferentemente afectada. Esto es consistente con la hipótesis de que la disfunción del proteosoma 26S puede resultar en un aumento de proteínas ubiquitinadas en el miocardio ⁵².

Los mecanismos que subyacen a la inhibición del proteosoma durante la isquemia aún no son del todo claros. Se sugiere que algunas subunidades del proteosoma pueden ser suprimidas o inactivadas por estrés oxidativo y que modificaciones de las subunidades 20S del proteosoma por la peroxidación de los lípidos resultan en la inactivación selectiva de la actividad 20S ⁵³. El pre-tratamiento de corazones aislados de rata con un análogo de la vitamina E ha demostrado conservar la función del proteosoma post isquemia ⁵⁴, mientras que el pre-tratamiento con un inhibidor del proteosoma (lactacistina) condujo a una mayor acumulación de proteínas oxidadas en el corazón post isquémico ⁵⁵. La disminución en el contenido de ATP celular que se produce durante la isquemia promueve la disociación del núcleo catalítico 20S de sus terminales reguladores asociados 26S ⁵⁵. Esto promueve la disminución de la actividad del proteosoma 26S ⁴³, pero aumenta la abundancia de proteosomas 20S que degradan activamente proteínas oxidadas, independientemente de las concentraciones de ATP ^{56,57}. El daño miocárdico por IR está asociado con un incremento en la tasa de necrosis y apoptosis ⁴³. Dado que la vía UPS degrada numerosas proteínas, incluyendo a proteínas pro-muerte y regula múltiples vías de señalización, se esperaría que la

disfunción del proteosoma durante la isquemia tuviera un impacto significativo en la función miocárdica.

Estudios previos han reportado efectos benéficos ⁵⁷⁻⁵⁹ y deletéreos ^{49,51,59} con el uso de inhibidores del proteosoma en IR miocárdica. La divergencia en los datos reportados en la literatura después de la IR puede surgir por el uso de diferentes modelos experimentales, diferentes tipos y concentraciones de inhibidores ³⁸. Actualmente son escasos los datos sobre la actividad del proteosoma 20S durante la isquemia. En este campo, el estudio de Sánchez et al ³⁸ en modelo de corazón aislado de rata adulta *Sprague Dawley* con 30 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión demostró que sólo la actividad quimotripsina del proteosoma 20S aumenta durante de la isquemia, sin encontrar cambios en las actividades caspasa y tripsina. Esto propone a la actividad quimotripsina como potencial responsable de la degradación de proteínas durante la isquemia, en especial al receptor de rianodina de tipo 2 (RyR2), pudiendo marcar el camino en la sobrevida durante la reperfusión. Además, Sánchez et al ³⁸ pudieron establecer que el uso de inhibidores de la actividad quimotripsina del proteosoma 20S, MLN9708 0,1 µM, fue capaz de disminuir tanto el tamaño de infarto como la actividad quimotripsina del proteosoma al final de la isquemia en forma selectiva.

2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

La literatura actual refiere que durante la isquemia ocurren una serie de fenómenos que afectan la sobrevivencia del cardiomiocito, desde cambios moleculares que provocan un aumento de la actividad de tipo quimotripsina del proteosoma hasta alteraciones en la morfología mitocondrial con modificaciones en la interacción de la unidad contráctil del ventrículo izquierdo que median el aumento de la presión de fin de diástole observada al final de la isquemia.

Actualmente, se desconoce si el inhibidor del proteosoma MLN9708, en concentraciones de 0,1 μM con la cual inhibe solo la actividad quimotripsina del proteosoma 20S, es capaz de preservar la morfología mitocondrial y evitar el aumento de la presión diastólica final de ventrículo izquierdo al final de una isquemia global de 30 minutos.

2.1 HIPÓTESIS

La inhibición de la actividad quimotripsina del proteosoma durante una isquemia global de 30 minutos reduce las alteraciones en la forma y tamaño de las mitocondrias (morfología) y evita el aumento de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo.

3. OBJETIVO GENERAL

Describir cuantitativamente los efectos de la inhibición de la actividad quimotripsina del proteosoma en los cambios de forma y tamaño de las mitocondrias producidos por la isquemia y analizar el efecto de la inhibición de la actividad quimotripsina del proteosoma en una variable funcional del corazón, la presión diastólica final de ventrículo izquierdo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Analizar la forma y el tamaño de las mitocondrias de tejido cardiaco proveniente de corazones controles y sometidos a isquemia global de 30 minutos en presencia y ausencia de MLN9708 en concentración de 0,1 μ M.

2- Analizar la presión diastólica final de ventrículo izquierdo en corazones sometidos a una isquemia global de 30 minutos en presencia y ausencia de MLN9708 en concentración de 0,1 μ M.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Aislamiento de corazones y perfusión cardiaca

Los experimentos se llevaron a cabo en un modelo *ex vivo* de 12 corazones de ratas macho adultas, *Sprague-Dawley* (250 - 300 g), contando con la aprobación del Comité de Ética sobre investigación en animales, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Protocolo CBA#541 FMUCH (Anexo 1).

Los animales se anestesiaron con pentobarbital intraperitoneal (0,8 μ L / Kg), luego se procedió a realizar una ventana costal anterior para exponer el corazón y se administró 0,1 mL de heparina (5000 U/mL) en la aurícula derecha. Los corazones se canularon rápidamente por la aorta ascendente y se escindieron de la caja torácica para ser montados en un sistema de perfusión de tipo Langendorff con solución tampón Krebs-Henseleit bicarbonato modificado (conteniendo en mmol / L): 128,3 NaCl; 4,7 KCl; 1,35 CaCl₂; 1,1 MgSO₄; 0,4 NaH₂PO₄; 20,2 NaHCO₃ y 11,1 glucosa equilibrado con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂, ajustado a pH de 7,4 con flujo constante (10 – 14 mL / min) por medio de una bomba de infusión peristáltica (Gilson Minipuls3, Francia), a temperatura controlada de 37 °C por un sistema de recirculación termorregulado (B. Braun Thermomix 1420, Alemania Occidental).

En el sistema Langendorff se eliminaron las aurículas del corazón y se insertó un balón de látex en el ventrículo izquierdo, conectando el balón a un transductor de presión (Puente Amp ADInstruments ML221, Australia), llenándolo con agua destilada para producir una presión de fin de diástole entre 5 - 10 mmHg, la cual se mantuvo constante durante el periodo de estabilización, 20 minutos. La frecuencia cardíaca (FC) se mantuvo entre 240 y 300 latidos por minuto durante el tiempo de estabilización por medio de un electroestimulador. En el sistema Amp ADInstrument durante todo el tiempo de protocolo experimental se registraron las siguientes variables hemodinámicas: desarrollo de presión ventricular, presión de perfusión, derivadas de contractilidad y frecuencia cardíaca.

5.2 Grupos experimentales para microscopía electrónica de transmisión (TEM)

- **Grupo control:** Corazones perfundidos con solución tampón Krebs por 50 minutos.
- **Grupo control con MLN9708:** Corazones estabilizados por 10 minutos con solución tampón Krebs, seguido de 10 minutos de perfusión con 0,1 μM de MLN9708 y luego 30 minutos de perfusión con solución tampón Krebs.
- **Grupo isquemia:** Corazones estabilizados por 20 minutos con solución tampón Krebs, seguido de 30 minutos de isquemia global.
- **Grupo isquemia con MLN9708:** Corazones estabilizados por 10 minutos con solución tampón Krebs, seguido de 10 minutos de perfusión con 0,1 μM de MLN9708 para terminar con 30 minutos de isquemia global.

5.3 Grupos experimentales para PDFVI

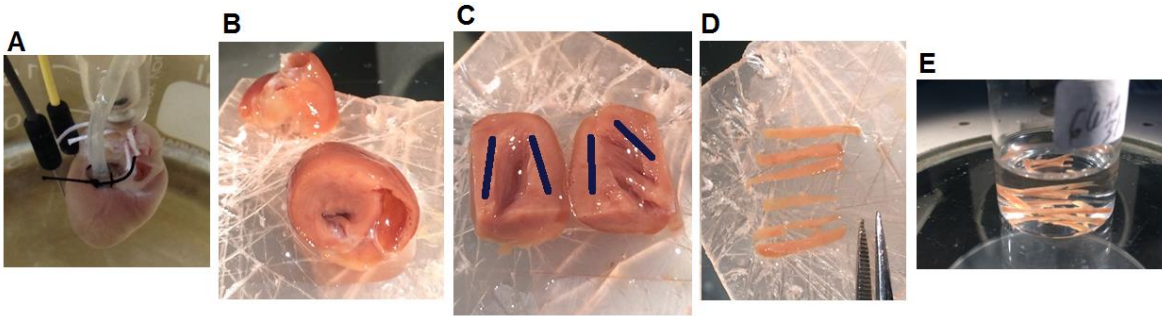
- **Grupo isquemia / reperfusión:** Corazones estabilizados por 20 minutos, seguido de 30 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión con solución tampón Krebs.
- **Grupo isquemia / reperfusión con MLN9708:** Corazones estabilizados por 10 minutos, seguido de 10 minutos de perfusión con 0,1 μ M de MLN9708, luego 30 minutos de isquemia global y 60 minutos de reperfusión con solución tampón Krebs.

5.4 Criterios de inclusión:

Se incluyeron todos aquellos corazones donde el tiempo de escisión cardiaca y montaje en el sistema de perfusión de tipo Langendorff fuera menor a 2 minutos. Además, los corazones debían tener un desarrollo de presión ventricular superior a 60 mmHg y una presión de perfusión sobre 60 mmHg.

5.5 Procesamiento de la muestra para TEM

Una vez finalizado los tiempos experimentales de cada protocolo, cada corazón fue perfundido por 30 minutos con una solución de glutaraldehído al 3% en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,3 para la fijación química de la muestra. Bajo lupa, se aisló mecánicamente el ventrículo izquierdo y sobre estos se realizaron cortes longitudinales de endocardio y / o miocardio (Esquema 1). Posteriormente estos trozos fueron embebidos en glutaraldehído 3% y procesados según “Protocolo de procesamiento de muestras biológicas para microscopía electrónica de transmisión (TEM)” desarrollado por la Sra. Marta Gacitúa Almuna de la Unidad de Microscopía Electrónica – CESAT, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Anexo 2).



Esquema 1. Sitios de toma de muestra en tejido cardiaco de ventrículo izquierdo. **A:** Corazón aislado en sistema de perfusión tipo Langendorff. **B:** Corte para exposición de las cámaras ventriculares. **C:** Corte longitudinal de ventrículo izquierdo, las líneas azules reflejan las zonas donde se tomaron muestras para microscopía electrónica. **D:** Cortes longitudinales de las paredes de ventrículo izquierdo. **E:** Cortes de cardiomiocito embebidos en solución de glutaraldehído 3% en buffer fosfato de sodio 0,1 M.

5.6 Microscopía electrónica de transmisión

Luego de obtenidas las grillas para TEM y con el objetivo de evaluar la morfología celular se utilizó un microscopio, marca FEI modelo Inspect F-50 de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Se visualizaron cortes de cardiomiocito y se obtuvieron imágenes digitalizadas (fotografías). Se analizaron en promedio 10 imágenes por corazón.

5.7 Análisis de la morfología mitocondrial

El número de mitocondrias analizadas fue:

- Grupo control: 3452 mitocondrias (N=3)
- Grupo control con MLN9708: 1749 mitocondrias (N=3)
- Grupo isquemia: 2557 mitocondrias (N=3)
- Grupo isquemia con MLN9708: 2555 mitocondrias (N=3)

Los descriptores de la morfología mitocondrial (forma y tamaño) se obtuvieron usando el programa Image J (versión 1,48V, *National Institutes of Health, USA*) trazando manualmente el contorno de todas las mitocondrias que se visualizaron con amplificación de x12.000 y x20.000.

Utilizando los criterios de Picard et al ⁶⁰ y de Kalkhoran et al ⁶¹ para el análisis morfológico de mitocondrias se midieron los siguientes variables:

- Área (μm^2)
- Perímetro (μm)
- Relación de aspecto: (eje mayor/eje menor)
- Circularidad: $(4\pi \times \text{área de superficie}) / (\text{perímetro})^2$
- Redondez: $4 \times (\text{área de superficie}) / (\pi \times \text{eje mayor}^2)$

Los valores calculados se importaron al Software Microsoft Excel y GraphPad Prism 5 para el análisis de los datos.

Para comprender los resultados del análisis de la morfología de las mitocondrias es necesario describir brevemente estos parámetros. Cabe mencionar que la información entregada por los descriptores de forma y tamaño debe analizarse en su conjunto para tener una visión global de los cambios en la morfología de las mitocondrias.

Entenderemos como:

- Área: Al tamaño de la mitocondria en μm^2 .
- Perímetro: A la suma de todas las longitudes que forman el contorno de la mitocondria.
- Relación de aspecto: Es la relación entre el largo máximo y el ancho máximo, con rangos desde 1 en adelante, siendo el valor 1 la perfecta proporcionalidad entre su largo y ancho, es decir una mitocondria completamente circular. Los valores mayores a 1 indican una menor proporción entre sus ejes, por tanto representan estructuras más alargadas.
- Circularidad: Es una medida de cercanía a un círculo perfecto y va entre los rangos de 0 a 1, donde valores de 0 se correlacionan con estructuras predominantemente longitudinales y aquellos cercanos a 1 con un círculo perfecto
- Redondez: Indica el grado de agudeza de las aristas y ángulos que la conforman. Los valores van en rango de 0 a 1, donde aquellos cercanos a 0

indican bordes extremadamente agudos y valores cercanos a 1 indican bordes circulares.

5.8 Procesamiento de los datos

Se calcularon los valores promedios de cada variable por corazón, esto correspondió al valor de un N muestral. Tamaño muestral N = 3 por grupo experimental para análisis por TEM y de N = 4 a 6 para análisis de función miocárdica.

5.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm error medio estándar (EMS). Para establecer diferencias entre dos grupos se utilizó T-test y para establecer diferencias en más de dos grupos se utilizó ANOVA de una vía seguido de Test de Tukey como post test. Se consideró significativo un $p < 0,05$

6. RESULTADOS

6.1- EFECTO DEL INHIBIDOR DEL PROTEOSOMA MLN9708 EN LA FUNCIÓN CONTRACTIL DE VENTRÍCULO IZQUIERDO

La Fig.1 muestra el registro en el tiempo de la presión diastólica final de ventrículo izquierdo (PDFVI) durante 100 minutos. Grupo control (N = 4) en negro, grupo IR (N = 6) en rojo y grupo IR con 0,1 μ M de MLN9708 administrado pre isquemia (N = 5) en azul. El registro muestra que la PDFVI ajustada entre 5 – 10 mmHg en el periodo de estabilización comenzó a subir a los 14 minutos de iniciada la isquemia (minuto 34 de protocolo), llegando a un máximo de 55 mmHg a los 20 minutos de isquemia (minuto 40 de protocolo), para luego disminuir alrededor de 15 mmHg al final de la isquemia. Al inicio de la reperfusión se produjo un aumento de la PDFVI hasta 106 mmHg para terminar en 76 mmHg al final de la reperfusión (Fig.1-A). La perfusión pre isquémica de MLN9708 no redujo el aumento de PDFVI al final de la isquemia (Fig.1-B), pero si la disminuyó en un 42% al final de la reperfusión (Fig.1-C). Estos datos sugieren que la inhibición del proteosoma antes del comienzo de la isquemia es capaz de reducir parcialmente la hipercontractura ventricular al final de la reperfusión, contribuyendo a la disminución del daño isquémico.

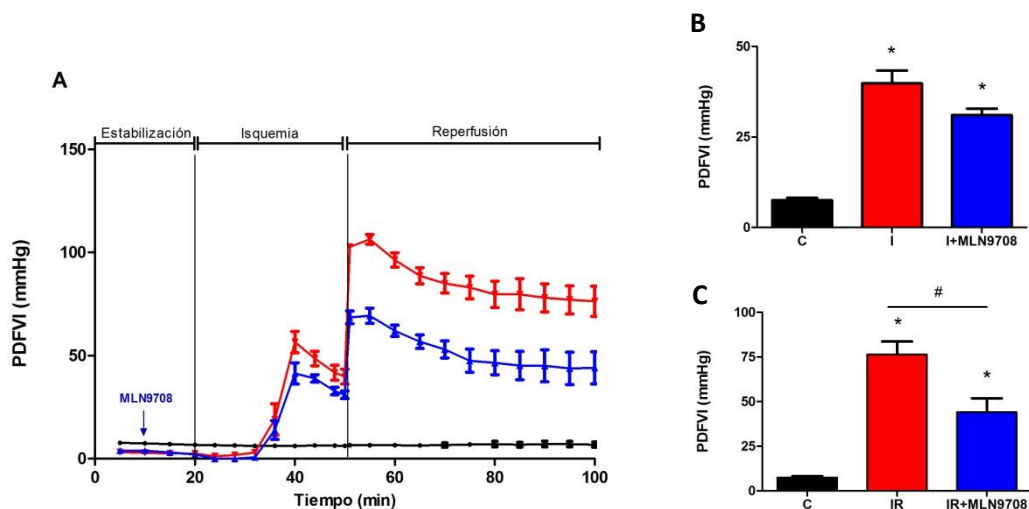


Figura 1. Presión diastólica final de ventrículo izquierdo (PDFVI) en presencia y ausencia de 0,1 μ M de MLN9708. **A:** Registro de la PDFVI durante 100 minutos: 20 minutos de estabilización con 10 minutos finales de perfusión de MLN9708, 30 minutos de isquemia y 50 minutos de reperfusión, en: **NEGRO: C**, **ROJO: IR**, en **AZUL: IR+MLN9708**. **B:** PDFVI registrada al minuto 50 de protocolo (final de la isquemia). **C:** PDFVI registrada al minuto 100 de protocolo (final de la reperfusión). Valores expresados como promedio \pm EMS. C: control, I: isquemia, IR: isquemia y reperfusión. * p < 0,05 vs C. # p < 0,05 vs IR.

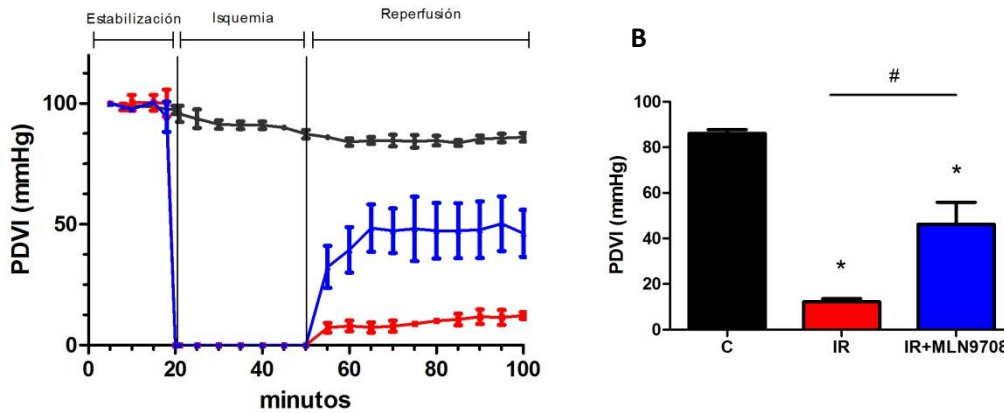


Figura 2. Presión de desarrollo de ventrículo izquierdo (PDVI) en presencia y ausencia de 0,1 μ M de MLN9708. **A:** Registro de la PDVI durante 100 minutos: 20 minutos de estabilización con 10 minutos finales de perfusión de MLN9708, 30 minutos de isquemia y 50 minutos de reperusión, en: **NEGRO: C**, **ROJO: IR**, en **AZUL: IR+MLN9708**. **B:** PDVI registrada al minuto 100 de protocolo (final de la reperusión). Valores expresados como promedio \pm EMS. C: control, IR: isquemia y reperusión. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs IR

La Fig. 2-A muestra el registro en el tiempo de la presión de desarrollo ventricular izquierdo (PDVI) durante 100 minutos de protocolo. Grupo control (N = 4) en negro, grupo IR (N = 6) en rojo y grupo IR con 0,1 μ M de MLN9708 administrado pre isquemia (N = 5) en azul. Los valores de presión de desarrollo de ventrículo izquierdo (PDVI) promediaron $90,5 \pm 6$ mmHg en los corazones controles durante los 100 minutos de protocolo. Cuando los corazones fueron sometidos a una isquemia global de 30 minutos estos desarrollaron una severa disfunción contráctil durante la restauración del flujo, alcanzando apenas $12,2 \pm 3$ mmHg de desarrollo de presión al final de la reperusión, lo que significa una disminución de un 85% en la PDVI respecto al periodo de estabilización. La perfusión de MLN9708 10 minutos antes de la isquemia produjo una mejora significativa de la PDVI al final de reperusión, atenuando la pérdida de contractilidad observada durante la IR (Fig.2-B). De esta forma el uso del inhibidor del proteosoma permitió que la caída de PDVI fuera solo de un 51% versus el 85% observado en el grupo IR sin inhibidor.

6.2- EFECTO DEL INHIBIDOR DEL PROTEOSOMA MLN9708 EN LA FORMA Y TAMAÑO DE LAS MITOCONDRIAS

Investigamos el efecto del MLN9708 en el tamaño y la forma de las mitocondrias de corazón en condiciones control e isquemia. Como índice del cambio de tamaño se utilizó el área y el perímetro mitocondrial; y para investigar la forma se utilizó circularidad, relación de aspecto y redondez.

6.2.1.- ÁREA MITOCONDRIAL

La Fig. 3-A muestra la distribución porcentual del área de la población total de mitocondrias de los cuatro grupos experimentales donde destaca que la mayor población del grupo control (70,4%) se distribuyó en un rango de área de 0,2 - 0,4 μm^2 , además la curva de distribución del grupo isquemia (en rojo) se corrió hacia la derecha respecto al control, lo que se traduce en una mayor cantidad de mitocondrias con áreas mayores al control. La Fig.3-B representa los promedios de las áreas de todas las mitocondrias en los cuatro grupos de estudio.

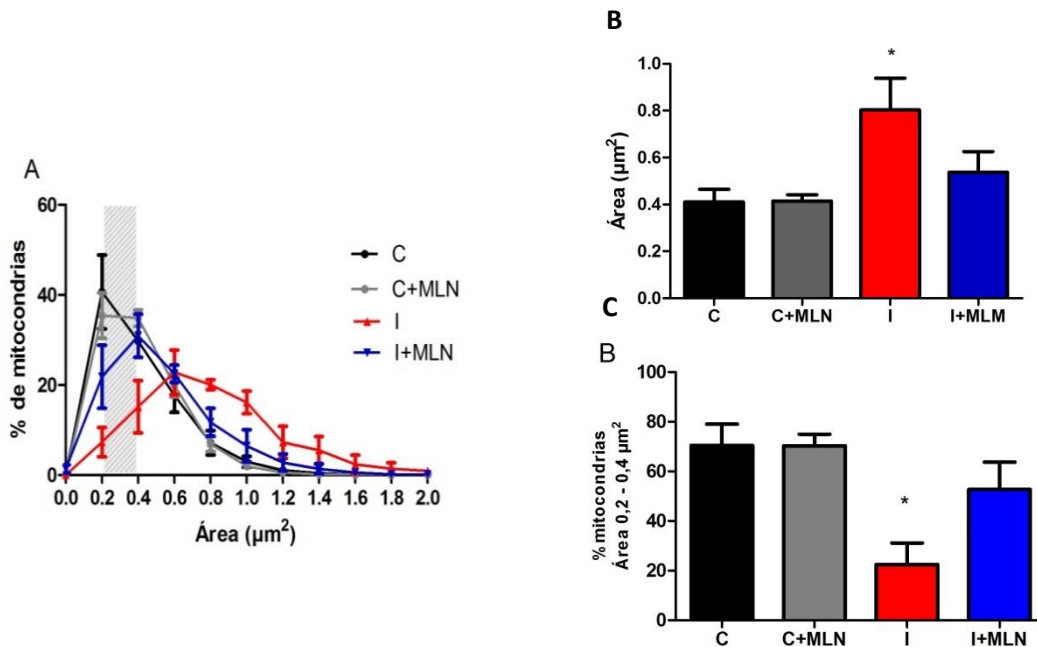


Figura 3. **A:** Distribución de las mitocondrias por área en los grupos control, control con MLN9708, isquemia e isquemia con MLN9708. **B:** Las barras representan el promedio \pm EMS del área de todas las mitocondrias. **C:** Las barras representan el promedio \pm EMS del porcentaje de mitocondrias que se encontraron en un rango de área entre 0,2 - 0,4 μm^2 . C: control, I: isquemia, MLN: MLN9708. N=3. *p < 0,05 vs C

Observamos que el área promedio de las mitocondrias control y control con MLN9708 fue de $0,41 \pm 0,23$ y $0,41 \pm 0,22 \mu\text{m}^2$ respectivamente, el área promedio del grupo isquemia fue de $0,80 \pm 0,35 \mu\text{m}^2$, diferencia significativa respecto al control ya que las mitocondrias isquémicas tuvieron un 95% más de área. El área de aquellas mitocondrias donde el inhibidor del proteosoma fue administrado antes de la isquemia fue de $0,54 \pm 0,27 \mu\text{m}^2$, es decir, 31% más área que el control y 33% menos área que las mitocondrias isquémicas. Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticas respecto al grupo isquemia y control.

La Fig. 3-C muestra el promedio del porcentaje de mitocondrias que estuvieron en un rango de área de $0,2 - 0,4 \mu\text{m}^2$, el que asumimos como un rango de mitocondrias funcionales ya que en éste se concentró la mayor población de mitocondrias del grupo control. El grupo control con el inhibidor del proteosoma reunió al 70,3% de su población en torno a un rango de área de $0,2 - 0,4 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, en los corazones sometidos a isquemia observamos que el 22,5% de las mitocondrias estuvo en el mismo rango de área de las mitocondrias control, diferencia que si fue significativa. El uso del inhibidor del proteosoma previo a la isquemia determinó que el 52,8% de la población de las mitocondrias se conservara dentro del rango de $0,2 - 0,4 \mu\text{m}^2$, es decir, cerca de un 30% más de mitocondrias que el grupo isquemia sin inhibidor. Sin embargo, no hubo diferencia respecto al control ni al grupo isquemia.

6.2.2.- PERÍMETRO MITOCONDRIAL

La Fig. 4-A muestra un histograma de la distribución porcentual del perímetro de la población total de mitocondrias de los cuatro grupos experimentales. El grupo control tuvo al 60% de su población en un rango de perímetro de $1,5 - 2,5 \mu\text{m}$. Al igual que el histograma de área (Fig.3-A), la distribución del grupo isquemia (en rojo) mostró una curva de distribución con una desviación hacia la derecha respecto al control (en gris), frente a la administración de MLN9708 previo a la isquemia observamos un menor desplazamiento hacia derecha que el grupo isquemia. El gráfico de barra de la Fig.4-B muestra los promedios de perímetro de todas las mitocondrias en los cuatro grupos en estudio. El perímetro de éstas en el

grupo control y control con MLN9708 fue similar; $2,54 \pm 0,86$ y $2,77 \pm 0,83$ μm respectivamente, mientras que el perímetro del grupo sometido a isquemia fue de $3,27 \pm 0,75$ μm , es decir, el perímetro fue un 29% mayor, hallando diferencias estadísticas respecto al grupo control. La administración de MLN9708 previo a la isquemia nos permitió observar perímetros de mitocondrias de $2,76 \pm 0,78$ μm , donde no observamos diferencias estadísticas respecto a los grupos control e isquemia. La Fig.4-C muestra el promedio del porcentaje de mitocondrias que estuvieron en el rango de perímetro del control: 1,5 - 2,5 μm .

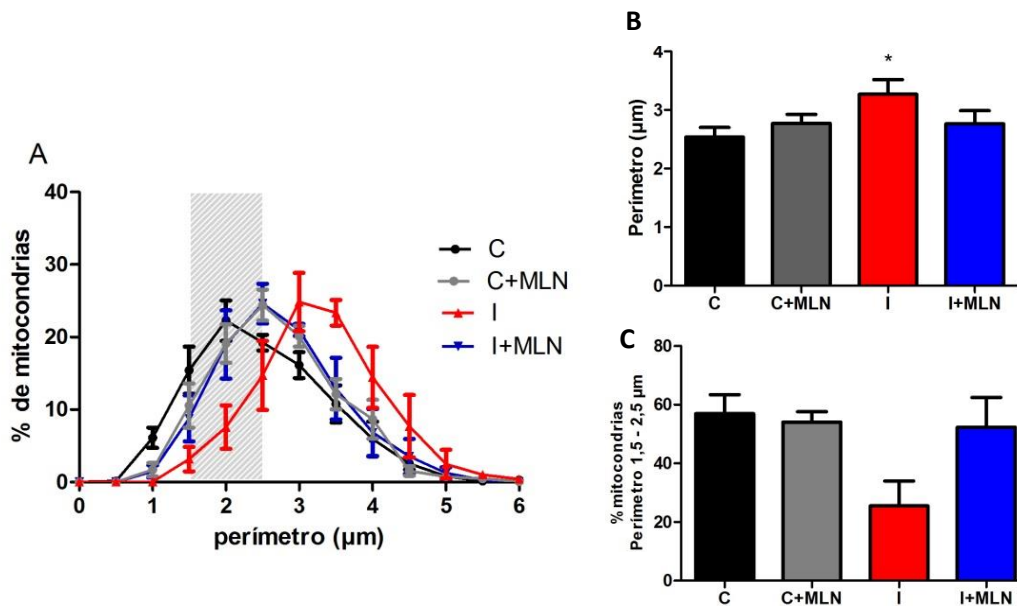


Figura 4.A: Distribución de las mitocondrias por perímetro en los grupos control, control con MLN9708, isquemia e isquemia con MLN9708. B: Las barras representan el promedio \pm EMS del perímetro de todas las mitocondrias. C: Las barras representan el promedio \pm EMS del porcentaje de mitocondrias que se encontraron en un rango de perímetro entre 1,5 – 2,5 μm C: control, I: isquemia, MLN: MLN9708. N = 3. *p < 0,05 vs C.

Como se describió anteriormente, el 60% de las mitocondrias control estuvieron en este rango, mientras que el grupo control con el inhibidor del proteosoma tuvo al 54,1% en el mismo rango. En los corazones sometidos a isquemia, solamente el 25,5% de las mitocondrias se distribuyó en el mismo rango de perímetro que el grupo control, no encontrando diferencias estadísticas. El uso del inhibidor del proteosoma previo a la isquemia determinó que el 52,4% de las mitocondrias

estuviera en el rango perímetro de 1,5 -2,5 μm , es decir, cerca de un 27% más de mitocondrias que el grupo isquemia sin inhibidor. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa al compararla con el grupo isquemia.

6.2.3.- CIRCULARIDAD MITOCONDRIAL

La Fig. 5-A muestra la distribución porcentual de la circularidad de la población total de mitocondrias de los cuatro grupos experimentales. Se aprecia que el grupo control concentró al 52% de sus mitocondrias en un rango de circularidad de 0,70 – 0,85, mientras que la distribución del grupo isquemia (en rojo) mostró una curva de distribución desviada hacia la derecha respecto al control, haciendo referencias a mitocondrias más circulares ya que sus valores bordearon una circularidad de 0,9. Durante la administración de MLN9708 previo a la isquemia observamos una menor tendencia de desplazamiento hacia derecha de la curva respecto al grupo isquemia. La Fig.5-B muestra los promedios de circularidad de todas las mitocondrias en los cuatro grupos experimentales. Observamos que el promedio de circularidad en las mitocondrias control fue de $0,74 \pm 0,15$ y de $0,67 \pm 0,17$ en el grupo control con MLN9708, en cambio la circularidad promedio de las mitocondrias sometidas a isquemia fue de $0,89 \pm 0,07$, siendo 20% más circulares lo que fue estadísticamente mayor que el control, lo que refleja mitocondrias próximas a un círculo perfecto. La circularidad promedio de las mitocondrias con MLN9708 previo a la isquemia fue de $0,83 \pm 0,12$, donde no hubo diferencias respecto a las mitocondrias sometidas a isquemia, ya que solo fueron un 7% menos circulares. La Fig.5-C muestra el promedio del porcentaje de mitocondrias que estuvieron en un rango de circularidad de 0,70 – 0,85. El 52% de las mitocondrias del grupo control y el 44,6% de las pertenecientes al grupo control con el inhibidor del proteosoma estuvieron en este rango. En el grupo isquemia observamos que el 23,6% de las mitocondrias se encontraban en el rango de circularidad de 0,70 – 0,85, lo cual fue significativamente diferente respecto al control. El uso del inhibidor del proteosoma previo a la isquemia determinó que el 37,5% de la población de mitocondrias estuviera en el rango de 0,70 -0,85, es decir, cerca de un 14% más de mitocondrias conservaron la circularidad

característica del control al compararlo con el grupo isquemia. Sin embargo, estos resultados no mostraron diferencias estadísticas respecto al grupo isquemia.

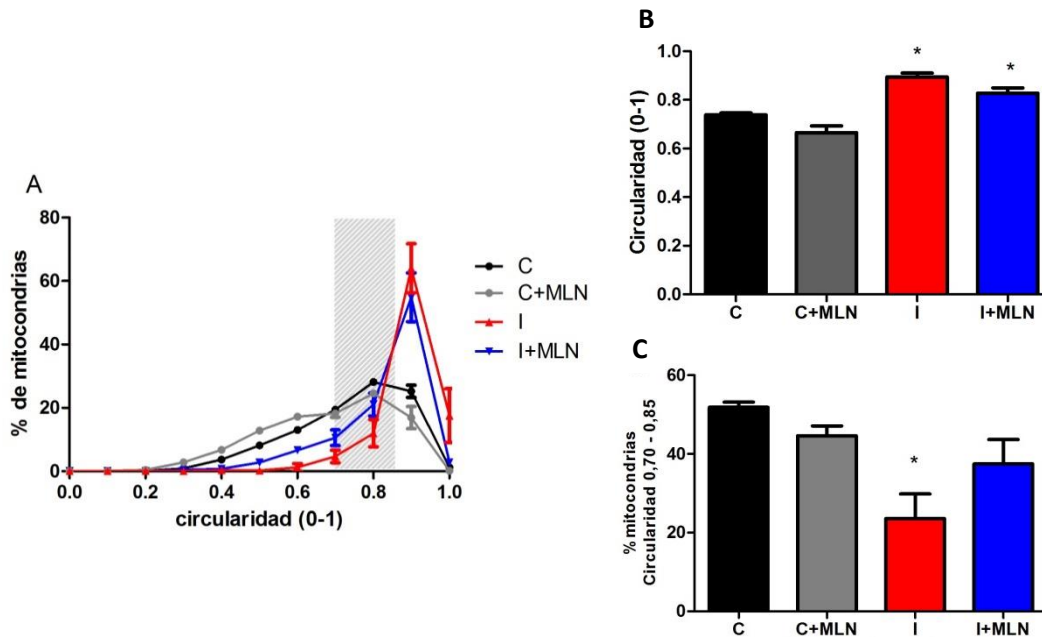


Figura 5. **A:** Distribución de las mitocondrias por circularidad en los grupos control, control con MLN9708, isquemia e isquemia con MLN9708. **B:** Las barras representan el promedio \pm EMS de la circularidad de todas las mitocondrias. **C:** Las barras representan el promedio \pm EMS del porcentaje de mitocondrias que se encontraron en un rango de circularidad entre 0,70 – 0,85. C: control, I: isquemia, MLN: MLN9708. N = 3. *p < 0,05 vs C.

6.2.4.- RELACIÓN DE ASPECTO MITOCONDRIAL

La Fig. 6-A muestra la distribución porcentual de la relación de aspecto de la población total de mitocondrias de los cuatro grupos experimentales. El grupo control mostró que la mayor población (60,3%) se concentró en un rango de relación de aspecto de 1,5 – 2,0 expresando una población de mitocondrias más oblongas que esféricas. El grupo isquemia exhibió una discreta desviación de la curva hacia la izquierda, lo que se traduce en mitocondrias más esféricas, con distancias proporcionales en su ancho y largo. Estos resultados refuerzan a los obtenidos en la Fig.5 donde la circularidad del grupo isquemia fue mayor que la población control. La Fig. 6-B expresa los promedios de la relación de aspecto de todas las mitocondrias en los cuatro grupos experimentales. El grupo control presentan una relación de aspecto $2,07 \pm 0,93$ sugiriendo mitocondrias alargadas,

comportamiento similar observado en las mitocondrias control con MLN9708, donde la relación de aspecto promedio fue de $2,42 \pm 1,18$. El grupo ischemia promedió una relación de aspecto de $1,42 \pm 0,38$ acercándose más a 1,0 lo que sugirió una mayor proporcionalidad entre ancho y largo. El grupo ischemia con MLN9708 mostró una tendencia hacia la recuperación de la forma de mitocondria promediando una relación de aspecto de $1,74 \pm 0,74$ lo que no alcanzó a ser estadísticamente significativo al compararlo con mitocondrias isquémicas.

La Fig.6-C muestra el promedio del porcentaje de mitocondrias que están en un rango de relación de aspecto de 1,5 – 2,0. Como se describió anteriormente, el 60,3% las mitocondrias del grupo control estuvo en este rango, mientras que el grupo control con el inhibidor del proteosoma tuvo al 50,1% de su población en el mismo rango del control.

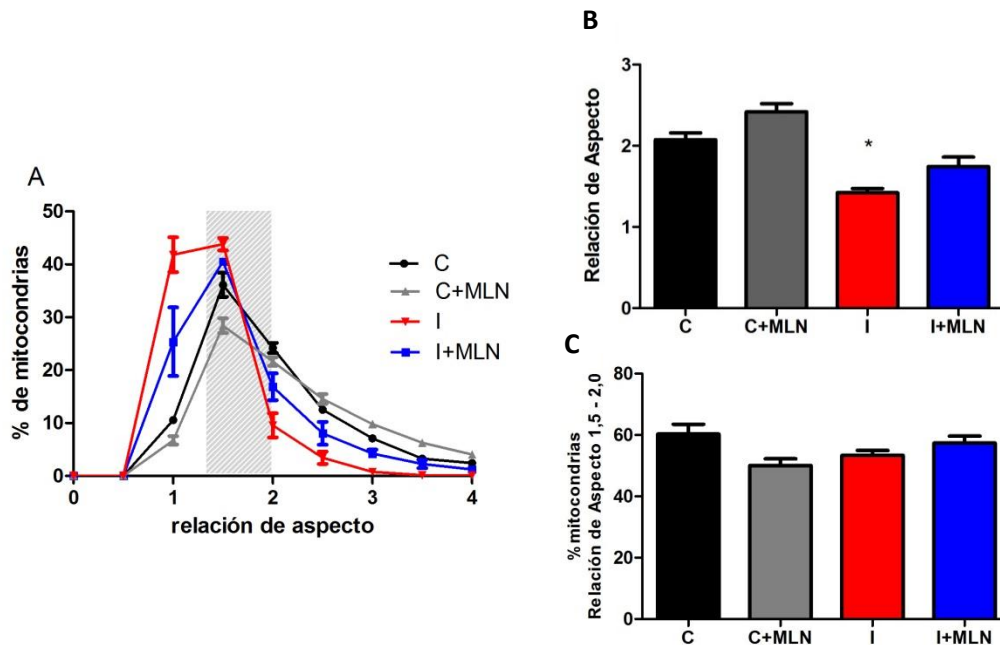


Figura 6. **A:** Distribución de las mitocondrias por relación de aspecto en los grupos control, control con MLN9708, ischemia e ischemia con MLN9708. **B:** Las barras representan el promedio \pm EMS de la relación de aspecto de todas las mitocondrias. **C:** Las barras representan el promedio \pm EMS del porcentaje de mitocondrias que se encontraron en un rango de relación de aspecto entre 1,5 – 2,5 μ m. C: control, I: ischemia, MLN: MLN9708. N = 3. *p < 0,05 vs C.

Los corazones sometidos a isquemia mostraron que el 53,4% de las mitocondrias se distribuyeron en una relación de aspecto de 1,5 – 2,0. El uso del inhibidor del proteosoma previo a la isquemia determinó que el 57,4% de la población estuviera en el rango del control, es decir, cerca de un 4% más de mitocondrias que el grupo isquemia sin inhibidor. Sin embargo, no observamos diferencias estadísticas entre los grupos.

6.2.5.- REDONDEZ MITOCONDRIAL

La Fig. 7-A muestra la distribución porcentual de la redondez de la población total de mitocondrias de los cuatro grupos experimentales. El grupo control mostró que el 52,6% de la población tuvo un rango de redondez de 0,4 – 0,6, mientras que el grupo isquemia a diferencia del control presentó un desplazamiento de la distribución hacia la derecha, lo que se sugirió mitocondrias con bordes redondos, complementando los resultados de circularidad y relación de aspecto que tributan hacia poblaciones de mitocondrias en isquemia más circulares y de bordes romos. La Fig.7-B muestra los promedios de redondez de todas las mitocondrias en los cuatro grupos experimentales.

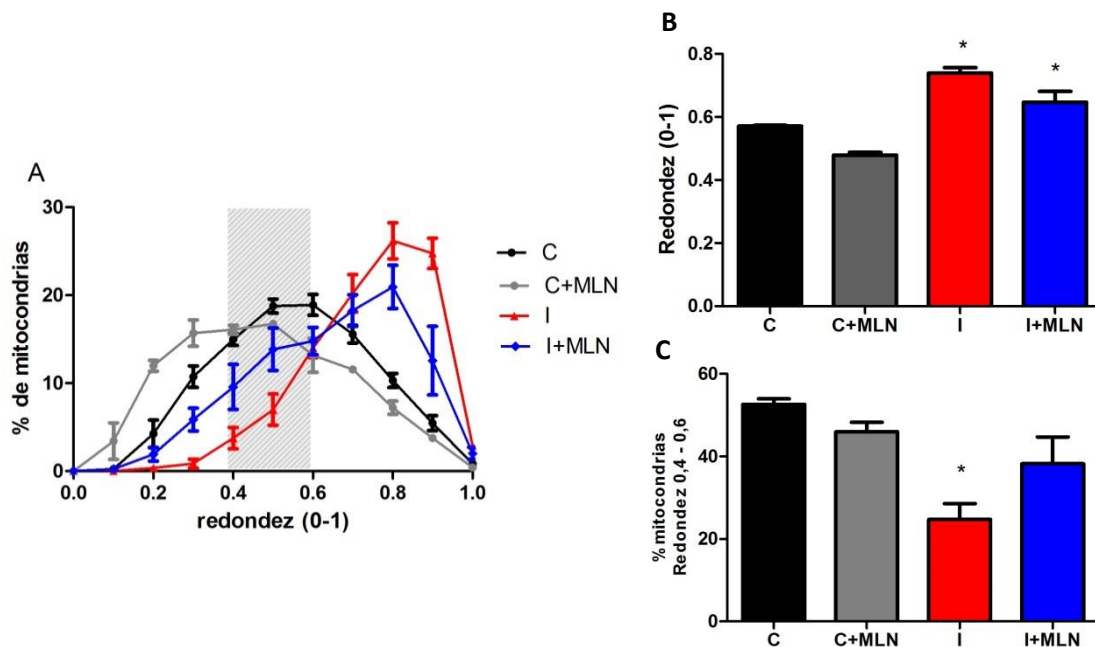


Figura 7.A: Distribución de las mitocondrias por redondez en los grupos control, control con MLN9708, isquemia e isquemia con MLN9708. B: Las barras representan el promedio \pm EMS de la redondez de todas las mitocondrias. C: Las barras representan el promedio \pm EMS del porcentaje de mitocondrias que se encontraron en un rango de redondez entre 0,4 – 0,6. C: control, I: isquemia, MLN: MLN9708. N = 3. *p < 0,05 vs C.

Las mitocondrias control y control con MLN9708 promediaron una redondez de $0,57\pm 0,23$ y $0,51\pm 0,21$ respectivamente, mientras que las mitocondrias isquémicas tuvieron una mayor redondez estadística de sus bordes: $0,74\pm 0,15$. Las mitocondrias con el inhibidor del proteosoma previo a la isquemia mostraron una redondez de $0,65\pm 0,18$ por lo que no encontramos diferencias respecto al grupo isquemia. La Fig. 7-C muestra el promedio del porcentaje de mitocondrias que están en rango del control (0,4 – 0,6). El grupo control mostró que el 52,6% de sus mitocondrias se distribuyó en este rango, mientras que el 46% de las mitocondrias del grupo control con el inhibidor del proteosoma se distribuyó de la misma manera. El grupo isquemia mostró que el 24,7% de la población de sus mitocondrias se encontraba en el rango de redondez de 0,4 – 0,6. El uso del inhibidor del proteosoma previo a la isquemia determinó que el 38,2% de la población de mitocondrias estuviera en el rango de 0,4 – 0,6, es decir, cerca de un 14% más de mitocondrias que el grupo isquemia. Sin embargo, no hubo diferencia estadística respecto el grupo isquemia.

6.2.6.- IMÁGENES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En la Fig.8-A y B se muestra una imagen representativa de TEM, correspondiente a cortes longitudinales de cardiomiocitos de rata adulta de los protocolos experimentales control y control con MLN9708. En estas imágenes se puede visualizar que el tratamiento con MLN9708 en ausencia de isquemia no modificó el tamaño ni la forma de las mitocondrias. Se observan sarcómeros y mitocondrias ordenadas, estas últimas con una forma oblonga o alargada, suficientemente compactas y electrodensas como para no poder visualizar sus crestas mitocondriales en detalle.

En cambio en la Fig.8-C, grupo isquemia, se observan sarcómeros dañados, mitocondrias hinchadas con sus membranas externas mal definidas, evidentemente dilatadas y con desorganización de las crestas. En la Fig.8-D, grupo isquemia con MLN9708, destacan sarcómeros y mitocondrias más organizadas, con una estructura menos similar al grupo isquemia y más electrodensas.

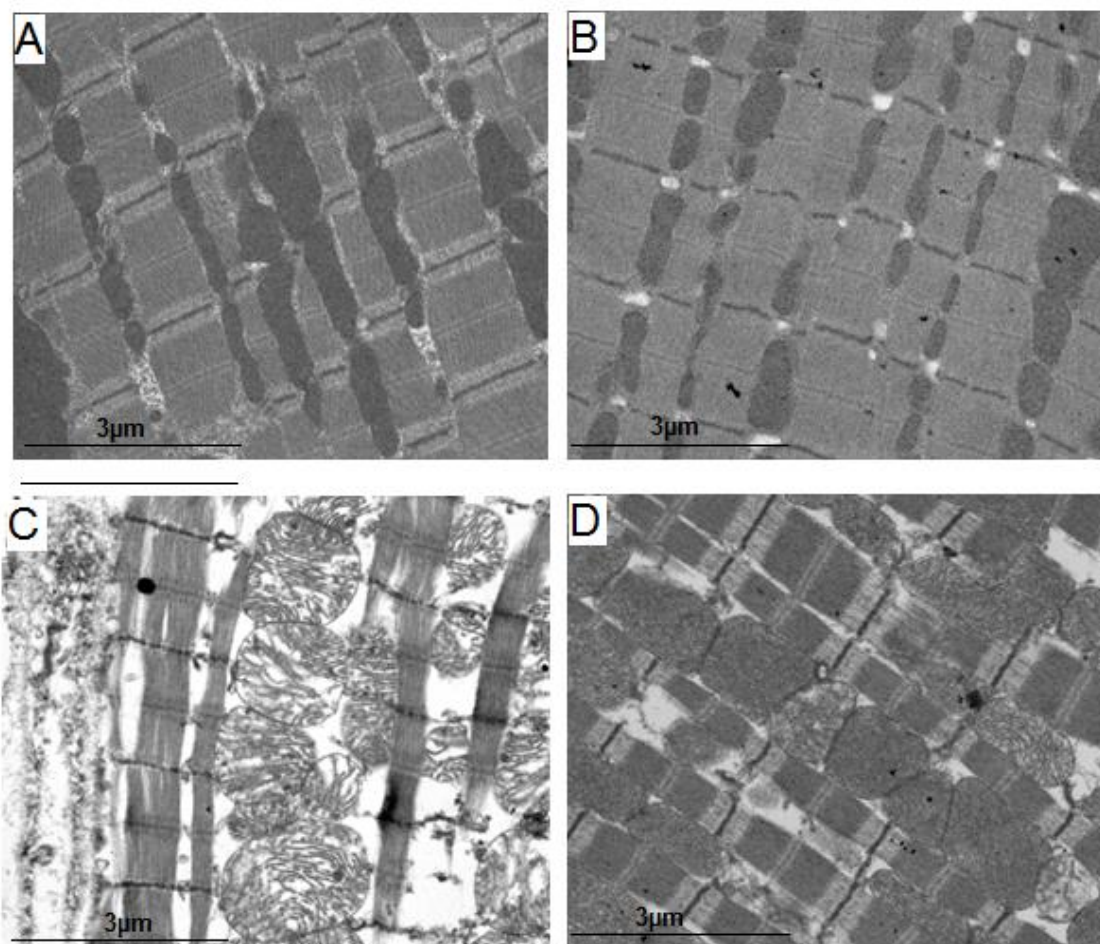


Figura 8. Imágenes representativas obtenidas en TEM con magnitud x40.000 de mitocondrias vistas en cortes longitudinales de tejido cardiaco de rata adulta. **A:** Control, **B:** Control con MLN9708, **C:** Isquemia, **D:** Isquemia con MLN9708. Barra: 3µm

Así mismo, la Fig.9 muestra mitocondrias provenientes de un corazón sometido a 30 minutos de isquemia global, en las cuales destacaron algunas observaciones importantes. En la Fig.9-A se observan dos mitocondrias adyacentes con crestas mitocondriales simétricas que podrían ser o haber sido parte de un mismo organelo. La Fig.9-B muestra a una mitocondria teniendo una aparente constricción de su parte media, que al igual que la imagen anterior presenta una amplia dilatación y desorganización en sus crestas, tumefacción de la matriz y una menor electrodensidad del organelo. Estas características nos sugirieron estar visualizando un proceso de fragmentación mitocondrial.

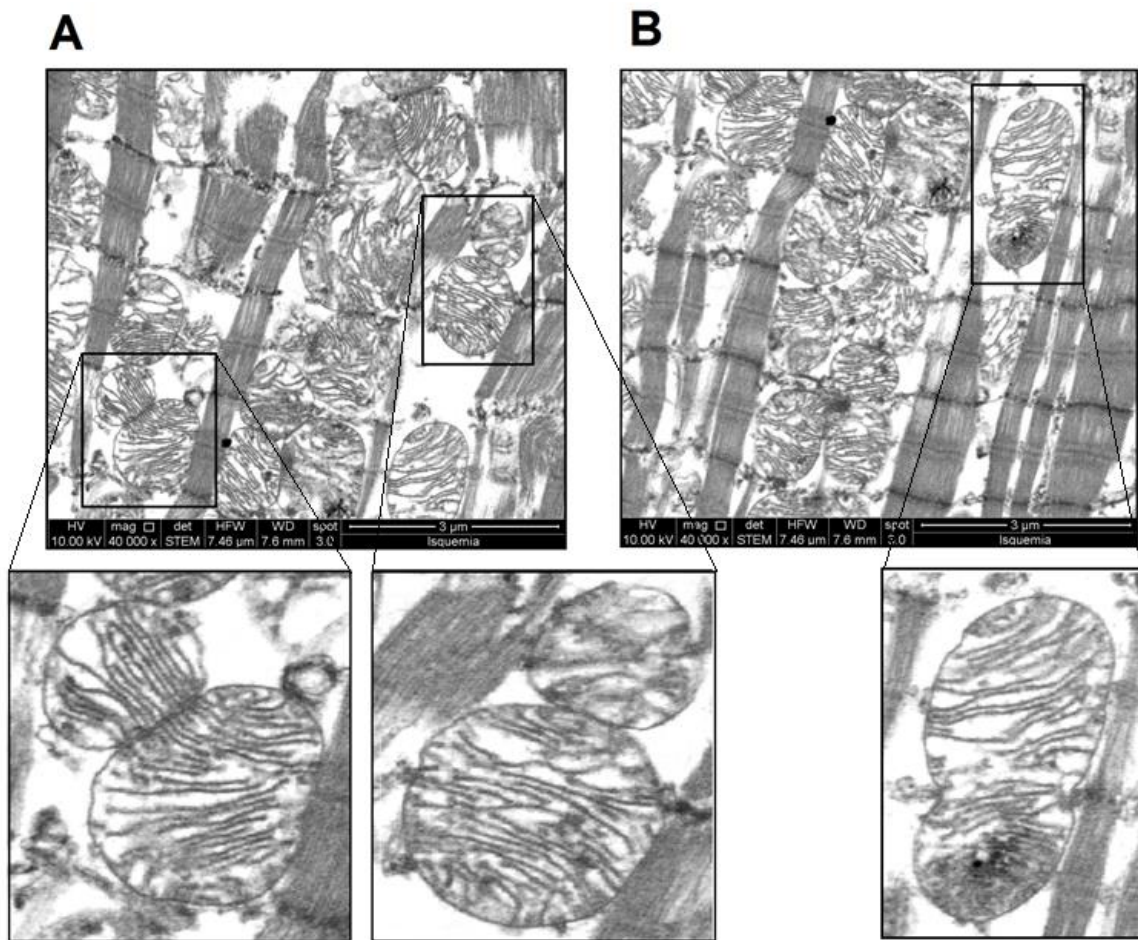


Figura 9. Imágenes representativas de mitocondrias obtenidos por TEM a una magnitud x40.000 en cortes longitudinales de tejido cardiaco de rata adulta sometidos a isquemia global de 30 minutos. **A:** Mitocondrias adyacentes con una distribución similar de sus crestas que sugieren fisión mitocondrial. **B:** Mitocondria con aparente constricción de su parte central, sugerente de fisión mitocondrial. Barra: 3 μ m

6.2.7.- DENSIDAD POBLACIONAL DE MITOCONDRIAS POR UNIDAD DE ÁREA

Con las imágenes obtenidas por TEM, se propuso determinar adicionalmente el número de mitocondrias totales por unidad de área en los cuatro grupos experimentales. El objetivo de esta medición fue determinar lo que ocurre con la densidad poblacional de las mitocondrias en el tejido cardiaco al final de la isquemia global. La Fig.10 muestra la densidad promedio de las mitocondrias intermiofibrilares presentes en cada μm^2 . La densidad mitocondrial del grupo control fue de $0,27 \pm 0,01$ mitocondrias / μm^2 , el grupo control con MLN9708 tuvo $0,26 \pm 0,01$ mitocondrias / μm^2 , el grupo isquemia mostró $0,41 \pm 0,02$ mitocondrias /

μm^2 y la densidad mitocondrial del grupo isquemia con MLN9708 fue de $0,50 \pm 0,02$ mitocondrias / μm^2 . Destaca que al final de la isquemia hubo un aumento significativo de un 52% en la cantidad de mitocondrias respecto al control y que en presencia de MLN9708 aumentó un 85%. Además, este último aumentó significativamente en un 22% el número total del mitocondrias al compararlo con el grupo isquemia. La Fig.11 muestra imágenes de TEM en los cuatro grupos experimentales donde fue posible observar las variaciones descritas en la cantidad de mitocondrias por unidad de área.

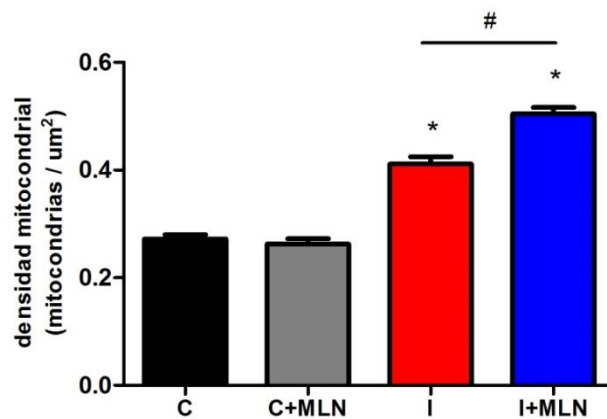


Fig.10. Densidad de mitocondrias por unidad de área en los grupos control, control con MLN9708, isquemia e isquemia con MLN9708. Las barras representan el promedio \pm EMS de la densidad de mitocondrias por unidad de área. C: control, I: isquemia, MLN: MLN9708 * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs I.

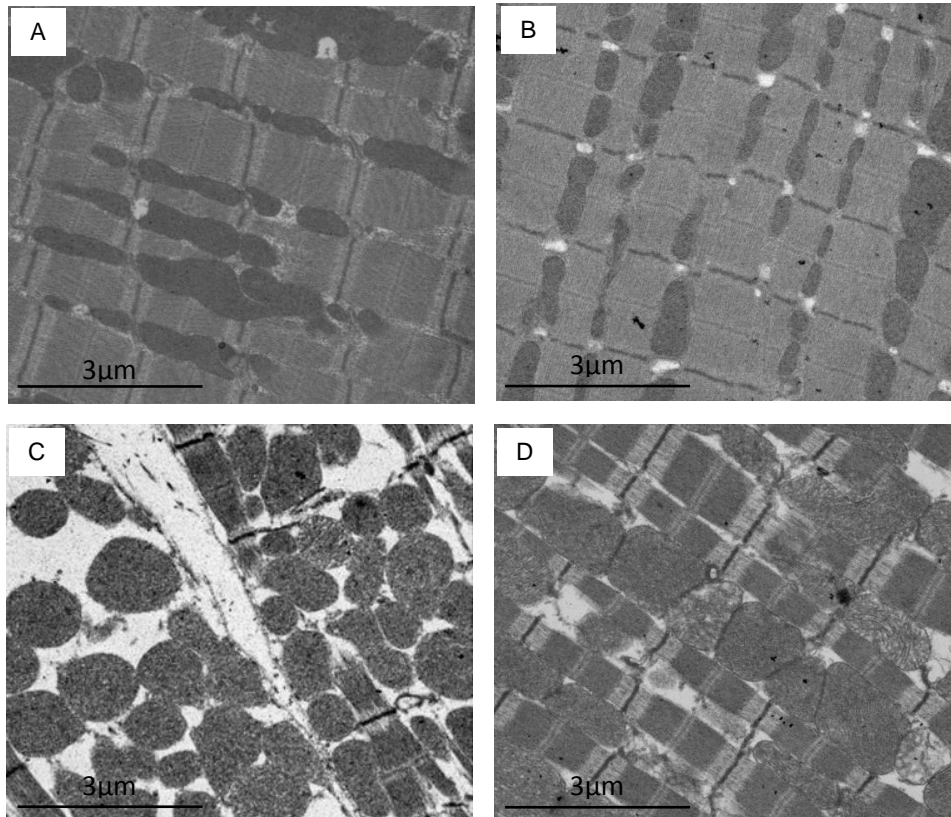


Fig.11. Imágenes representativas de la densidad de mitocondrias por unidad de área, obtenidas por TEM en cortes longitudinales de tejido cardíaco. **A:** control. **B:** control con MLN9708. **C:** isquemia. **D:** isquemia con MLN9708. Barra: 3µm

6.2.8.- DENSIDAD ELECTRÓNICA DE MITOCONDRIAS

Las imágenes de microscopía electrónica de las muestras de tejido en corazones controles, mostraron mitocondrias más electrodensas que las miofibrillas. Esta electrodensidad disminuyó cuando el tejido fue sometido a isquemia. Se observaron mitocondrias más esféricas, con crestas más separadas y bien definidas. Decidimos cuantificar la densidad electrónica y tomamos como referencia la el sector más claro de los sarcómeros (zona I), los resultados se muestran en la Fig.12.

Nuestros datos muestran que los grupos control con y sin el inhibidor del proteosoma tuvieron densidades electrónicas similares; $1,38 \pm 0,30$ y $1,23 \pm 0,01$ respectivamente, estos valores se traducen en que las mitocondrias de ambos grupos fueron más electrodensas que sus sarcómeros adyacentes. Por el

contrario, en mitocondrias isquémicas la densidad electrónica fue de $0,78 \pm 0,07$ lo que significó una disminución de la electrodensidad de un 40%; el uso de MLN9708 previo a la isquemia evitó parcialmente esta disminución ($0,99 \pm 0,09$).

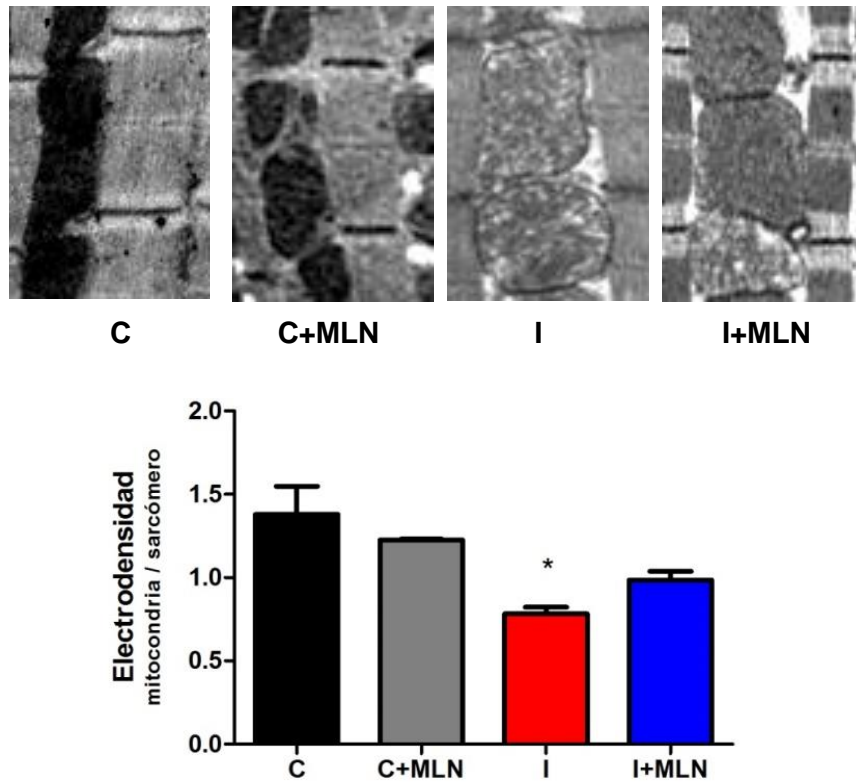


Fig.12. Electrodensidad mitocondrial en los grupos control, control con MLN9708, isquemia e isquemia con MLN9708. Las barras representan el promedio \pm EMS de la electrodensidad. C: control, I: isquemia, MLN: MLN9708. N=3. * $p < 0,05$ vs C

7. DISCUSIÓN

Los cambios en la presión diastólica final que se producen por efecto de la isquemia a nivel miocárdico están ampliamente documentados en la literatura ^{6,38,62}. Los mecanismos que conducen a la hipercontractura masiva de los cardiomiocitos han sido objeto de una intensa investigación y uno de los primeros causantes del daño isquémico es el desequilibrio iónico que se instaura cuando cesa el flujo sanguíneo. El aumento sostenido de la concentración intracelular de Na^+ , la acidificación progresiva del citoplasma y la pérdida progresiva del control de Ca^{2+} intracelular, pueden activar proteasas capaces de degradar proteínas involucradas en la homeostasis del Ca^{2+} , empeorando la situación. La reperfusión de las células que se encuentran en esta situación de riesgo puede precipitar en un empeoramiento abrupto del control catiónico, contribuyendo aún más a la sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} , comprometiendo seriamente la supervivencia del corazón ⁶.

Estudios recientes de nuestro laboratorio y publicados por Sánchez et al. 2016 ³⁸ han demostrado que solo la actividad quimotripsina del proteosoma aumenta durante la isquemia, y que el uso de MLN9708 en concentraciones de 0,1 μM evita de forma selectiva este aumento de actividad. También señalan que usando la misma concentración del inhibidor del proteosoma se evitó la degradación de canal de calcio del retículo sarcoplasmático (RyR_2), quien tiene un rol fundamental en el control del Ca^{2+} citoplasmático. Además, se redujo significativamente el tamaño de infarto desde un 40% del volumen ventricular frente a una isquemia global de 30 minutos a casi la mitad ($24 \pm 6\%$). De esta forma la inhibición del proteosoma sugiere tener un efecto cardioprotector al evitar la degradación de proteínas reguladoras del Ca^{2+} (RyR_2) intracelular y con ello reducir el impacto de la IR en la función cardiaca.

En nuestro modelo, evidenciamos la hipercontractura del ventrículo izquierdo usando la presión de fin de diástole (PDFVI) en presencia y ausencia de nuestro

inhibidor, MLN9708. Nuestros resultados señalan que la PDFVI no presentó diferencias significativas cuando fue medida al final de la isquemia, por lo que a pesar de que MLN9708 es capaz de evitar la degradación de algunas proteínas, como RyR₂, no protege al cardiomiocito de la hipercontractura al final de la isquemia.

Durante la reperfusión, los corazones mostraron una PDFVI 38% menor cuando fueron perfundidos con MLN9708 0,1 μ M previo a la isquemia. El hecho de que MLN9708 haya disminuido la hipercontractura del ventrículo izquierdo solo durante la reperfusión, y no al final de la isquemia, sugiere que el inhibidor del proteosoma ejerce su efecto cardioprotector evitando la degradación de otras proteínas reguladoras de calcio y/o proteínas estructurales importantes para la contractilidad durante este periodo. Aun no tenemos claridad de qué proteínas podrían estar sufriendo las modificaciones oxidativas en donde MLN9708 interviene para atenuar el daño contráctil del ventrículo izquierdo.

Durante la isquemia, la hipoxia reduce drásticamente los niveles de ATP, perjudicando seriamente la homeostasis de gradientes iónicos fisiológicos, el volumen celular y la separación mecánica del complejo actina-miosina, alterando el equilibrio de la relación miocárdica lo que contribuye al incremento de la tensión diastólica^{16,63}. Otra condición que podría explicar la hipercontractura al final de la isquemia y que al parecer no estuvo bajo el control MLN9708, es un aumento en la rigidez de la proteína titina provocado por la isquemia. Esta proteína se extiende por el sarcómero desde el disco Z hasta la línea M y funciona como un resorte molecular bidireccional, responsable del retroceso elástico precoz y de la distensibilidad tardía cuando los sarcómeros están alargados durante la diástole^{64,65}. Estudios han mostrado que una titina más rígida, por cambios conformacionales durante la isquemia, se relaciona directamente con el aumento de la rigidez de los cardiomiocitos con disfunción diastólica^{66,67}.

El estudio de la forma y tamaño de las mitocondrias como descriptores de la morfología, podrían permitir el estudio del efecto cardioprotector del uso de MLN9708. La literatura describe valores de área mitocondrial de $0,51^{61}$ y $0,31 \mu\text{m}^2^{65}$, en modelos similares a los nuestros, obtenidos por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Nuestros datos en ratas controles promediaron un área de $0,41 \pm 0,23 \mu\text{m}^2$, lo cual concuerda con la literatura, al igual que las otras variables estudiadas.

Los datos publicados en morfología mitocondrial en cardiomiocitos al final de la isquemia son escasos, la mayoría describe los efectos después de isquemia y reperfusión. Recientemente Kalkhoran et al., 2017⁶¹ describieron los efectos de una isquemia de 30 minutos en la morfología de las mitocondrias, analizando las mismas variables de forma y tamaño que utilizamos en nuestro modelo, pero en ratón. En este sentido, obtuvimos resultados coincidentes en cuanto a un cambio de forma de las mitocondrias isquémicas expresando un fenotipo más circular, de bordes redondos y con distancias proporcionales entre su ancho y largo máximo (relación de aspecto). Sin embargo, nuestro datos indicarían además mitocondrias más grandes por cuanto observamos un aumento de área y perímetro, condición que no fue descrita en el estudio de Kalkhoran et al.

El aumento de volumen mitocondrial se relaciona con una importante alteración de la permeabilidad de sus membranas, generando gran tumefacción o hinchazón que separa y desorganiza las crestas mitocondriales, dañando la cadena transportadora de electrones y con ello disminuyendo la fracción de sustratos oxidados por disipación del potencial de membrana, perjudicando la producción de ATP.

Resultados de nuestro laboratorio, expresados en la Figura 13, mostraron que tras una isquemia global de 30 minutos ocurre una reducción significativa del potencial de membrana y consumo de oxígeno mitocondrial, además de una gran liberación de citocromo c. Estos eventos sugieren fuertemente que el organelo, en estas condiciones, pierde su capacidad intrínseca como motor generador de ATP y por

lo tanto cesan las funciones metabólicas dependientes de él. Con la administración de MLN9708 en concentraciones de 0,1 μ M se pudo suprimir la liberación de citocromo c y atenuar la caída en el potencial de membrana y consumo de oxígeno, escenario que resulta favorable para la funcionalidad del organelo.

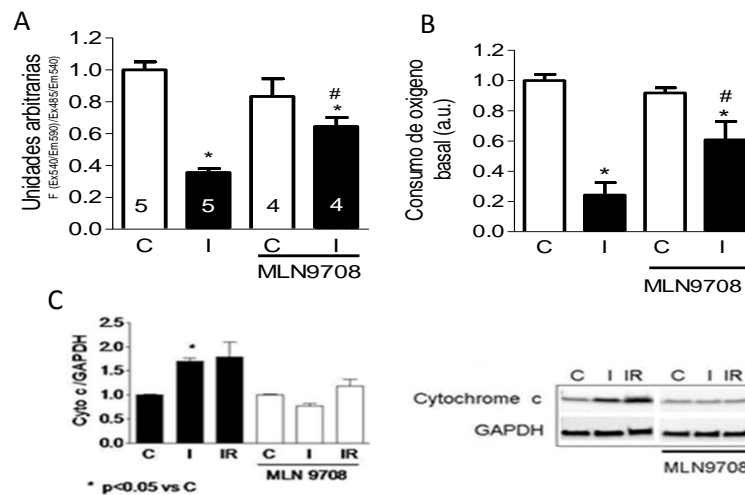


Fig.13. Efecto del inhibidor del proteosoma MLN9708 el metabolismo mitocondrial. **A:** Potencial de membrana mitocondrial. **B:** Consumo de oxígeno mitocondrial. **C:** Liberación de citocromo c. C: control, I: isquemia, IR: isquemia y reperfusión. Valores expresados en promedio \pm EMS. * p < 0,05 vs control # p < 0,05 vs isquemia sin tratamiento. DATOS NO PUBLICADOS

Algunos estudios destacan que no todas las mitocondrias presentan las mismas alteraciones morfológicas y que los cambios en los diferentes subtipos de mitocondrias cardiacas pudiesen estar influenciados por su ubicación regional^{60,68}. Las diferencias estructurales y metabólicas entre los subtipos de mitocondrias parecen mediar la respuesta tanto al insulto isquémico como a las estrategias cardioprotectoras realizadas⁶¹. Se ha descrito que la inducción de una isquemia global en corazones de conejo puede obstaculizar la fosforilación oxidativa de mitocondrias subsarcolemales mientras que las mitocondrias intermiofibrilares parecen no verse afectadas⁶⁹. También se ha descrito que las mitocondrias subsarcolemales de ratas macho exhiben una menor fosforilación oxidativa y una reducción de la oxidación de NADH después de una IR y que sólo las mitocondrias perinucleares muestran una hinchazón significativa después de la isquemia^{70,71}.

Estos datos indicarían la importancia de la morfología y las propiedades únicas de los distintos subtipos de mitocondrias en la función de las células.

La premisa de que el estado morfológico de las mitocondrias dentro de las células está directamente relacionado con su función ^{72,73} pareciera tener sentido considerando que la isquemia induce en los miocitos ventriculares una desregulación del manejo del Ca^{2+} intracelular y una disipación del potencial de membrana mitocondrial, pudiendo aumentar la permeabilidad de sus membranas, teniendo como consecuencia mitocondrias más grandes y esféricas. Por lo tanto, es de suponer que dichos cambios en forma y tamaño pudiesen estar relacionados con cambios en la dinámica y funcionalidad de las mitocondrias.

En nuestro modelo, al final de la isquemia fue posible encontrar mitocondrias más grandes y esféricas, con una menor funcionalidad por cuanto disminuye su potencial de membrana y consumo de oxígeno, además de aumentar la liberación de citocromo c. Con el uso del inhibidor del proteosoma pese a poder atenuar el detrimento funcional generado por la isquemia no fue posible observar cambios significativos en forma y tamaño, probablemente por el reducido tamaño muestral (N=3), es posible que la morfología de la mitocondria no esté reflejando cabalmente el debacle bioquímico que precede a la muerte celular.

Para responder a esta interrogante sobre morfología y función mitocondrial, nos planteamos registrar la densidad electrónica de las imágenes obtenidas en TEM. La densidad electrónica de una estructura observada en TEM depende de varios factores, los principales son; del grosor de la muestra, de la calidad de la fijación, de la presencia de artefactos como precipitados y de las propiedades del haz de electrones que llegan a la muestra. Una imagen será más electrodensa cuanto más sea el grado de dispersión de los electrones incidentes en la muestra, lo que está directamente relacionado con mitocondrias más compactas y funcionales. Nuestros datos en mitocondrias isquémicas expresaron una menor densidad electrónica, al ser menos densas y llenas agua por la tumefacción y aumento en la

permeabilidad de sus membranas, lo que se relaciona directamente con los datos del laboratorio respecto a metabolismo mitocondrial.

Resulta interesante determinar si el aumento de tamaño y forma de las mitocondrias en isquemia corresponde a una tumefacción o hinchazón del organelo, o a un proceso de fusión de mitocondrias adyacentes. En nuestro modelo observamos un aumento en el número de mitocondrias intermiofibrilares por μm^2 al final de la isquemia (Fig.10-11), lo que sugiere una mayor densidad poblacional por fragmentación o fisión mitocondrial, hallazgo documentado en varios estudios ⁷⁴⁻⁷⁵. Lo particular, fue que en aquellos corazones tratados con MLN9708 0,1 μM observamos un aumento significativamente mayor en el número de mitocondrias por unidad de área comparado tanto con el grupo control como con el grupo isquemia sin tratamiento, sugiriendo que la inhibición del proteosoma podría estar promoviendo la fragmentación de mitocondrias. En este sentido, con nuestros datos podríamos afirmar que los cambios en forma y tamaño observados al final de la isquemia corresponderían a una tumefacción del organelo, asociado además a una fragmentación mitocondrial.

Desconocemos cuales serian los mecanismos por los que el inhibidor del proteosoma estaría potenciando la fragmentación mitocondrial. Sin embargo, y en base a resultados obtenidos en nuestro laboratorio sobre mejoras importantes en la funcionalidad, es posible que este inhibidor proteja a las mitocondrias desde la vereda metabólica-funcional, prueba de esto sería la recuperación de la función contráctil del ventrículo izquierdo. Estos resultados no tuvieron un reflejo en los cambios morfológicos del organelo.

Es ampliamente sabido que los mecanismos encargados del control de calidad de proteínas dañadas durante la isquemia son básicamente la vía autofágica y la vía UPS ⁷⁷, cuando en isquemia la actividad global del proteosoma disminuye y sólo aumenta su actividad quimotripsina ³⁸ las proteínas ubiquitinadas superan la capacidad de degradación del proteosoma y la autofagia se activa, funcionando para eliminar parcialmente el exceso de proteínas ubiquitinadas citotóxicas. El

aumento de la fisión de los organelos da lugar a numerosos organelos más cortos y no conectados, comúnmente denominados "mitocondrias fragmentadas" ⁷⁶⁻⁷⁷. Además, se acepta generalmente que el aumento de la conectividad mitocondrial producido por una mayor tasa de fusión o menor fisión representa una condición más fisiológica y que una menor conectividad o fragmentación provocada por el aumento de la fisión o alteración de la fusión es una condición patológica. En otras palabras, la fusión mitocondrial es 'buena', pero la fisión mitocondrial es 'mala'. La idea de que las mitocondrias fragmentadas son perjudiciales probablemente derive de observaciones donde las redes de mitocondrias experimentan una disolución mediada por fisión durante la apoptosis, relacionando el proceso de fisión mitocondrial con la muerte celular programada ⁷⁸. En consonancia con esta idea, la inhibición de la fisión podría proteger contra lesiones cardíacas después de un daño isquémico ⁷⁹⁻⁸¹.

La evidencia recabada sugiere que la proposición de que la fusión mitocondrial es 'buena' y la fisión es 'mala' es una simplificación excesiva y que la muerte celular vinculada a la fisión mitocondrial es contextual. En apoyo a esta idea, las mitocondrias normales de los cardiomiocitos adultos están intrínsecamente fragmentadas en comparación con otras células, es decir, son típicamente pequeñas (relación de aspecto ~ 1,5) y no conectadas en redes ⁸⁶. Pese a ello, son altamente eficientes para el desarrollo de la función cardíaca normal.

Nuestro análisis lo llevamos a cabo en microscopía electrónica de transmisión. Sin embargo, ya que la técnica utiliza un perfil seccionado en 2D de un corte aislado de tejido cardíaco, ésta no permite apreciar el volumen ni la tridimensionalidad del organelo, características importantes para hablar de densidad poblacional. La mayoría de los estudios ^{18,83-85} que describen densidad poblacional mitocondrial lo hacen en cultivos celulares por medio de microscopía confocal en combinación con marcadores fluorescentes específicos de membrana que permiten realizar un análisis tridimensional de cuantificación y análisis volumétrico de la densidad del organelo. Sin embargo, en la Fig.9 fue posible observar en isquemia a mitocondrias con una amplia dilatación de sus crestas y pobre electrodensidad

teniendo una aparente constricción de su parte media. Características que sugieren estar frente a la fragmentación de la mitocondria.

Por lo tanto, en nuestro modelo al final de la isquemia fue posible encontrar mitocondrias más grandes y esféricas, con una mayor densidad poblacional por unidad de área y con menor electrodensidad y funcionalidad según datos del laboratorio. Estos cambios en lo microscópico se relacionan bastante bien con una pérdida importante de la funcionalidad contráctil del ventrículo.

Con el uso del inhibidor del proteosoma si bien fue posible atenuar el detrimento funcional generado por la isquemia (Fig.13) no fue posible observar cambios significativos en la morfología, la densidad poblacional y en la electrodensidad mitocondrial. Sin embargo, fue posible atenuar la disfunción contráctil observada al final de la reperfusión, motivo por el creemos que la cardioprotección mediada por MLN9708 no está relacionada con proteínas que determinen aspectos morfológicos de la mitocondria. De esta forma, es posible que las características morfológicas no reflejen cabalmente el debacle bioquímico que ocurre al interior del organelo y que precede a la disfunción ventricular y muerte celular.

En la tabla siguiente (Tabla 1) se resumen los resultados obtenidos para los distintos parámetros, en los distintos grupos experimentales.

	Control	Control + MLN9708	Isquemia	Isquemia + MLN9708
Área (μm^2)	0,41 \pm 0,23	0,41 \pm 0,22	0,80 \pm 0,35*	0,54 \pm 0,27
Perímetro (μm)	2,54 \pm 0,86	2,77 \pm 0,83	3,27 \pm 0,75*	2,76 \pm 0,78
Circularidad	0,74 \pm 0,15	0,67 \pm 0,17	0,89 \pm 0,07*	0,83 \pm 0,12*
Relación de aspecto	2,07 \pm 0,93	2,42 \pm 1,18	1,42 \pm 0,38*	1,74 \pm 0,74
Redondez	0,57 \pm 0,23	0,51 \pm 0,21	0,74 \pm 0,15*	0,65 \pm 0,18*
Densidad celular de mitocondrias intermiofibrilares (mitocondria/ μm^2)	0,27 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01	0,41 \pm 0,02*	0,50 \pm 0,02*#
Electrodensidad (mitocondria/sarcómero)	1,38 \pm 0,30	1,23 \pm 0,01	0,78 \pm 0,07*	0,99 \pm 0,09

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en las variables de morfología mitocondrial: tamaño (área y perímetro) y forma (circularidad, relación de aspecto y redondez). Densidad celular de mitocondrias y Electrodensidad para los cuatro grupos experimentales. Resultados expresados como promedio \pm desviación estándar. * p < 0,05 vs grupo control; # p < 0,05 vs grupo isquemia

8. CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que las mitocondrias se fragmentaron durante la isquemia, aumentando la tasa de fisión mitocondrial. La administración pre isquémica de MLN9708 no evitó el aumento de la fisión. Sin embargo, MLN9708 protegió parcialmente la organización de la matriz mitocondrial, el empaquetamiento de las crestas mitocondriales, esto se evidenció en la menor pérdida de la electrodensidad de las mitocondrias en las imágenes obtenidas por TEM. Además, MLN9708 protegió parcialmente de la disfunción contráctil de ventrículo izquierdo observado solo al final de la reperfusión.

9. ANEXO 1



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

CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *“Effect of proteasome inhibition on the content of mitofusins 1 and 2 and the preservation of mitochondrial function following cardiac ischemia-reperfusion”* cuya investigadora responsable es la **Dra. Gina Sánchez Vergara**, no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA#541 FMUCH).

La Dra. Sánchez se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT Regular 2013.

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO”(www.med.uchile.cl/normas/indice.html) después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

Presidente

Santiago, 20 de Agosto de 2012.

ANEXO 2

Prof. Marta Gacitúa Almuna
Unidad de Microscopía Electrónica - CESAT
Universidad de Chile

1. Fijación en Glutaraldehido 3% en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,3.
2. Lavados 3 X 10 minutos en buffer fosfato de sodio.
3. Post fijación en tetróxido de osmio 1% por 1 hora a temperatura ambiente (17°C).
4. Lavados 3 X 10 minutos en buffer fosfato de sodio.
5. Deshidratación en alcoholes (etanol) graduados: 30% – 50% – 70% – 90% – 96% por 7 minutos cada uno, 2 x 100% etanol y 2 cambios en acetona pro análisis 10 minutos cada uno.
- 6 .Impregnación Epon 812: Acetona 1:1 3h
3:1 8h
Epon solo 8h
7. Inclusión en Epon
8. Polimerización por 48 horas a 70 °C.
9. Realización de cortes de 1 µm teñidos con azul de toluidina 1% en borato de sodio 1% para localizar área de corte fino. Ultramicrótomo Sorvall Porter Blum.
10. Cortes finos de 600 A° recogidos en grillas de cobre de 200 mesh, teñidos con tinción doble de acetato de uranilo y plomo.
11. Observación en TEM.

10. REFERENCIAS

1. MINSAL. *Guía clínica infarto agudo de Miocardio con supradesnivel del segmento ST.*; 2010.
<http://web.minsal.cl/portal/url/item/72213ed52c3323d1e04001011f011398.pdf>.
Accessed January 15, 2015.
2. Bustos P, Amigo H, et al. Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes. *Revista Médica de Chile*. 2003;131(9):973-980.
3. Singh JP, Larson MG, et al. Heritability of heart rate variability: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1999;99(17):2251-2254.
4. García-Dorado D. Myocardial reperfusion injury: A new view. *Cardiovascular Research*. 2004;61(3):363-364.
5. Moens AL, Claeys MJ, et al. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International Journal Cardiology*. 2005;100(2):179-190.
6. Ruiz-Meana M, García-Dorado D. Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperfusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. *Revista Española de Cardiología*. 2009;62(2):199-209.
7. Hausenloy D, Yellon D. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *Journal Clinical Investigation*. 2013;123(1):92-100.
8. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, et. al. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *Journal Molecular Cell Cardiology*. 2001;33(6):1065-1089.
9. Beard T, Carrie D, et al. Production of oxygen free radicals in myocardial infarction treated by thrombolysis. Analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase

- and malondialdehyde. *Archives des maladies du coeur et des vaisseau*. 1994;87(10):1289-1296.
10. Kalogeris T, Baines CP, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2012;298:229-317.
 11. Gvozdjáková A. *Mitochondrial Medicine: Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy*, 2008.
 12. Carvajal K, Moreno-Sánchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arches of Medical Research*. 2003;34(2):89-99.
 13. Murphy E, Steenbergen C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology*. 2008;23(2):115-123.
 14. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical Journal*. 1999;341:233-249.
 15. Monteiro P., Oliveira P. GL& P. Mitocôndrias: que papel na isquémia, reperfusão e morte celular? *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2013;22(2):233-254.
 16. Ganz PBE. *Ischemia, coronary blood flow and myocardial*. W.B: Braun; 1997.
 17. Sedlis SP, Corr PB, et al. Lysophosphatidyl choline potentiates Ca^{2+} accumulation in rat cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*. 1983;244(1):H32-8.
 18. Kuzmicic J, Del Campo A, López-Crisosto C, et al. Dinámica mitocondrial: un potencial nuevo blanco terapéutico para la insuficiencia cardiaca. *Revista Española de Cardiología*. 2011;64(10):916-923.
 19. Parra V, Verdejo H, et al. The complex interplay between mitochondrial dynamics and cardiac metabolism. In: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. Vol 43.; 2011:47-51.

20. Zorzano A, Segalés J, et al. Dinámica mitocondrial y sus implicaciones en la desregulación metabólica y en la neurodegeneración. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2012.
21. Paiva, M.A., Carreira, R., et al. Impact of acute ischemia-reperfusion on myocardial mitochondrial function in an ex-vivo model of global myocardial ischemia. *Revista Portuguesa de Cardiología*. 2005;24(11):1381-1392.
22. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. *Cardiovascular Research*. 2006;70(2):191-199.
23. Wilson JD, Bigelow CE, et al. Scattering from intact cells reports oxidative-stress-induced mitochondrial swelling. *Biophysical Journal*. 88:2929-2938.
24. Halestrap AP, Clarke SJ, et al. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2007;1767(8):1007-1031.
25. Panov A V., Lund S, et al. Ca²⁺ induced permeability transition in human lymphoblastoid cell mitochondria from normal and Huntington's disease individuals. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005;269(1):143-152.
26. Green, D.R., Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281(5381):1309-1312.
27. Hausenloy DJ, Maddock HL, et al. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovascular Research*. 2002;55(3):534-543.
28. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circulation Research*. 2004;94(4):420-432.
29. Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: A target for myocardial protection. *Pharmacology and Therapeutics*. 2001;89(1):29-46.

30. Oh J, Seward J TJ. *Assessment of diastolic function. The Echo Manual*. 2a ed. Philadelphia-New York, USA: Lippincott-Raven; 1998.
31. Mielniczuk LM, Lamas GA, et al. Left ventricular end-diastolic pressure and risk of subsequent heart failure in patients following an acute myocardial infarction. *Congestive heart failure*. 2007;13(4):209-214.
32. Du L-J, Dong P-S, et al. Association between left ventricular end-diastolic pressure and coronary artery disease as well as its extent and severity. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(10):18673-18680.
33. De la Serna F. *Insuficiencia Cardíaca Crónica*. 3a ed. (Federación Argentina de Cardiología, ed.); 2010. http://www.fac.org.ar/edicion/inscac/cap09_2010.pdf. Accessed March 5, 2017.
34. Kass DA, Bronzwaer JGF, Paulus WJ. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure?. *Circulation Research*. 2004;94(12):1533-1542.
35. Westfall M V., Borton AR, et al. Calcium sensitivity and cardiac disease: Insights from troponin I isoforms and mutants. *Circulation Research*. 2002;91(6):525-531.
36. Van Herck PL, Carlier SG, et al. Coronary microvascular dysfunction after myocardial infarction: increased coronary zero flow pressure both in the infarcted and in the remote myocardium is mainly related to left ventricular filling pressure. *Heart*. 2007;93(10):1231-1237.
37. Elhabyan AK, Reyes BJ, et al. Subendocardial ischemia without coronary artery disease: is elevated left ventricular end diastolic pressure the culprit? *Current Medical Research and Opinion*. 2004;20(5):773-777.

38. Sanchez G, Berrios D, et al. Activation of chymotrypsin-like activity of the proteasome during ischemia induces myocardial dysfunction and death. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161068.
39. Hoppel CL, Tandler B, et al. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009;41(10):1949-1956.
40. Cell Signaling Technology. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins. <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research/ubiquitin-and-ubiquitin-like-proteins/science-pathways-ubiquitin>. Accessed January 24, 2015.
41. Daniele T, Hurbain I, et al. Mitochondria and melanosomes establish physical contacts modulated by Mfn2 and involved in organelle biogenesis. *Current Biology*. 2014;24(4):393-403.
42. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology*. 2001;8:739-758.
43. Yu X, Kem DC. Proteasome inhibition during myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 2010;85(2):312-320.
44. Voortman J, Giaccone G. Severe reversible cardiac failure after bortezomib treatment combined with chemotherapy in a non-small cell lung cancer patient: a case report. *BMC Cancer*. 2006;6:129.
45. Hacıhanefioglu A, Tarkun P, Gonullu E. Acute severe cardiac failure in a myeloma patient due to proteasome inhibitor bortezomib. *International Journal of Hematology*. 2008;88(2):219-222.
46. Powell SR, Herrmann J, et al. The ubiquitin–proteasome system and cardiovascular disease. *Progress in molecular biology and translational science*. 2012;109: 295-346

47. Appel A. Drugs: More shots on target. *Nature*. 2011;480(7377):S40-S42.
48. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, et al. Evaluation of the proteasome inhibitor mln9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Research*. 70(5):1970-1980.
49. Bulteau AL, Lundberg KC, et al. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(32):30057-30063.
50. Powell SR, Davies KJA, Divald A. Optimal determination of heart tissue 26S-proteasome activity requires maximal stimulating ATP concentrations. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007;42(1):265-269.
51. Powell SR, Wang P, et al. Oxidized and ubiquitinated proteins may predict recovery of postischemic cardiac function: essential role of the proteasome. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(5-6):538-546.
52. Calise J, Powell SR. The ubiquitin proteasome system and myocardial ischemia. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2013;304(3):H337-49.
53. Divald A, Powell SR. Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;40(1):156-164.
54. Das S, Powell SR, et al. Cardioprotection with palm tocotrienol: antioxidant activity of tocotrienol is linked with its ability to stabilize proteasomes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(1):H361-7.
55. Asai A, Tanahashi N, et al. Selective proteasomal dysfunction in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. 2002;22(6):705-710.

56. Höhn TJA, Grune T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III-Redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biology*. 2014;2(1):388-394.
57. Campbell B, Adams J, et al. Cardioprotective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 1999;31(2):467-476.
58. Pye J, Ardeshirpour F, et al. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Heart Circulation Physiology*. 2003;284:H919-H926.
59. Divald A, Kivity S, et al. Myocardial ischemic preconditioning preserves postischemic function of the 26S proteasome through diminished oxidative damage to 19S regulatory particle subunits. *Circulation Research*. 2010;106(12):1829-1838.
60. Picard M, White K, et al. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *Journal of Applied Physiology*. 2013;114(2):161-171.
61. Kalkhoran SB, Munro P, et al. Unique morphological characteristics of mitochondrial subtypes in the heart: the effect of ischemia and ischemic preconditioning. *Discovery Journals* 2017;5(1).
62. Lee JA, Allen DG. mechanisms of acute ischemic contractile failure of the heart role of intracellular calcium. *The American Society for Clinical Investigation*. 1991;88:361-367.
63. Nayler W. P-WP & WA. Hypoxia and calcium. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 1979;11(7):683-706.
64. Hamdani N, Paulus WJ. Myocardial titin and collagen in cardiac diastolic dysfunction: Partners in crime. *Circulation*. 2013;128(1):5-8.

65. Hutchinson KR, Saripalli C, et al. Increased myocardial stiffness due to cardiac titin isoform switching in a mouse model of volume overload limits eccentric remodeling. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 2015;79:104-114.
66. Borbély A, Falcao-Pires I, et al. Hypophosphorylation of the stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circulation Research*. 2009;104(6):780-786.
67. Borbély A, Van Der Velden J, et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005;111(6):774-781.
68. Shimada T, Horita K, et al. Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells. *Cell and Tissue Research*.
69. Lesnefsky EJ, Slabe TJ, et al. Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart Circulation of Physiology*. 2001;280(6).
70. Cellier L, Tamarelle S, et al. Remote ischemic conditioning influences mitochondrial dynamics. *SHOCK*. 2016;45(2):192-197.
71. Kloner RA, Fishbein MC, et al. Effect of propranolol on mitochondrial morphology during acute myocardial ischemia. *American Journal of Cardiology*. 1978;41(5):880-886.
72. T Ahmad, K Aggarwal, et al. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death and Disease*. 2013;4:461.
73. Reis Y, Bernardo-Faura M, et al. Multi-parametric analysis and modeling of relationships between mitochondrial morphology and apoptosis. *PLoS One*. 2012;7(1).

74. Hwang SJ, Kim W. Mitochondrial dynamics in the heart as a novel therapeutic target for cardioprotection. *Chonnam Medical Journal*. 2013;49(3):101-107.
75. Ong S-B, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2010;88(1):16-29.
76. Song M, Mihara K, et al. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. *Cell Metabolism*. 2015; 21:273–285.
77. Ma S, Wang Y, et al. The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(2):271-276.
78. Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & Development*. 2008; 22:1577–1590.
79. Lackner LL, Nunnari J. Small molecule inhibitors of mitochondrial division: tools that translate basic biological research into medicine. *Chemistry & Biology*. 2010; 17:578–583
80. Disatnik MH, Ferreira JC, et al. Acute inhibition of excessive mitochondrial fission after myocardial infarction prevents long-term cardiac dysfunction. *Journal of the American Heart Association*. 2013; 2:e000461.
81. Guo X, Disatnik MH, et al. Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013; 123:5371–5388 50
82. Szabadkai G, Simoni AM, et al. Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis. *Molecular Cell*. 2004; 16:59–68

83. Willems PHGM, Rossignol R, et al. Cell metabolism perspective redox homeostasis and mitochondrial dynamics. *Cell Metabolism*. 2015;22:207-218.
84. Frank M, Duvezin-Caubet S, et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2012;1823(12):2297-2310.
85. Ong SB, Subrayan S, et al. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;121(18):2012-2022. 51