

UCH-FC
Biotecnología
M 828
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias

**EFFECTOS DE LA FISIÓN MITOCONDRIAL EN LA
TASA DE RESPIRACIÓN CELULAR DEL CARDIOMIOCITO**

Seminario de Título
entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular.

por
Cristóbal Manuel Morales Ortiz.

Enero, 2009

Santiago - Chile

Director de Seminario de Título: Dr. Sergio Lavandero González.
Profesor Patrocinante: Dr. Christian González Billault.

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Cristóbal Manuel Morales Ortiz**.

**“EFECTOS DE LA FISION MITOCONDRIAL EN LA TASA DE RESPIRACIÓN
CELULAR DEL CARDIOMIOCITO”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Sergio Lavandero González
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'S' and 'L' intertwined, positioned above a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dra. Ana Preller Simmons
Presidenta Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Preller', positioned above a horizontal line.

Dr. Jorge Ferreira Parker
Evaluador

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jorge Ferreira', positioned above a horizontal line.

Santiago de Chile, Julio de 2009



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTOS DE LA FISION MITOCONDRIAL EN LA TASA DE RESPIRACIÓN
CELULAR DEL CARDIOMIOCITO**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de

NOMBRE CANDIDATO

Cristóbal Manuel Morales Ortiz

Director de Seminario de Título: **Dr. Sergio Lavandero González**

Julio, 2009
Santiago – Chile

AGRADECIMIENTOS

Quando uno llega al final de una etapa de la vida y analiza el camino recorrido, se da cuenta que es una persona diferente a la que comenzó la etapa. Uno en el final, se encuentra con una bonita experiencia, se da cuenta que su vida ha sido enriquecida por compartir con una gran cantidad de personas. Como la memoria es frágil, no podría recordar a todos, pero en estas líneas quisiera hacerles saber que estoy orgulloso, de que hayan sido parte de formación profesional y hayan influido en mí.

Saludo a cada académico de la Facultad, que con algún éxito, lograron que entendiera, tarea no menor, el amplio conocimiento que poseen.

A mis compañeros y amigos de Biotecnología y de la Universidad, quiero hacerles saber que agradezco haberlos conocido y guardo con emoción todos los momentos que compartimos durante nuestro estudio, me doy cuenta que sin su apoyo y ánimo, no habría terminado este recorrido, y ser su colega. Muchas gracias de verdad.

A cada persona que trabaja o trabajó en los laboratorios donde realice las unidades de investigación, con ellos aprendí en terreno, la ejecución del conocimiento teórico adquirido. Gracias.

Al Dr. Lavandero y a Valentina, primero por haber aceptado realizar esta tesis con Uds., y luego por guiarme e indicarme el camino a seguir, aconsejándome en las cosas que debo mejorar y por confiar en que podía cumplir la tarea. Haberlos conocido, sin duda, es la mejor experiencia académica que pude recibir, además la actual proyección que toma mi carrera, no habría sido posible sin su ayuda. No encuentro palabras que reflejen mi agradecimiento hacia Uds. pero con trabajo y esfuerzo, espero poder demostrar mi gratitud, muchas gracias.

A cada integrante del Laboratorio, por haberme integrado a la gran hermandad que se vive en este laboratorio, rigurosos en el trabajo, y siempre dispuestos a compartir las dificultades y celebrar las alegrías. Cuando me recibió el Dr. Lavandero señaló "los integrantes de este laboratorio, los considero una gran familia". Conuerdo con ello. Gracias.

Finalmente, quisiera agradecer a mis mujeres....., mi madre y mi abuela, que sería yo sin Uds. Mi eterna gratitud, más que expresar con palabras, prefiero vivirla entregando mi amor hacia Uds. a cada momento que nos toca compartir.

...Gracias a la vida, que me ha dado tanto...., dice la canción, me dio una familia incondicional, invaluable amigos de vida, y la formación en la mejor Universidad del país. Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 LA BIOENERGÉTICA CELULAR Y EL ROL DE LA MITOCONDRIA.....	3
1.2 MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL	6
1.3 FISIÓN MITOCONDRIAL	7
1.4 FUSIÓN MITOCONDRIAL.....	10
1.5 RELACIÓN MORFOLOGÍA Y METABOLISMO MITOCONDRIAL	13
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 REACTIVOS.....	16
4.2 MODELO ANIMAL.....	16
4.3 CULTIVO PRIMARIO DE CARDIOMIOCITOS	17
4.4 TRATAMIENTO ADENOVIRAL Y ESTÍMULO DE CARDIOMIOCITOS	18
4.5 MEDICIÓN DE ATP INTRACELULAR MEDIANTE LUMINOMETRÍA.....	18
4.6 MEDICIÓN DE POTENCIAL DE MEMBRANA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	19
4.7 MEDICIÓN DE CONSUMO DE OXÍGENO MEDIANTE OXIGRAFÍA DE CLARK	19
4.8 DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).....	20
4.9 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	20
4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
5. RESULTADOS	22
5.1 EFECTO DEL ASMFN2 EN LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS.....	22
5.2 EFECTO DEL ASMFN2 EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS.....	25
5.3 EFECTO DE C ₂ -CERAMIDA EN LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS.....	35
5.4 EFECTO DE C ₂ -CERAMIDA EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS.....	37
5.5 EFECTO CONJUNTO DE ASMFN2 CON C ₂ -CERAMIDA EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS	38
6. DISCUSIÓN	43
6.1 EFECTO DE ASMFN2 EN EL METABOLISMO CELULAR	45
6.2 EFECTO DE C ₂ -CERAMIDA EN EL METABOLISMO CELULAR.....	47
7. CONCLUSIONES	51
8. BIBLIOGRAFÍA.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la cadena transportadora de electrones.....	5
Figura 2. Proteínas responsables de la fisión mitocondrial en Mamíferos.	8
Figura 3. Proteínas responsables de la fisión mitocondrial en levaduras.	9
Figura 4. Proteínas responsables de la fusión mitocondrial en mamíferos.	11
Figura 5. Proteínas responsables de la fusión mitocondrial en levaduras.	12
Figura 6. Efecto de AsMfn2 en la fragmentación mitocondrial en cardiomiocitos neonatos.	23
Figura 7. Viabilidad Celular en células tratadas con AsMfn2.....	24
Figura 8. Relación entre el consumo de oxígeno y ROS con los complejos de la cadena respiratoria.	26
Figura 9. Efecto de AsMfn2 en el potencial de membrana mitocondrial.....	28
Figura 10. Efecto de AsMfn2 en el contenido de ATP intracelular.....	29
Figura 11. Efecto de AsMfn2 en el consumo de oxígeno.	30
Figura 12. Efecto de AsMfn2 en el generación de ROS.	31
Figura 14. Potencial Mitocondrial a distintos tiempos de transducción con AsMfn2.	34
Figura 15. Efecto de C ₂ -ceramida en la fragmentación mitocondrial a través del tiempo en cardiomiocitos neonatos.....	36
Figura 20. Esquema de acción de AsMfn2 en el metabolismo.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Ψ_{mt}	: Potencial de membrana mitocondrial interna
AsMfn2	: Adenovirus antisentido Mfn-2
AdVac	: Adenovirus vacío
AIF	: Proteína factor inductor de la apoptosis
ATP	: Adenosín trifosfato
Bak	: Proteína reguladora de la apoptosis
Bax	: Proteína reguladora de la apoptosis
C ₂ -ceramida	: N-acetil-D-esfingosina
Ca ⁺²	: Ión calcio
CCCP	: Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
DH-C ₂	: Dihidroceramida
DHR	: DiHidroRodamina-123
Dnm1	: Proteína ortóloga de levaduras de Drp-1
Drp-1	: Proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo-1
Fas	: Proteína de muerte celular por vía mitocondrial
FBS	: Suero fetal de bovino
FCS	: Suero fetal de cabra
Fis-1	: Proteína de la fisión mitocondrial en mamíferos
Fzo1	: Proteína ortóloga de levaduras de Mfn 1-2
GTP	: Guanosín trifosfato
Hank's	: Solución salina balanceada
kDa	: Kilo dalton
Mdv1	: Proteína de la fisión mitocondrial en levaduras
Mfn1-2	: Proteína Mitofusina 1-2
MgCl ₂	: Cloruro de magnesio
Mgm1	: Proteína ortóloga de levaduras de OPA-1
mL	: Mililitro
mM	: Milimolar
mm	: Milímetro
mtHSP-70	: Proteína <i>heat shock</i> -70 de la mitocondria
MOI	: Multiplicidad de infección viral
OPA-1	: Proteína de la atrofia óptica tipo-1
PBS	: Tampón fosfato salino
PI	: Yoduro de propidio
RNA	: Ácido ribonucleico
RNAi	: RNA de interferencia
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
rpm	: Revoluciones por minuto
SEM	: Error estándar de la media
TMRM	: Tetrametilrodamina metil éster
TNF	: Proteína de muerte celular por vía mitocondrial
g	: Microgramo
Ugo1	: Proteína de la fusión mitocondrial en levaduras
L	: Microlitro
M	: Micromolar
m	: Micrómetro

RESUMEN

Las mitocondrias son organelos intracelulares encargados del metabolismo energético celular. Estos organelos forman una red dinámica donde existe un balance continuo entre eventos de fisión y fusión, lo que constituye la dinámica mitocondrial. Las mitocondrias son muy abundantes en el tejido cardíaco, constituyendo de un 20 a 40% del volumen celular de los cardiomiocitos, células altamente diferenciadas y responsables de la contractibilidad del corazón.

En esta tesis, se establece que un desbalance de la dinámica mitocondrial hacia la fisión mediada por un adenovirus antisentido contra la proteína de la fusión Mitofusina 2 (AsMfn2), disminuye diversos parámetros metabólicos como: el potencial mitocondrial (Ψ_{mt}), ATP intracelular, consumo de Oxígeno y producción de radicales libres del oxígeno (ROS). Por otro lado, la fisión mediada por C_2 -ceramida, conocido estímulo apoptótico, muestra que existe un aumento en la producción de ATP, mientras que se mantienen los niveles del potencial de membrana interna, características propias del inicio del proceso apoptótico. Estos hallazgos son pioneros en establecer la implicancia metabólica que poseen los procesos involucrados en la mantención de la dinámica mitocondrial.

ABSTRACT

Mitochondria are intracellular organelles involved in energetic cell metabolism. These organelles form a dynamic network where a continuous balance between events of fission and fusion exists, constituting mitochondrial dynamics. Mitochondria are abundant in the cardiac tissue, constituting 20 to 40% of cardiomyocyte volume. These cells are fully differentiated and responsible of cardiac contractibility.

In the present thesis, we established that an unbalance in mitochondrial dynamics towards fission, obtained by transduction with an antisense adenovirus against mitofusin 2 fusion proteins (AsMfn2), decreases several metabolic parameters such as mitochondrial potential (Ψ_{mt}), intracellular ATP, oxygen consumption and reactive oxygen species (ROS) production. In addition, fission stimulated by C_2 -ceramide, as well known pro-apoptotic stimulus, increases ATP production, while the internal membrane potential does not change, characteristic processes of the beginning of the apoptotic process. These findings are pioneers the establishment of a metabolic relationship between processes involved on mitochondrial dynamics.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA BIOENERGÉTICA CELULAR Y EL ROL DE LA MITOCONDRIA

Los nutrientes de origen exógeno o endógeno son los principales combustibles para la generación de energía en las células. Los primeros ingresan al organismo a través de la dieta, son hidrolizados por enzimas del sistema digestivo para dar lugar a los monómeros constituyentes y ser absorbidos por la mucosa intestinal, transportados en la sangre y distribuidos a los diversos tipos celulares. Los nutrientes endógenos resultan de la hidrólisis llevada a cabo por las enzimas lisosomales y de otros sistemas hidrolíticos celulares [Alberts y col, 2004].

Los nutrientes ingresados exógenamente o provenientes del reciclaje de la propia célula, forman un conjunto de biomoléculas (ácidos grasos, aminoácidos y monosacáridos) que presentan vías catabólicas energéticas específicas. Sin embargo ellas confluyen en una vía catabólica única en las mitocondrias. [Berg y col, 2002].

Las mitocondrias son organelos intracelulares membranosos responsables del metabolismo energético, produciendo alrededor del 90% de la energía requerida para el funcionamiento celular [Marín-García y Goldenthal, 2002]. El proceso denominado *respiración celular* ocurre en ellas y constituye la vía degradativa final común para los nutrientes, siendo la principal fuente de trifosfato de adenosina (ATP), molécula que actúa como donador energético en diversas reacciones. Adicionalmente, las mitocondrias también juegan un papel protagónico en la muerte y envejecimiento celular [Marín-García y Goldenthal, 2002; McBride y col, 2006].

Estructuralmente, las mitocondrias están formadas por una doble bicapa lipoproteica, donde la más interna se encuentra sumamente plegada y formando pliegues o invaginaciones denominadas crestas mitocondriales. Ambas membranas definen dos compartimentos internos, un espacio intermembranoso y la matriz. Funcionalmente, los compartimentos más importantes de este organelo, lo constituyen la membrana interna que contiene los complejos enzimáticos de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y las proteínas de transporte, que regulan el paso de metabolitos desde y hacia el espacio interior; y la matriz mitocondrial, que contiene enzimas que participan tanto en la oxidación de ácidos grasos como en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) y en la expresión y mantención del DNA mitocondrial [Archer y col, 2007; Benard y col, 2006]

La respiración celular comprende 3 procesos metabólicos: el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa [Berg y col, 2002]. El ciclo de Krebs, constituye el proceso degradativo común, de donde se obtendrán principalmente, CO_2 y cofactores reducidos (NADH y FADH_2). Estos cofactores reducidos son sustratos de la cadena respiratoria, proceso energético acoplado resultante de la interacción de la cadena transportadora de electrones (componente exergónico) y la fosforilación oxidativa (componente endergónico). El aceptor final de electrones en la cadena respiratoria es el O_2 [Benard y col 2006].

La cadena transportadora de electrones está constituida por importantes complejos enzimáticos [Medina, 2008] como:

- Complejo I o NADH-deshidrogenasa, el cual recibe los electrones de la oxidación del NADH y los cede a la coenzima Q, la cual se desplaza libremente a través de la membrana mitocondrial interna.

- Complejo II o succinato deshidrogenasa, el cual recibe los electrones de la oxidación del FADH_2 y los cede a la coenzima Q.
- Complejo III o complejo citocromo bc1, el cual recibe los electrones de la reoxidación de la coenzima Q y los transfiere al citocromo c, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por la membrana.
- Complejo IV o citocromo oxidasa, el cual acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del oxígeno molecular a agua.

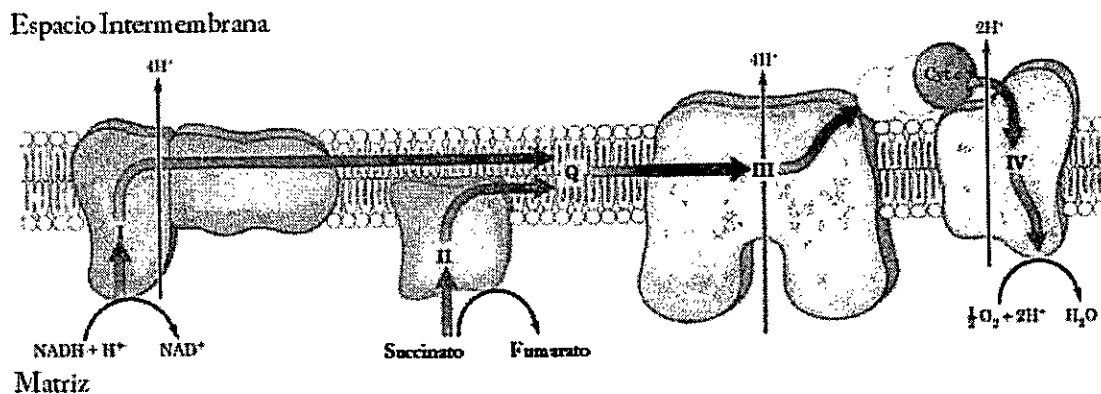


Figura 1. Esquema de la cadena transportadora de electrones.

Las reacciones globales de estos complejos generan una gradiente protónica a través de la membrana interna mitocondrial que resulta del bombeo de protones hacia el espacio intermembrana. Finalmente, este gradiente de protones se utiliza por la enzima ATP sintasa para la generación de ATP [Medina, 2008].

- Complejo V o ATP sintasa permite el retorno de los protones al espacio de la matriz mitocondrial a través de un canal translocador de protones.

Finalmente, la energía liberada por este proceso exergónico impulsa la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y Pi (fosforilación oxidativa) [Berg y col, 2002; Medina, 2008].

1.2 MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL

Morfológicamente las mitocondrias son organelos complejos que cuentan con un aspecto y distribución intracelular característica para cada tipo celular. En las fotografías clásicas de microscopía electrónica, aparecen como organelos individuales debido a que estas imágenes muestran sólo una sección individual a través de la célula. Sin embargo, esta visión está sobresimplificada dado que estos organelos constituyen una compleja red reticular, es decir, una red interconectada y altamente dinámica, mantenida por eventos permanentes, opuestos y balanceados de fusión y fisión [Chen y Chan, 2005; Detmer y Chan, 2007; Parra, 2006; Parra y col, 2008; Zorzano y col, 2004].

El alto grado de fluidez y dinamismo del retículo mitocondrial es atribuible a diversos factores que afectan a las mitocondrias como organelos individuales, entre los cuales podemos mencionar:

- Su distribución intracelular, ya que son organelos transportados por el citoesqueleto a regiones subcelulares con altas demandas energéticas [Detmer y Chan, 2007; Benard y Rossignol, 2008].
- La longitud, forma, tamaño y el número de estos organelos, parámetros altamente variables, están gobernados por eventos balanceados de fisión y

fusión [Detmer y Chan, 2007; Martins de Brito y Goldenthal, 2008; Parra y col, 2008].

- Su estructura interna, ya que puede cambiar en respuesta al estado fisiológico celular [Bach y col, 2003; Benard y Rossignol, 2008; Detmer y Chan, 2007].

El tamaño, forma, volumen, distribución y orientación celular de las mitocondrias varían continuamente, en dependencia del tejido y de su actividad funcional. En el corazón y en el músculo esquelético, por ejemplo, es posible encontrar estos organelos organizados como una red compleja de filamentos largos e interconectados, mientras que en el hígado, las mitocondrias se presentan como organelos aislados y con forma circular [Zorzano y col, 2004]. Estas características morfológicas muestran una posible relación entre la demanda energética a la que está sometido un tejido determinado y la estructura que presenten las mitocondrias.

1.3 FISIÓN MITOCONDRIAL

La fisión mitocondrial corresponde a la fragmentación de la red mitocondrial interconectadas en varios organelos individuales más pequeños. Este proceso, en mamíferos, está regulado por la proteína GTPasa relacionada con la familia de las dinaminas (DRP1) y la proteína de fisión 1 (FIS1) [Parra, 2006]. DRP1 se encuentra normalmente en el citoplasma y en fosas de la membrana externa mitocondrial que constituirán futuros sitios de fisión. Para que exista fisión por parte de las mitocondrias es necesario el reclutamiento de la proteína DRP1 hacia la membrana externa de la mitocondria, donde esta proteína actuaría como una mecanoenzima, la cual ensamblaría entorno a la mitocondria formando un anillo y constriñendo el túbulo mitocondrial para dar

lugar a la fisión [Detmer y Chan, 2007]. Como evidencia para este modelo, se ha encontrado que al purificar proteína Dnm1 (ortólogo de DRP1 en levaduras), es capaz formar anillos helicoidales y espirales *in vitro*, con dimensiones semejantes a las necesarias para constreñir a una mitocondria [Detmer y Chan, 2007].

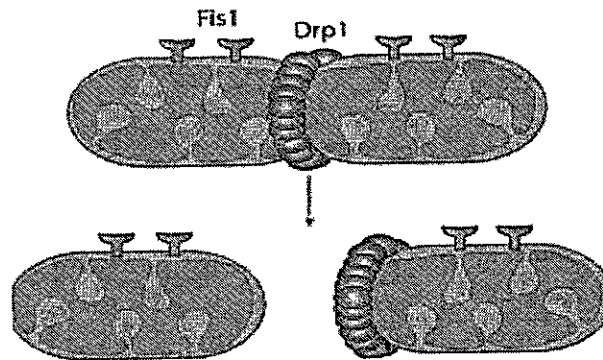


Figura 2. Proteínas responsables de la fisión mitocondrial en Mamíferos.

Tomado de Detmer y Chan, 2007. Fis1, proteína integral de membrana externa mitocondrial y Drp1, proteína GTPasa citoplásmica de la familia de las dinaminas.

No existe una secuencia de destinación mitocondrial para DRP1, sin embargo, esta proteína se recluta hacia la mitocondria por FIS1, una pequeña proteína integral de la membrana externa de la mitocondria, que forma parte de los complejos de fisión de alta masa molecular [Detmer y Chan, 2007; Parra, 2006]. Se ha demostrado en levaduras, que Fis1 (ortólogo de FIS1) une indirectamente a Dnm1 a través de uno o dos adaptadores moleculares, Mdv1 y Caf4. Ni Mdv1, ni Caf4 son suficientes para permitir el reclutamiento de Dnm1 dependiente de Fis1, pero Mdv1 resulta más importante en su función adaptadora. No se han encontrado ortólogos para estas proteínas adaptadores en mamíferos [Detmer y Chan, 2007].

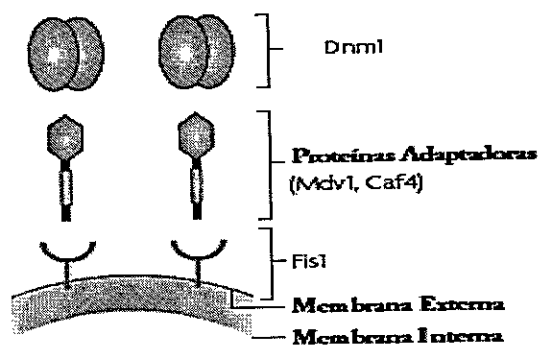


Figura 3. Proteínas responsables de la fisión mitocondrial en levaduras.

Tomado de Detmer y Chan, 2007. Dnm1, proteína ortóloga de DRP1 en levaduras, Fis1 ortóloga a FIS1 en levaduras, Mdv1 y Caf4 proteínas adaptadoras que facilitan la interacción entre Dnm1 y Fis1.

Sin embargo, actualmente sabemos que la participación de FIS1 como proteína adaptadora no es crucial en el reclutamiento de DRP1 a la membrana mitocondrial, ya que se ha descrito que una disminución de los niveles de FIS1, mediante el uso de RNA de interferencia (RNAi), no altera su traslocación hacia la mitocondria [Detmer y Chan, 2007; Parra, 2006].

Diversos estudios han mostrado que la morfología mitocondrial cambia durante la apoptosis, dando como resultado mitocondrias pequeñas, esféricas y más numerosas, por lo que se ha propuesto una asociación entre fisión mitocondrial y muerte celular, lo cual es aún un tema de amplia discusión [Chen y cols, 2009; Knott y Bossy-Wetzel, 2008; Knott y col, 2008, Loucks y col, 2009; Narula y col, 1999; Parra y col, 2008; Shen y col, 2007]. Bajo condiciones específicas, se observa que DRP1 interactúa con Bax en sitios que marcarían futuros sitios de fragmentación de la membrana mitocondrial, siendo este proceso un pre-requisito para la permeabilización de la membrana externa del organelo, permitiendo así la liberación del citocromo c [Narula y col, 1999; Parra y col, 2008]. En

otros modelos, sin embargo, también se ha propuesto que tanto el proceso de fisión mitocondrial, como el proceso de muerte celular actuarían de forma independiente. Gran parte de estos estudios ha sido realizado en líneas celulares, siendo escasos los modelos donde se utilicen cultivos primarios. Esto último, nos motivó a investigar una posible relación entre la muerte celular programada inducida por ceramidas y la dinámica mitocondrial en cardiomiocitos de ratas neonatas, donde se encontró una fuerte correlación entre los cardiomiocitos que comenzaban la apoptosis inducida por ceramidas, mostraban fisión en su red mitocondrial [Parra, 2006; Parra y col 2008].

1.4 FUSIÓN MITOCONDRIAL

La fusión mitocondrial promueve el ensamblaje de mitocondrias individuales, lo que finaliza con la combinación de sus membranas. Este proceso, en mamíferos, está regulado por las proteínas Mitofusina 1 y 2 (MFN1 y MFN2), y OPA1, las cuales corresponden a GTPasas de alta masa molecular, localizadas en el interior del organelo. MFN1 y MFN2 comparten un 81% de identidad de secuencia y, por lo tanto, comparten una gran similitud estructural, siendo capaces de formar complejos homo- y hetero-oligomeros [Detmer y Chan, 2007; Parra, 2006]. Ambas proteínas residen en la membrana externa del organelo [Detmer y Chan, 2007]. Por otro lado, la proteína OPA1 se localiza en el espacio intermembrana y asociada a la membrana interna del organelo [Detmer y Chan, 2007; Parra, 2006]. Esta proteína presenta numerosas isoformas, debido a que sufre procesos de splicing alternativo y modificaciones post-traduccionales [Detmer y Chan, 2007], lo que permite que algunas de estas isoformas presenten localizaciones celulares diferentes.

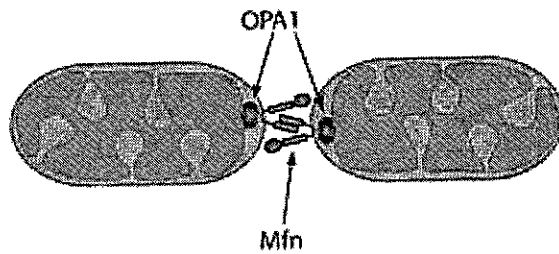


Figura 4. Proteínas responsables de la fusión mitocondrial en mamíferos.

Tomado de Detmer y Chan, 2007. OPA1, proteína implicada en la fusión de membrana mitocondrial interna y Mfn, proteína implicada en la fusión de membrana mitocondrial externa.

En levaduras, la maquinaria de fusión mitocondrial consiste en 2 GTPasas: *Fzo1* (ortólogo de MFN1 y MFN2), la cual es esencial para la fusión de membranas externas y siendo necesaria su presencia en mitocondrias adyacentes durante el proceso de fusión, lo que implica que forma un complejo en *trans* entre las mitocondrias involucradas. *Mgm1* (ortólogo de OPA1) es otra proteína involucrada en el proceso y es esencial para la fusión de membranas internas. Finalmente existe una tercera proteína Ugo1 que une físicamente *Fzo1* y *Mgm1*, pero no se ha encontrado un ortólogo en mamíferos [Detmer y Chan, 2007].

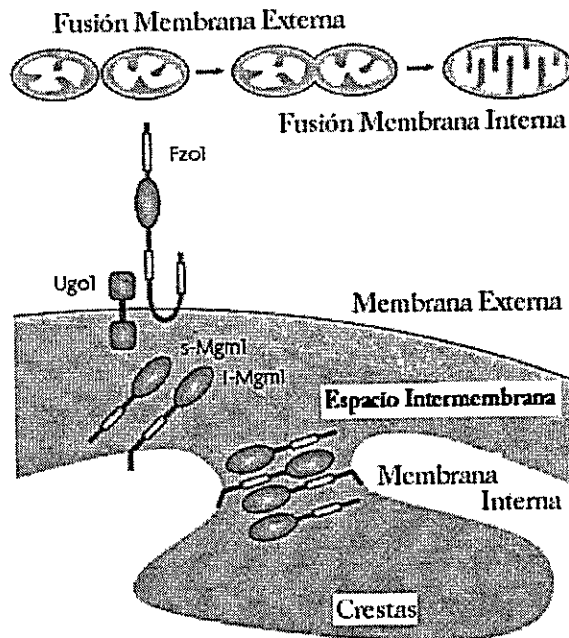


Figura 5. Proteínas responsables de la fusión mitocondrial en levaduras.

Tomado de Detmer y Chan, 2007. Fzo1, proteína ortóloga de Mfn en levaduras, Mgm1 proteína ortóloga de OPA1, Ugo1 proteína adaptadora que facilita la interacción entre Mgm1 y Fzo1.

La fusión de las membranas mitocondriales externas como internas, constituyen procesos muy disímiles e independientes: mientras que la fusión de la membrana externa requiere bajos niveles de hidrólisis de GTP, la fusión de membrana interna requiere altos niveles de hidrólisis, así como de la presencia de un potencial de membrana mitocondrial intacto (Ψ_{mt}), y por lo tanto, de una alta síntesis de ATP [Benard y col, 2007; Detmer y Chan, 2007; Martins de Brito y Scorrano, 2008; Twig y cols, 2008].

1.5 RELACIÓN MORFOLOGÍA Y METABOLISMO MITOCONDRIAL

Tanto el estudio de la morfología mitocondrial como el metabolismo asociado a la mitocondria han sido abordados como temas separados. Últimamente en la literatura han aparecido diferentes trabajos, en los cuales, la modificación del estado metabólico de la célula tiene una implicancia en la forma de la red mitocondrial en la célula, por lo cual, hace sospechar que cada evento metabólico está asociado a una morfología mitocondrial característica. Esta situación queda claramente ilustrada, en la observación de que la morfología de la red mitocondrial de diversos tipos celulares ricos en mitocondrias depende de la demanda energética a la cual estos tejidos se encuentran sometidos. Tejidos en los cuales existe una alta demanda energética, como lo son las células del corazón y del músculo esquelético, presentan una morfología mitocondrial fusionada, donde existen unos pocos túbulos muy alargados que agrupan a la casi la totalidad de las mitocondrias [Bach y col, 2003; Benard y col 2007; Duchen, 2004; Garlid y col, 2008; Guillery y col, 2008; Kodde y col, 2007, Parra, 2006; Parra y col, 2008]. Mientras que tejidos donde la demanda energética está destinada principalmente a metabolizar nutrientes digeridos en la dieta, como las células del hígado, presentan una red mitocondrial fisionada, donde conviven numerosas y pequeñas mitocondrias aisladas [Duchen, 2004; Kodde y col, 2007].

Otras investigaciones vinculadas al estudio de la muerte celular programada por vía intrínseca, es decir, donde la mitocondria tiene un rol central en el desarrollo del proceso, muestran que existe una gran tendencia a fisionar la morfología mitocondrial [Parra, 2006; Parra y col, 2008]. Este desbalance de la dinámica mitocondrial hacia la fisión, también se ha descrito en conocidas neuropatías, como las Enfermedades de

Parkinson, Alzheimer y Huntington [Dúchen, 2004; Hamana y Suárez, 2002; Knott y Bossy-Wetzel, 2008; Knott y col, 2008; Koopman y col, 2005; Wang y col, 2008; Zorzano y col, 2004].

La evidencia más potente que vincula que la maquinaria de la morfología mitocondrial modula el metabolismo celular, lo constituyen los estudios sobre la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Esta patología neuromuscular y hereditaria de los nervios periféricos se caracteriza por la degeneración axonal de los nervios sensitivos y motores. La enfermedad en su variante CMT2A, es causada por una mutación en el gen de la proteína de fusión mitocondrial Mfn2. Amiott y col estudiaron parámetros metabólicos en fibroblastos de pacientes con CMT2A tales como producción de ATP, generación de ROS y susceptibilidad a agentes que inducen apoptosis, dónde no encontraron diferencias significativas. En cambio, observaron un aumento significativo de la respiración insensible a oligomicina (inhibidor del complejo V, ATP Sintasa), una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) y una menor eficiencia de acoplamiento mitocondrial ([ATP]/oxígeno consumido). Estos resultados indican claramente que existe una modulación morfología/metabolismo importante, la cual, es muy interesante para ser analizada y caracterizada en un tipo celular, tan importante para el organismo, como son los cardiomiocitos, constituyentes esenciales del corazón [Amiott y col, 2008; Pich y col, 2005].

El propósito de este trabajo, es empezar a caracterizar el nexo que liga la morfología de la red mitocondrial con el estado metabólico celular en cardiomiocitos de ratas neonatas.

2. HIPÓTESIS

"La fisión mitocondrial disminuye la respiración celular del cardiomiocito".

3. OBJETIVOS

- Inducir fisión mitocondrial del cardiomiocito mediante dos estrategias experimentales (C₂-ceramida y uso del antisentido Mfn2).
- Cuantificar los parámetros asociados a respiración mitocondrial como consumo de O₂, producción de ATP, producción de ROS y potencial de membrana interna mitocondrial.
- Correlacionar los niveles de respiración con la fisión mitocondrial en el cardiomiocito.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): Medio Hank's, Medio DME, Medio 199, pancreatina, gelatina, 5-bromo-2'-deoxiuridina, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP) y Tripsina-EDTA. De Gibco BRL (Carlsbad, EEUU) se obtuvieron: colagenasa de tipo II, suero fetal bovino (FBS) y suero de ternera (FCS). Tetrametilrodamina metil éster perclorato (TMRM, T-668) y 123-dihidrorodamina (DHR, D-632) se compraron en Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU). De CalBioChem (San Diego, EEUU) se obtuvieron N-acetil-D-eritro-esfingosina (C₂-ceramida, #110145) y N-acetil-dihidro-D-eritro-esfingosina (DH-C₂-ceramida, #219537), mientras que el kit Cell Titer-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (G7570) se adquirió en Promega (Madison, EEUU). Todos los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se compraron en Merck (Darmstadt, Alemania). Finalmente, el adenovirus antisentido para Mitofusina-2 (AsMfn-2) fue facilitado por el Dr. Antonio Zorzano (Institute of Research in Biomedicine, Universitat de Barcelona, España).

4.2 MODELO ANIMAL

Como modelo de estudio se utilizaron ratas neonatas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. En su utilización y manejo se cumplieron todas las normas éticas referidas a la utilización de animales definidas por la institución mencionada.

4.3 CULTIVO PRIMARIO DE CARDIOMIOCITOS

Las ratas neonatas se decapitaron para obtener sus corazones, los cuales fueron lavados en medio Hank's estéril a 37°C, luego las aurículas se descartaron, mientras que los ventrículos fueron homogenizados. El homogeneizado celular se digirió enzimáticamente con el objetivo de obtener células aisladas. La digestión enzimática consiste en ciclos sucesivos con la enzima colagenasa de tipo II (0.02 g/100 mL de medio Hank's) y pancreatina (0.06 g/100 mL de medio Hank's). En este punto del cultivo, se obtiene un extracto celular que contiene 2 tipos celulares principales: fibroblastos y cardiomiocitos. Con el fin de separar estas poblaciones celulares, se realiza un preplaqueo en botellas plásticas de cultivo de 250 mL durante 2 h en medio DME: M199 (4:1) suplementado con 10% de FBS. Este procedimiento aprovecha la adhesión diferencial de ambos tipos celulares, ya que al finalizar la incubación se obtienen los fibroblastos adheridos en las paredes de la botella, mientras que los cardiomiocitos permanecen en suspensión. La suspensión que contiene éste último tipo celular, es removida y centrifugada a 1000 r.p.m. durante 5 min y resuspendida en 21 mL de medio DME: M199 (4:1) suplementado con 5% de FBS y 10% de FCS. Posteriormente, los cardiomiocitos son contados en una cámara de Neubauer mediante microscopia, utilizando el colorante azul de tripán, el cual permite visualizar las células vivas y distinguir las de las muertas. Una vez conocida la concentración celular, los cardiomiocitos son sembrados en medio DME: M199 (4:1) suplementado con 5% de FBS, 10% de FCS y 5-bromo-2-deoxiuridina, en placas de cultivo cubiertas previamente con gelatina (2% p/v), las cuales son mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de O₂. La concentración celular de siembra depende de las condiciones y requerimientos del experimento a realizar.

4.4 TRATAMIENTO ADENOVIRAL Y ESTÍMULO DE CARDIOMIOCITOS

Las células se lavaron a las 24 h post-siembra para eliminar el debris celular. Luego se les agregó medio DME: M199 (4:1) y se transdujeron con el adenovirus AsMfn2 en una multiplicidad de infección (MOI) de 1000 partículas virales por célula. Se mantuvo esta condición por 24 h. como control de transducción se utilizó el vector adenoviral vacío al mismo MOI y tiempo que el vector para AsMfn2.

El medio de transducción se removió a las 24 h post-transducción y se cambió a medio DME: M199 (4:1) suplementado con 10% de FBS. El estímulo C₂-ceramida y su control inactivo DH-C₂-ceramida se preparó a una concentración de 40 μ M en el mismo medio en que se mantienen las células, el cual fue agregado a 2, 4 y 6 h, antes de cada experimento.

4.5 MEDICIÓN DE ATP INTRACELULAR MEDIANTE LUMINOMETRÍA

Para este experimento se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/pocillo. Una vez terminado el estímulo con C₂-ceramida, se removió el medio y se agregaron 20 μ L de medio Krebs con Ca²⁺ (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.0 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES-Na, 5.6 mM glucosa, pH 7.4). Posteriormente se adicionó el tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo® en una relación 1:1 y finalmente se agitó la placa durante 2 min para completar la reacción. Finalmente, las células lisadas se traspasaron a una placa opaca de 96 pocillos, y son medidas en un luminómetro TopCountNXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Los resultados se expresan como promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento adenoviral y sin estímulos, con sus respectivos errores estándar con respecto al control.

4.6 MEDICIÓN DE POTENCIAL DE MEMBRANA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para este experimento se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos a una concentración de 3×10^5 células/pocillo. La sonda utilizada para medir el potencial de membrana mitocondrial es la tetrametil rodamina (TMRM), la cual se carga 30 min antes de la medición. Una vez terminado el estímulo con C_2 -ceramida, el medio se remueve y las células se sueltan con 300 μ L de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS por 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min, la reacción de tripsinización se detiene con FBS en una proporción 1:10. Posteriormente, las células se traspasaron a tubos BD para Citometría y leídas en un citómetro de flujo (FACS SCAN). Los resultados se expresan como promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento adenoviral y sin estímulos, con sus respectivos errores estándar con respecto al control.

4.7 MEDICIÓN DE CONSUMO DE OXÍGENO MEDIANTE OXIGRAFÍA DE CLARK

Para este experimento se utilizaron placas de cultivo de 60 mm a una concentración de 4×10^6 células/placa. Una vez preparado el oxígrafo, el medio se remueve, las células se lavan con PBS y se tripsinizan con 1 mL de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS por 5 min a 37°C. La reacción de tripsinización se detiene con FBS en proporción 1:10 y las células son centrifugadas por 5 min a 1600 r.p.m. El sobrenadante se elimina y el pellet se resuspende en 100 μ L de PBS, para ser llevado finalmente a una cámara de 600 μ L, completándose el volumen final con solución de PBS. La velocidad de consumo de oxígeno se registró en un electrodo de Clark 5331 (Yellow Springs Instruments), acoplado a un sistema de registro análogo. Los resultados se expresan

como promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento adenoviral y sin estímulos, con sus respectivos errores estándar con respecto al control.

4.8 DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)

Para este experimento se utilizaron las placas de cultivo de 12 pocillos a una concentración de 3×10^5 células/pocillo. La sonda utilizada para medir ROS es la 123 dihidrorrodamina (DHR), la cual se carga 30 min antes de la medición. El proceso de soltar las células por tripsinización y posterior detención es el mismo descrito para la medición de potencial mitocondrial. Posteriormente, las células se traspasaron a tubos BD para citómetro y fueron leídas en un citómetro de flujo (FACS SCAN). Los resultados son expresados como promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento adenoviral y sin estímulos, con sus respectivos errores estándar con respecto al control.

4.9 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para este experimento se utilizaron las placas de cultivo de 12 pocillos a una concentración de 3×10^5 células/pocillo. Se transdujeron las células 24 h post-siembra a distintas multiplicidades de transducción con el AsMfn2 y el control con adenovirus vacío. Luego, se realiza el proceso de soltar las células por tripsinización y posterior detención con FBS, el cual es el mismo que fue descrito para la medición de potencial mitocondrial. Posteriormente, las células se traspasaron a tubos BD para citómetro, en los cuales se añadió 10 μ L de Yoduro de Propidio, PI (1 mg/mL), sonda utilizada para determinar la viabilidad celular porque permite discriminar el proceso necrótico del apoptótico, ya que

este compuesto se intercala en el DNA de células que han perdido la integridad de sus membranas, e inmediatamente leídas en un citómetro de flujo (FACS SCAN). Los resultados son expresados como promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento adenoviral y sin estímulos, con sus respectivos errores estándar con respecto al control.

4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como promedios \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba de Bonferroni para determinar significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 EFECTO DEL ASMFN2 EN LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS

La proteína Mitofusina (Mfn) es parte de la maquinaria de fusión de la red mitocondrial. Existen 2 tipos descritos, Mfn1 y Mfn2, siendo esta última expresada de forma diferencial en las células cardíacas [Fang y col, 2007]. En trabajos anteriores, se ha descrito que una disminución de Mfn2 provoca una reducción en la fusión mitocondrial, provocando una fragmentación en la red mitocondrial [Benard y col, 2007; Parra, 2006; Parra y col, 2008]. En una publicación y trabajos previos de nuestro laboratorio, se transdujeron cardiomiocitos de rata neonata con un adenovirus antisentido para Mfn2 (AsMfn2) y se cuantificaron sus niveles de expresión de Mfn2, observándose una disminución del 75% para esta proteína (Figura 6A) [Parra, 2006; Parra y col, 2008]. Una vez probada la eficiencia del AsMfn2, se visualizó la morfología de la red mitocondrial mediante microscopía confocal, donde se observó un aumento en la fragmentación de la red de mitocondrias, tal como ha sido descrito en otros tipos celulares, donde el aumento en el número de organelos genera que estos sean de menor tamaño (Figura 6B) [Benard y col, 2007]. Se ha descrito que células en proceso de muerte celular por vía mitocondrial observadas por microscopía también presentan fragmentación en la red mitocondrial [Benard y col, 2007; Parra y col, 2008; Shen y col, 2007]. Para evaluar si la fragmentación producida por AsMfn2 está relacionada con este tipo de muerte celular, se evaluó la viabilidad en cardiomiocitos neonatos a través de Citometría de flujo, con distintas multiplicidad de transducción (MOI), donde se observó que no existe relación entre la

fragmentación mediada por AsMfn2 con la fragmentación implicada en la muerte celular (Figura 7).

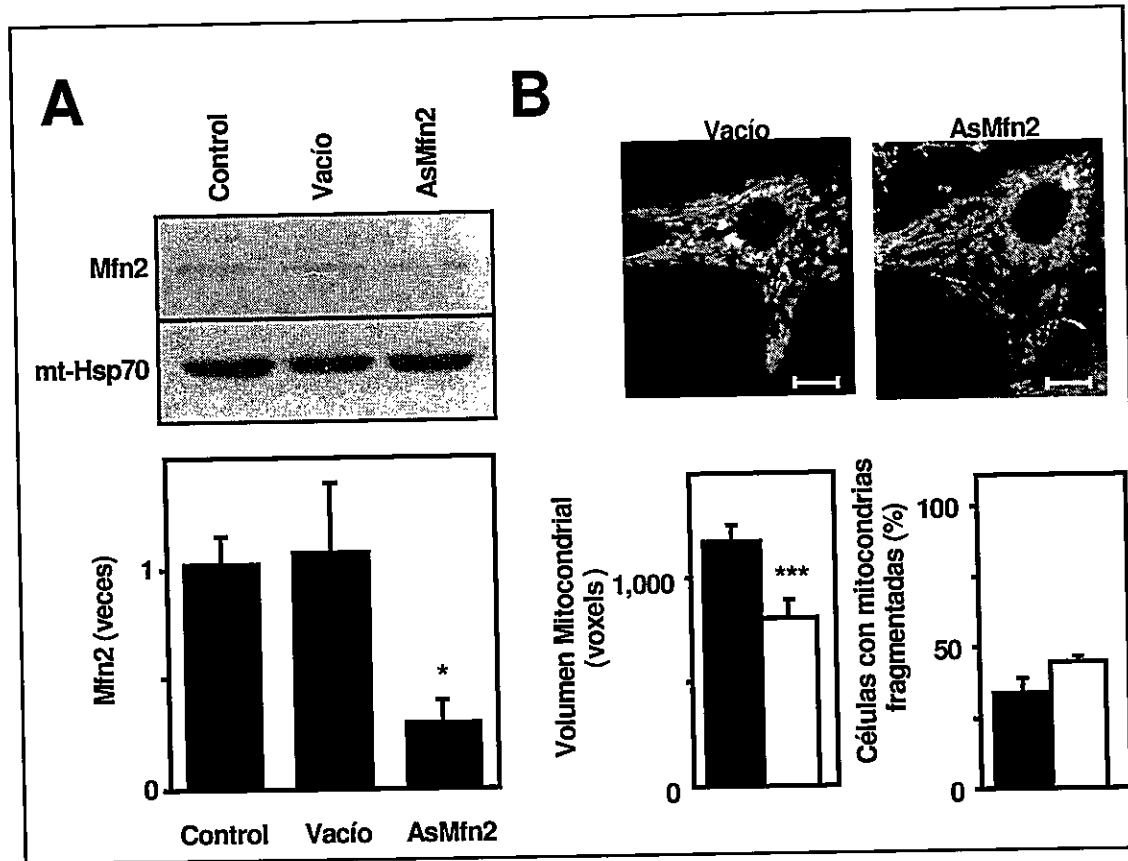


Figura 6. Efecto de AsMfn2 en la fragmentación mitocondrial en cardiomiocitos neonatos.

(A) Se extrajo la fracción mitocondrial, y determinó los niveles de las proteínas: Mfn2 (122 kDa) y mt-Hsp70 (75 kDa), mediante Western Blot (Panel Superior). El panel inferior muestra la cuantificación por análisis densitométrico. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 4), * p <0.05 vs vacío. (B) Análisis de la dinámica mitocondrial. Las células fueron transducidas con AsMfn2 (MOI=1000, barra blanca) o con adenovirus vacío (barra negra). Las imágenes fueron utilizadas para evaluar el porcentaje de células con fragmentación mitocondrial o el volumen mitocondrial individual. La escala corresponde a 10 μ m. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 3), *** p <0.05 vs vacío. Tomado de Parra y cols (2008).

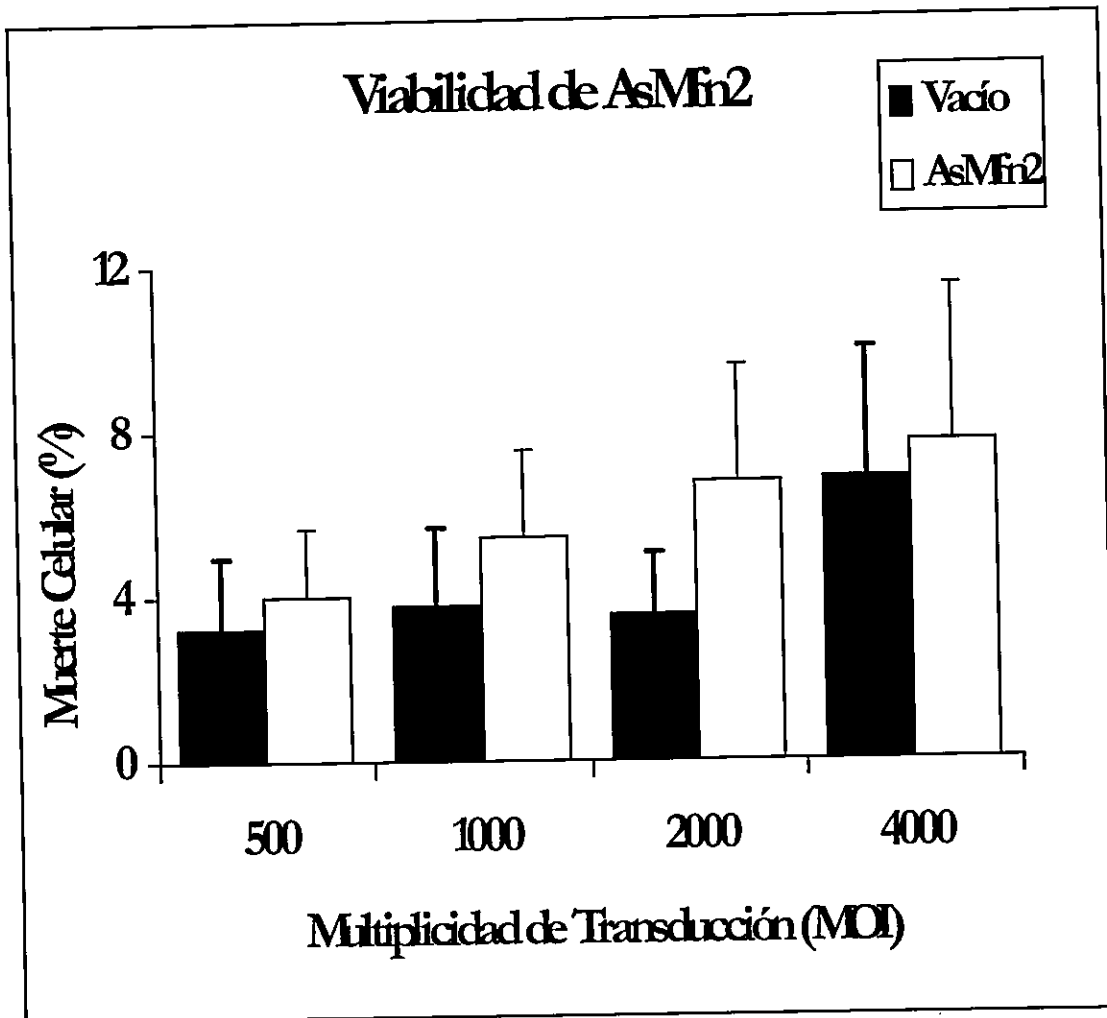


Figura 7. Viabilidad Celular en células tratadas con AsMfn2.

Determinación de la viabilidad celular mediante Citometría de flujo y yoduro de propidio (PI) en cardiomiocitos neonatos tratados con AsMfn2 (barra blanca) y adeno Vacío (barra negra) a las 24 h post transducción. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 3).

5.2 EFECTO DEL ASMFN2 EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS

Conocido el efecto en la morfología del AsMfn2 y que éste no presenta relación con la muerte celular temprana, nos interesó determinar el estado metabólico de los cardiomiocitos neonatos que fueron transducidos con este adenovirus. Para ello nos centramos en la medición de los niveles de ATP, el potencial de membrana mitocondrial (Ψ_{mt}), el consumo de oxígeno y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Como se ha mencionado, la mitocondria constituye la principal fuente de producción de ATP intracelular, el cual es generado por la ATP sintasa que utiliza el gradiente de protones generado por la cadena transportadora de electrones. En su conjunto, esta cadena respiratoria puede actuar como un sensor de oxígeno y de la producción de ROS, de acuerdo a la disponibilidad de oxígeno molecular (O_2) presente en el sistema, siendo el complejo IV de la cadena, el responsable de acoplar la reducción del O_2 a la oxidación de la citocromo oxidasa, en condiciones normales. Cuando se inhibe parcialmente la cadena transportadora (hipoxia) se producen cambios redox en los transportadores del complejo III de la cadena (ubiquinona, ubiquinol y ubisemiquinona) lo que se traduce en un alza en la producción de ROS, los cuales son liberados al citoplasma (Figura 8). A la luz de todos estos antecedentes, se analizaron estos parámetros (contenido de ATP intracelular, potencial de membrana mitocondrial, consumo de oxígeno y producción de ROS) para medir el estado metabólico celular sin perturbar la integridad celular, debido a que estos parámetros dan indicios del funcionamiento de la cadena respiratoria en general.

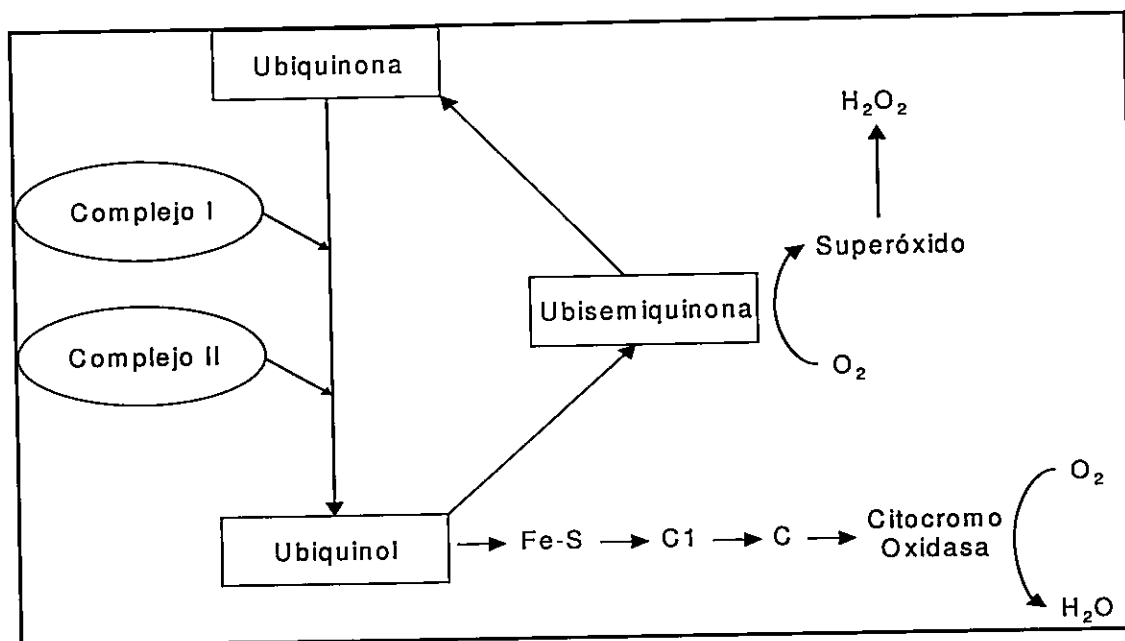


Figura 8. Relación entre el consumo de oxígeno y ROS con los complejos de la cadena respiratoria.

El tratamiento de los cardiomiocitos neonatos con el AsMfn2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.000 partículas virales por célula y cuyo tratamiento se realizó 24 h post-transducción, muestra una disminución del 60% del potencial de membrana mitocondrial (Figura 9). La Mfn2 es la proteína responsable de la fusión de membranas mitocondriales externas, mientras que el potencial de membrana es generado en la membrana mitocondrial interna. Una disminución de un 75% en los niveles nativos de la Mfn2, mediado por un adenovirus antisentido, provoca una fragmentación de la red mitocondrial debido a la pérdida celular en la capacidad de fusionar las membranas externas de la mitocondria, lo que repercutirá en una fragmentación de ella y en la repartición en forma equitativa de esta membrana en organelos más pequeños, provocando a su vez, una disminución en la superficie disponible para generar el potencial mitocondrial en la membrana interna y disminuyendo obligatoriamente el flujo

electrónico en la cadena respiratoria. Esta gradiente de protones disminuida debería verse acompañada de una disminución de la generación de ATP por vía mitocondrial. Efectivamente, al evaluar la concentración intracelular de ATP se observó una disminución del 30% (Figura 10), lo que da cuenta de la alta capacidad glicolítica, la otra vía de producción ATP intracelular, de los cardiomiocitos neonatos. Esta disminución del flujo de electrones en la cadena transportadora de electrones, queda evidenciado por la disminución del consumo de oxígeno de un 50% (Figura 11) y la disminución de generación de ROS en un 60% (Figura 12). En el consumo de oxígeno y la generación de ROS participan los complejos III y IV de la cadena transportadora, indicando una falla en el transporte electrónico previo a estos complejos. Tanto en el complejo I como en el complejo II, actúa la proteína Q la cual se desplaza por la membrana mitocondrial. Estos resultados confirman que la disminución de la capacidad de fusión de la membrana mitocondrial externa, afecta directamente al funcionamiento de la membrana mitocondrial interna, donde apreciamos una caída de todos los parámetros (ATP, Ψ_{mt} , O_2 y ROS).

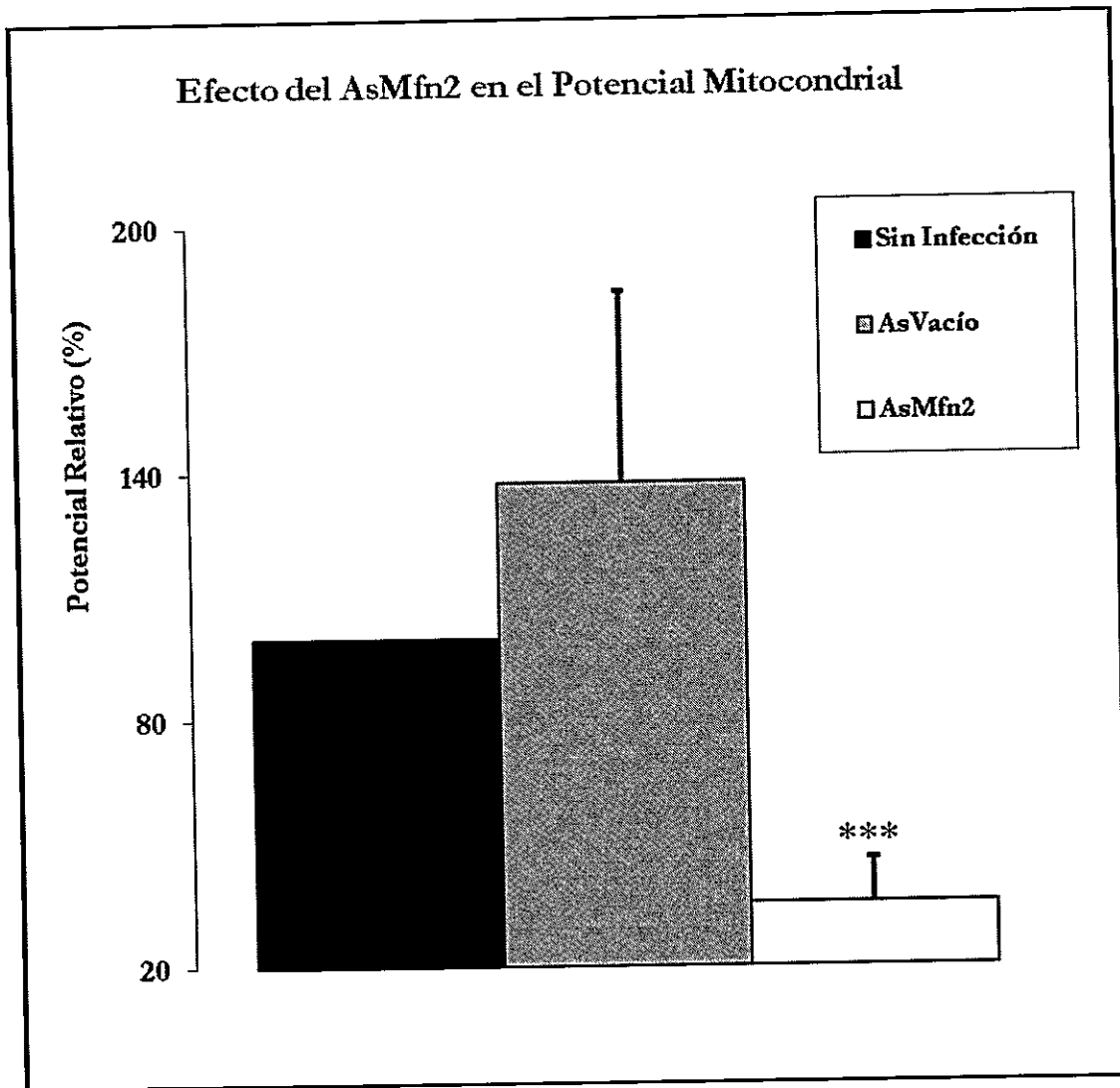


Figura 9. Efecto de AsMfn2 en el potencial de membrana mitocondrial.

Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante Citometría de flujo y TMRM en cardiomiocitos neonatos tratados con AsMfn2 y Adeno Vacío a las 24 h post-transducción. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 4), *** $p < 0.001$ vs control.

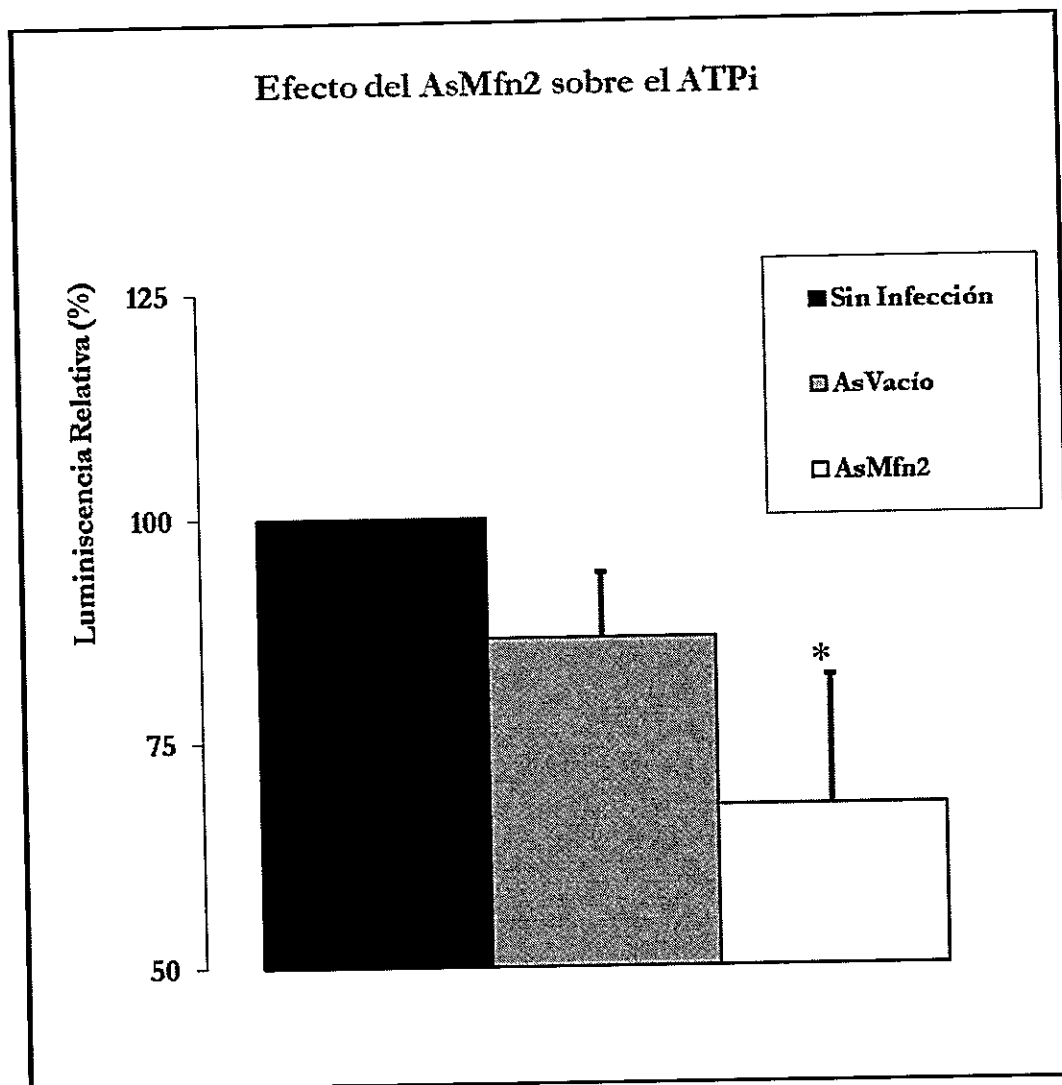


Figura 10. Efecto de AsMfn2 en el contenido de ATP intracelular.

Determinación de la concentración intracelular de ATP mediante ensayo de luminiscencia en cardiomiocitos neonatos tratados con AsMfn2 y Adeno Vacío a las 24 h post-transducción. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 7), $p < 0.05$ v/s control.

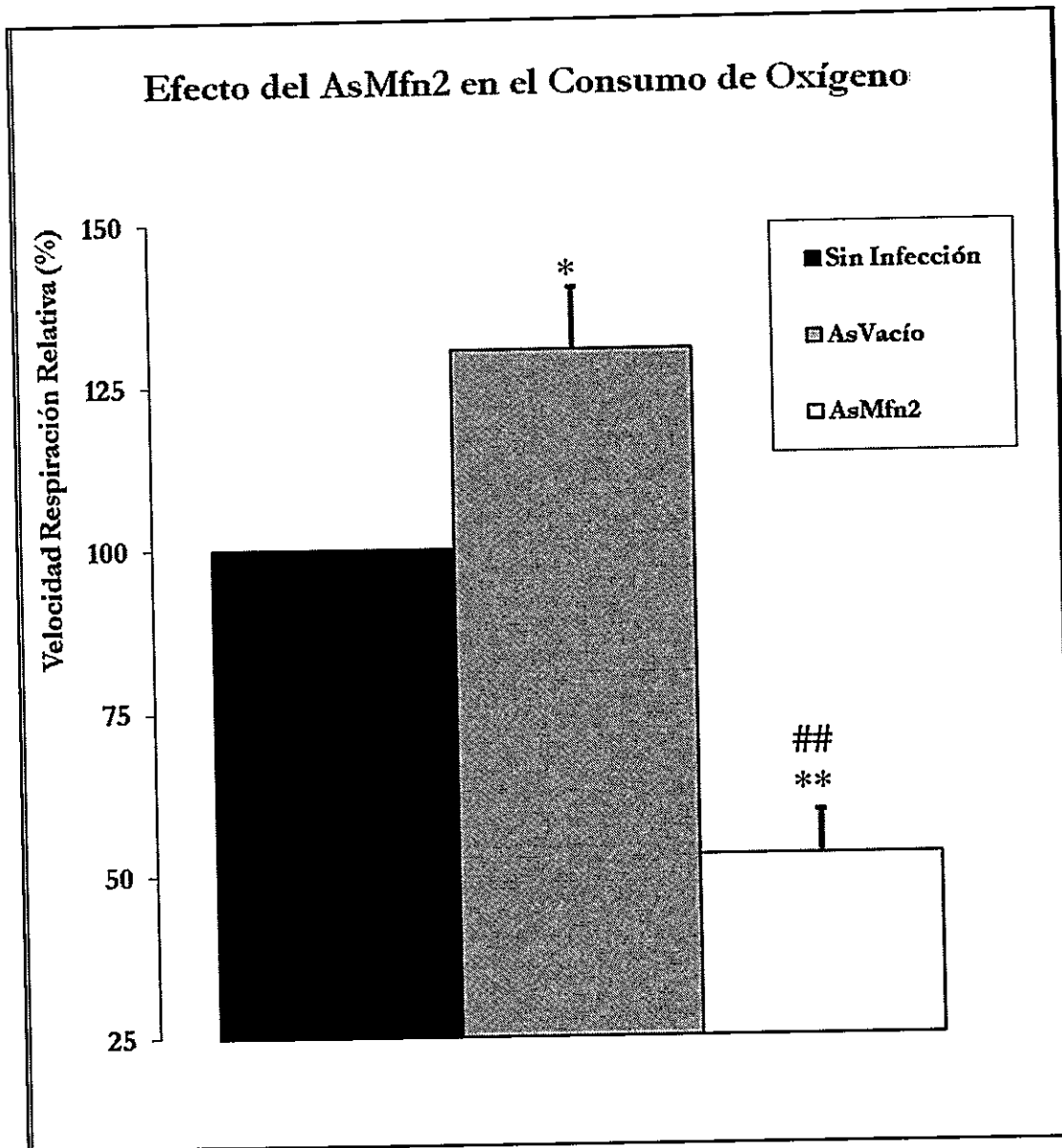


Figura 11. Efecto de AsMfn2 en el consumo de oxígeno.

Determinación de la velocidad relativa de consumo de oxígeno mediante Oxigrafía de Clark en cardiomiocitos neonatos tratados con AsMfn2 y Adeno Vacío a las 24 h post-transducción. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 3), * $p < 0.05$ v/s control, ** $p < 0.01$ vs control y ## $p < 0.01$ vs vacío.

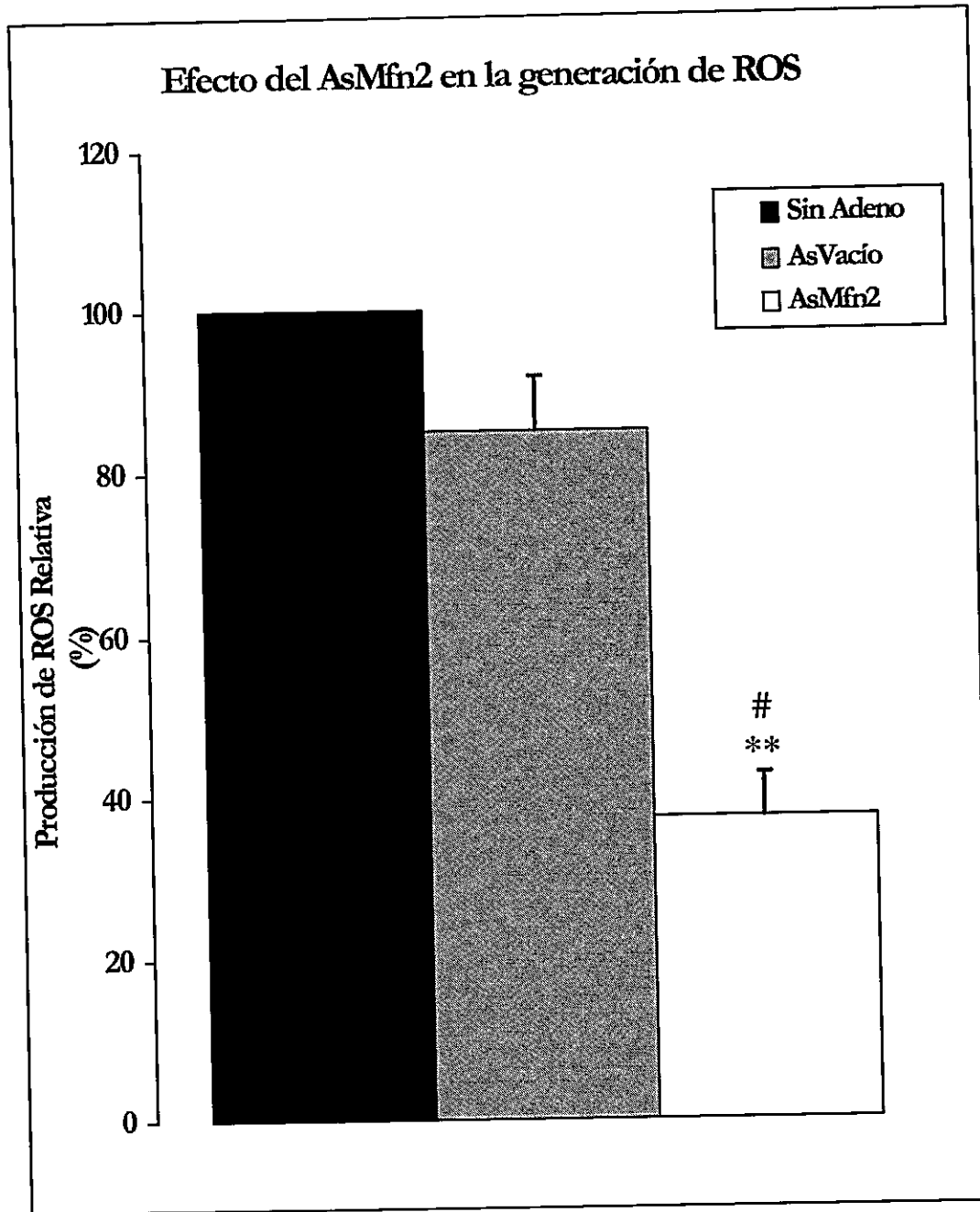


Figura 12. Efecto de AsMfn2 en la generación de ROS.

Determinación de la producción relativa de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante Citometría de flujo y DHR en cardiomiocitos neonatos tratados con AsMfn2 y Adeno Vacío a las 24 h post-transducción. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 3), # $p < 0.05$ v/s vacío y ** $p < 0.01$ v/s control.

El mismo tratamiento adenoviral, realizado 24 h post-transducción podría enmascarar posibles cambios metabólicos provocados por otros estímulos a probar en cardiomiocitos neonatos, ya que a este tiempo de tratamiento se podrían evidenciar cambios irreversibles en la capacidad metabólica de la célula. Esta interrogante nos motivó a medir a distintos tiempos de transducción, los parámetros más sensibles: contenido de ATP y potencial de membrana. En el caso del contenido de ATP intracelular, la disminución de este parámetro es completamente dependiente del tiempo (Figura 13), es decir, a mayor tiempo de transducción, mayor es la caída en el contenido de ATP intracelular. A partir de las 12 h post-transducción existe una diferencia significativa del efecto del AsMfn2, frente a su control de transducción el adenovirus vacío. En el caso del potencial de membrana mitocondrial, la relación que existe entre su disminución y el tiempo de transducción no es directa (Figura 14). Se observa que se produce un plateau en la caída entre las 3 y las 12 h post-transducción, probablemente debido a que la célula destina ATP exógeno a la mitocondria o la acción de la enzima Adenilato Quinasa, la cual se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria, y sintetiza 1 molécula de ATP por cada 2 moléculas de ADP. Este gasto de ATP pretende un restablecimiento del gradiente protónico de membrana, como probable mecanismo de supervivencia. La disminución en el potencial es evidente sólo a las 24 h post-transducción, resultado que valida el protocolo seguido en nuestros experimentos anteriores.

Debido al tiempo que consume la técnica, además de la gran cantidad de células necesarias para la determinación del consumo de oxígeno y la medición de generación de ROS, no se realizaron las cinéticas de transducción para estos parámetros, pero se podría esperar un comportamiento similar al mostrado por la disminución de ATP a distintos tiempos de transducción.

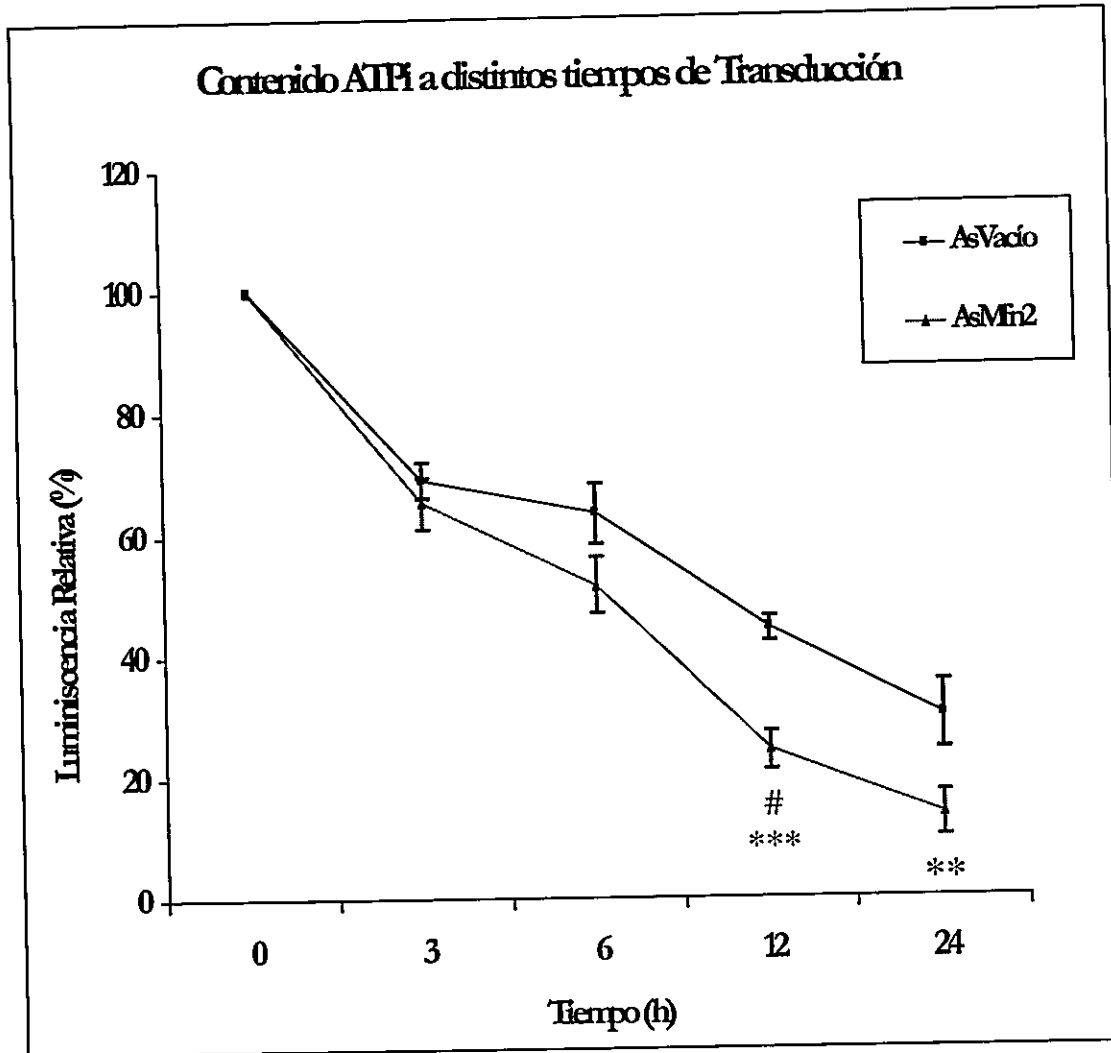


Figura 13. Contenido de ATP intracelular a distintos tiempos de transducción con AsMfn2.

Determinación de la concentración intracelular de ATP mediante ensayo de luminiscencia en cardiomiocitos neonatos tratados con AsMfn2 y Adeno Vacío a las 3, 6, 12 y 24 h post-transducción. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 3), [#]p<0.05 vs vacío, ^{**}p<0.01 y ^{***}p<0.001 vs control.

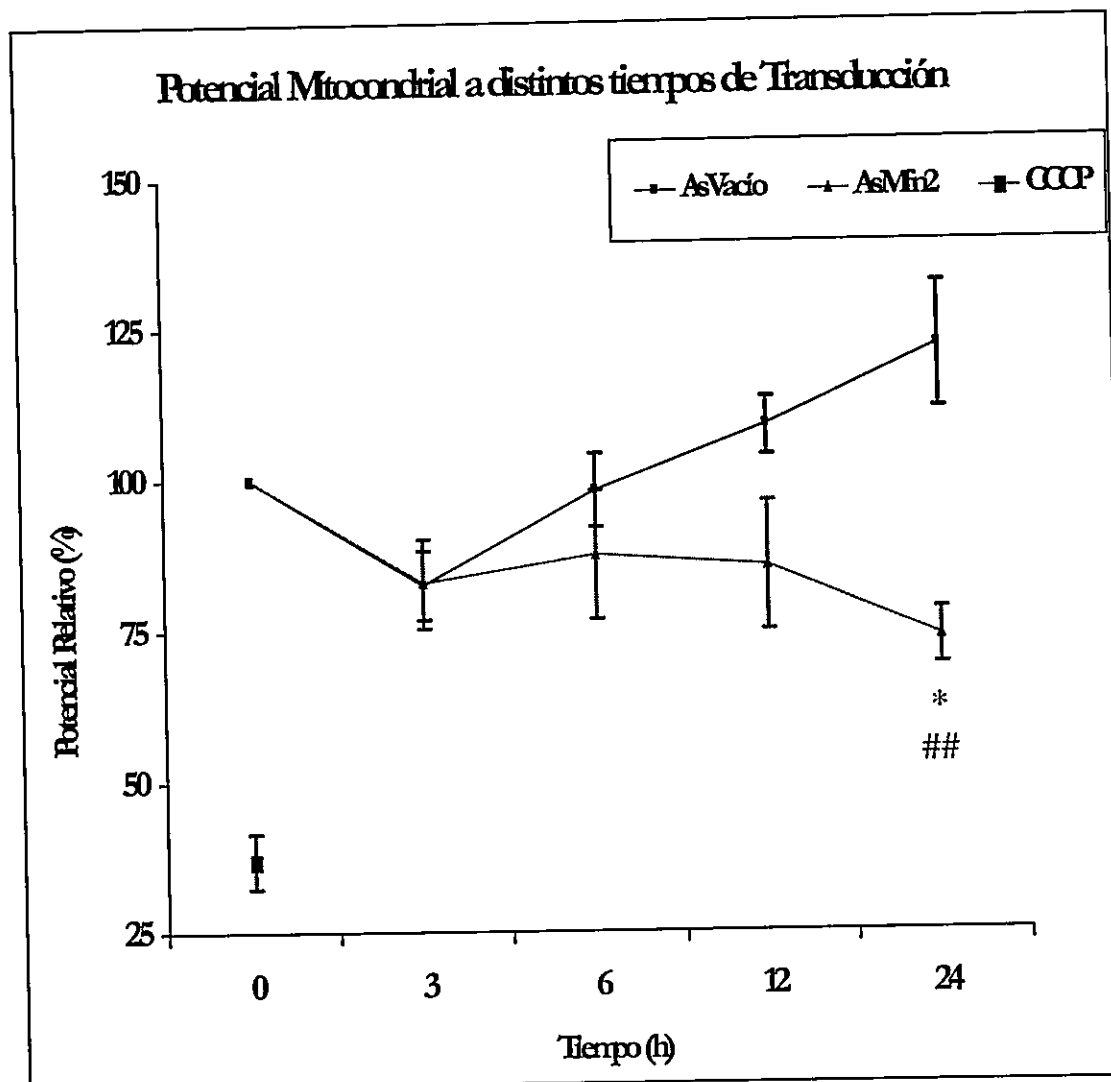


Figura 14. Potencial Mitocondrial a distintos tiempos de transducción con AsMfn2.

Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante Citometría de flujo y TMRM en cardiomiocitos neonatos tratados con AsMfn2 y Adeno Vacío a las a las 3, 6, 12 y 24 h post-transducción. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 3), * $p < 0.05$ vs control y ## $p < 0.01$ vs vacío.

5.3 EFECTO DE C₂-CERAMIDA EN LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS

Las ceramidas son glucolípidos sintetizados en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias, las cuales se ubican principalmente en la cara intracelular de la membrana plasmática [Holland y Summers, 2008]. Las ceramidas pueden ser liberadas por diversos factores externos a través de receptores de membrana y directamente por glucocorticoides [Holland y Summers, 2008]. Las vías de las proteínas Fas y TNF también pueden desencadenar la liberación de las ceramidas. Estas proteínas están relacionadas con la vía intrínseca de la apoptosis. Una vez liberadas, las ceramidas provocan cambios iónicos en la matriz mitocondrial y en el citoplasma, lo cual produce una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, junto con un aumento de ROS y un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna que facilita la liberación del citocromo c desde este organelo y del factor inductor de la apoptosis (AIF), se produce la activación de las caspasas 8 y 10, las cuales activan a las caspasas efectoras 3 y 9, lo que conduce finalmente a la activación final de la vía intrínseca de la apoptosis [Holland y Summers, 2008; Siskind y col, 2008]. Por otro lado, las ceramidas intracelulares, fuertemente asociadas a membranas, son altamente hidrófobas, por lo que utilizamos un análogo estructural de cadena corta permeable a la membrana, la C₂-ceramida, y su compuesto biológicamente inactivo, la DH-C₂-ceramida. La iniciación de la apoptosis por parte de la C₂-ceramida ocurre a partir de las 6 h de su aplicación [Siskind y col, 2008; Parra, 2006], por lo tanto, a tiempos de tratamiento menores a éste, estaríamos monitoreando los cambios celulares previos a la muerte celular. Mediante la visualización

por microscopía confocal, se puede apreciar en la figura 15, que las células tratadas con C_2 -ceramida presentan fragmentación en la red mitocondrial.

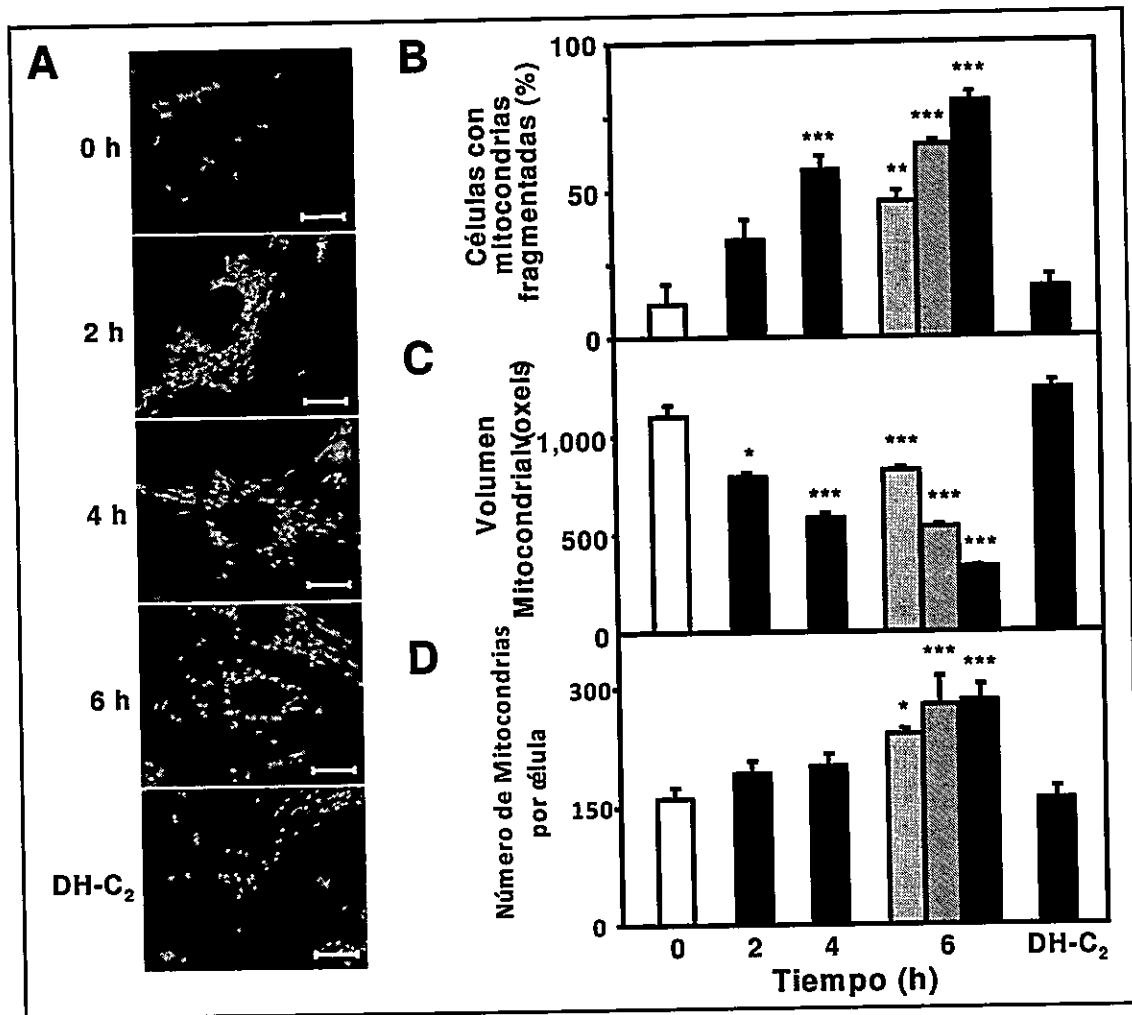


Figura 15. Efecto de C_2 -ceramida en la fragmentación mitocondrial a través del tiempo en cardiomiocitos neonatos.

(A) Células incubadas con C_2 -ceramida (40 μ M) a los tiempos indicados o con DH- C_2 -ceramida (40 μ M por 6 h) y marcadas con la sonda mitotracker green. Las reconstituciones de las imágenes fueron obtenidas por microscopia confocal para mostrar la morfología mitocondrial. La escala corresponde a 10 μ m. (B) El porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas, (C) El volumen de mitocondrias individuales, y (D) El número de mitocondria por célula fueron determinadas en células incubadas sin (barra blanca) o con C_2 -ceramida (barra gris: 20 μ M por 6 h; barra gris oscuro: 30 μ M por 6 h; barra negra: 40 μ M por 2-6 h) o DH- C_2 -ceramida (barra negra: 40 μ M por 6 h). Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 4), * p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001 vs control. Tomado de Parra y cols (2008).

5.4 EFECTO DE C₂-CERAMIDA EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS

Conocido el efecto de las ceramidas en la estructura mitocondrial, tanto en la permeabilización de la membrana interna, liberando proteínas constituyentes de ella como el citocromo c, parte del complejo IV de la cadena transportadora, responsable del consumo de oxígeno, razón por la cual esperaríamos que disminuyera. Esta medición no se realizó debido a la cantidad de células y el tiempo que demanda la técnica. Nos parece poco efectivo realizar la medición de ROS, debido a que la liberación de las ceramidas por la vía intrínseca de la apoptosis produce ROS exógeno a la mitocondria, y no los podemos diferenciar del ROS producido en este organelo. Por lo tanto, los únicos parámetros que monitoreamos son el contenido de ATP intracelular y el potencial de membrana mitocondrial. En el caso del contenido de ATP intracelular, observamos un aumento de un 20% a partir de las 2 h de tratamiento con C₂-ceramida, produciéndose un plateau entorno al 25% de aumento a partir de las 4 h de tratamiento (Figura 16). Este aumento en la producción de ATP, es esperable ya que la activación de las diversas caspasas iniciadoras y efectoras, y otras proteínas que participan en el proceso de apoptosis son dependientes de ATP, por lo que su síntesis previa es esencial para llevar a cabo el proceso. En el caso, del potencial de membrana mitocondrial, se observa una disminución a las 4 h de incubación con C₂-ceramida, caída que es recuperada a las 6 h de tratamiento (Figura 17), esta recuperación en el potencial de membrana podría ser explicada porque la célula destina parte del ATP disponible, a restablecer el potencial de membrana. Posterior a las 6 h de incubación con C₂-ceramida, esperaríamos que

disminuyera definitivamente el potencial, tal como se ha descrito, para células en el proceso de apoptosis.

5.5 EFECTO CONJUNTO DE AsMfn2 CON C₂-CERAMIDA EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS NEONATOS

Al igual que en el estudio del efecto de la C₂-ceramida, los únicos parámetros metabólicos que monitoreados fueron el contenido de ATP intracelular y el potencial de membrana mitocondrial. En el caso del contenido de ATP, se puede apreciar que el efecto del AsMfn2 es más notorio que el de C₂-ceramida como lo muestra la Figura 18, el nivel de ATP baja de forma significativa debido a la acción de AsMfn2, pero se aprecia una tendencia a que este nivel de ATP comience a aumentar, debido a la acción de la C₂-ceramida en el tiempo, indicando los preparativos previos a la apoptosis. Por lo tanto, a tiempos tempranos el efecto de AsMfn2 es más notorio pero a medida que transcurre el tiempo, C₂-ceramida comienza a ejercer su acción. En el caso del potencial de membrana, se puede apreciar en la Figura 19, que el efecto del AsMfn2 enmascara totalmente el efecto de C₂-ceramida. Por lo tanto, se puede inferir que el tratamiento con el AsMfn2 disminuye en forma significativa el flujo de electrones la cadena respiratoria de forma permanente.

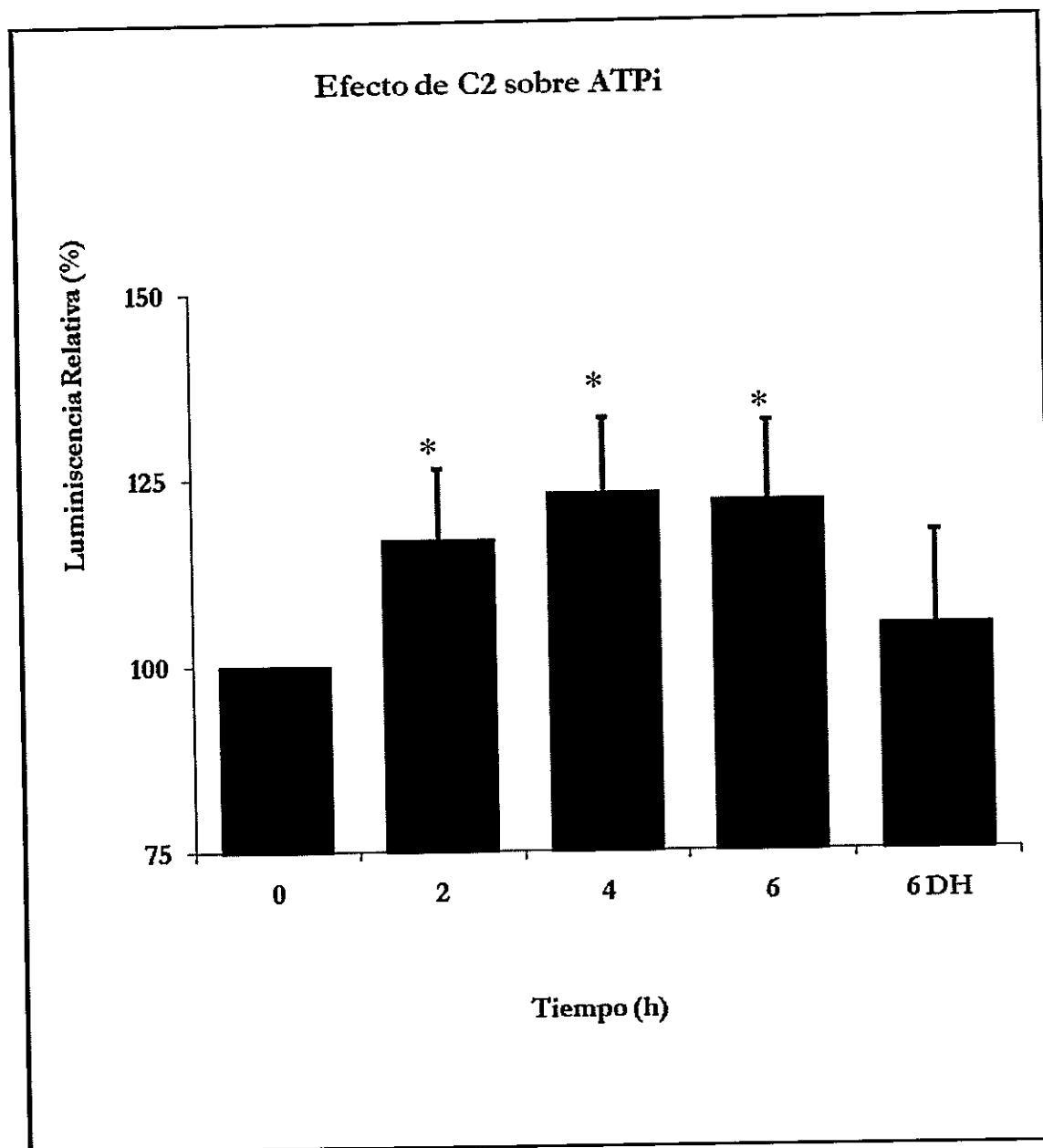


Figura 16. Efecto de C₂-ceramida en el contenido de ATP intracelular.

Determinación de la concentración intracelular de ATP mediante ensayo de luminiscencia en cardiomiocitos neonatos tratados con C₂-ceramida y su análogo inactivo DH-C₂-ceramida. Los resultados corresponden a valores promedio ± SEM (N = 7), *p<0.05 v/s control.

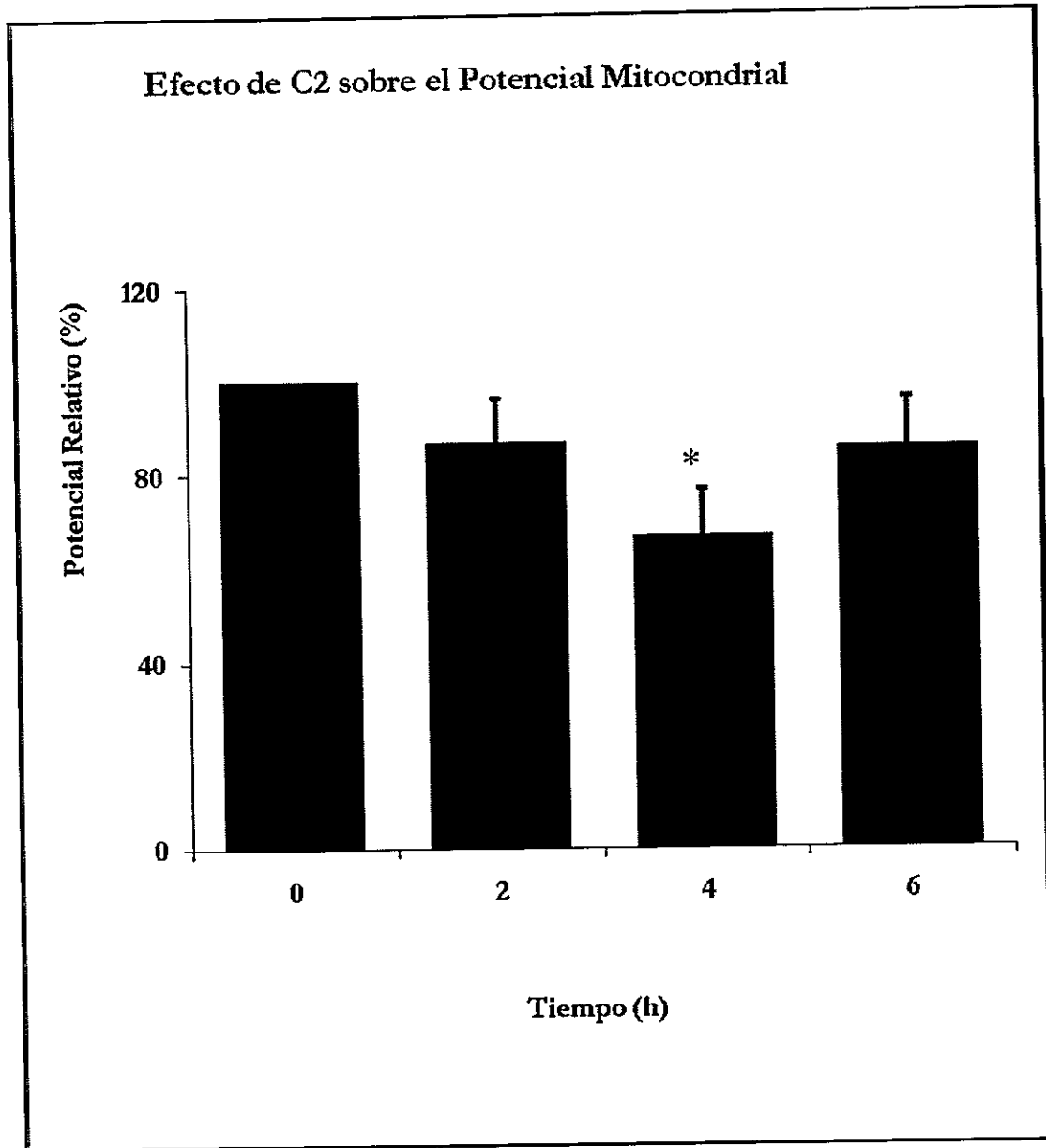


Figura 17. Efecto de C₂-ceramida en el potencial de membrana mitocondrial.

Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante Citometría de flujo y TMRM en cardiomiocitos neonatos tratados con C₂-ceramida y su análogo inactivo DH-C₂-ceramida. Los resultados corresponden a valores promedio \pm SEM (N = 4), *p<0.05 v/s control.

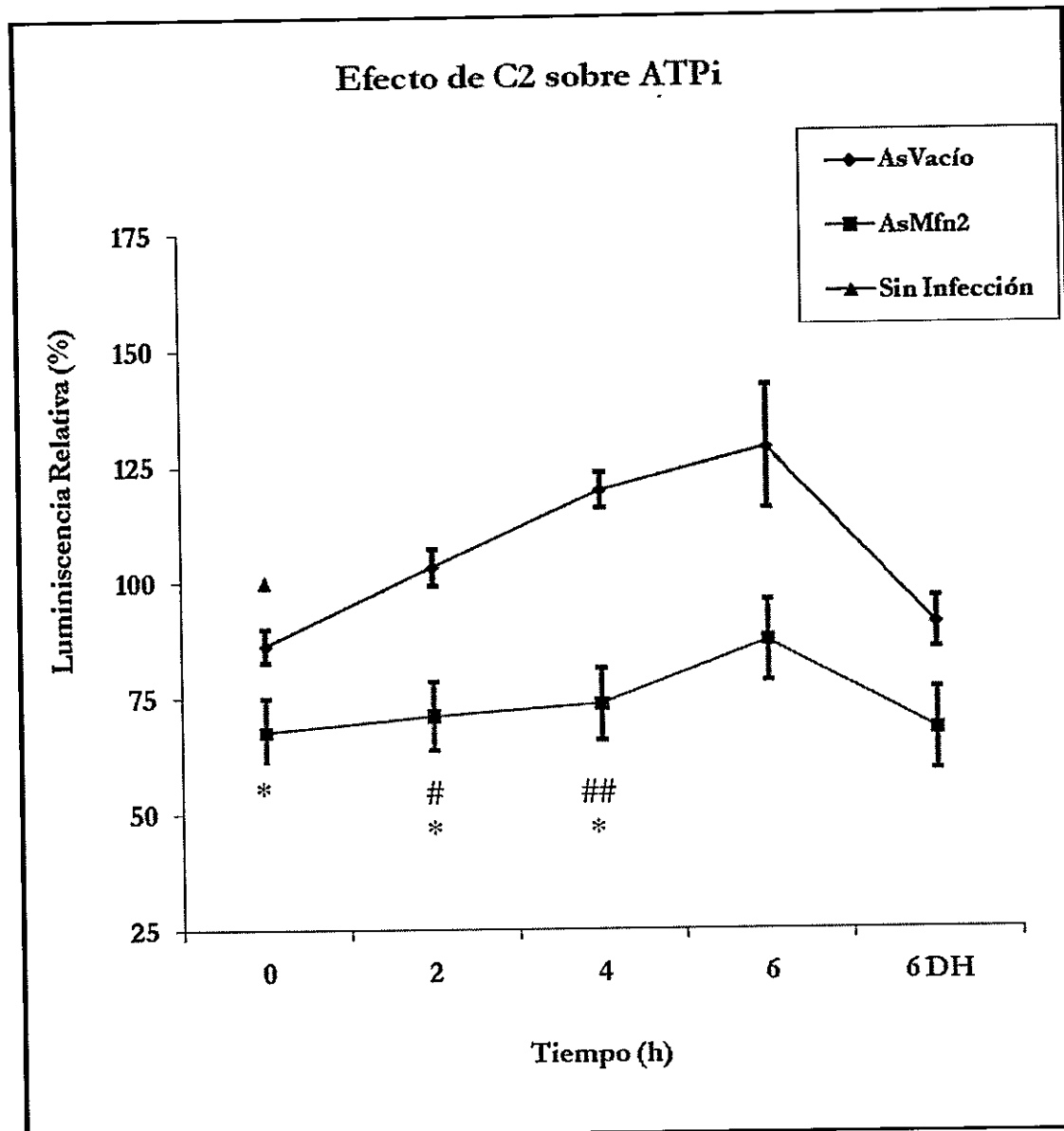


Figura 18. Efecto de conjunto de AsMfn2 y C₂-ceramida en el contenido de ATP intracelular.
 Determinación de la concentración intracelular de ATP mediante ensayo de luminiscencia en cardiomiocitos neonatos estimulados con C₂-ceramida y su análogo inactivo DH-C₂-ceramida, luego del tratamiento con AsMfn2 y Adeno Vacío a las 24 h post transducción. Los resultados corresponden a valores promedio ± SEM (N = 7), *p<0.05 v/s control, # p<0.05 y ##p<0.01 v/s vacío.

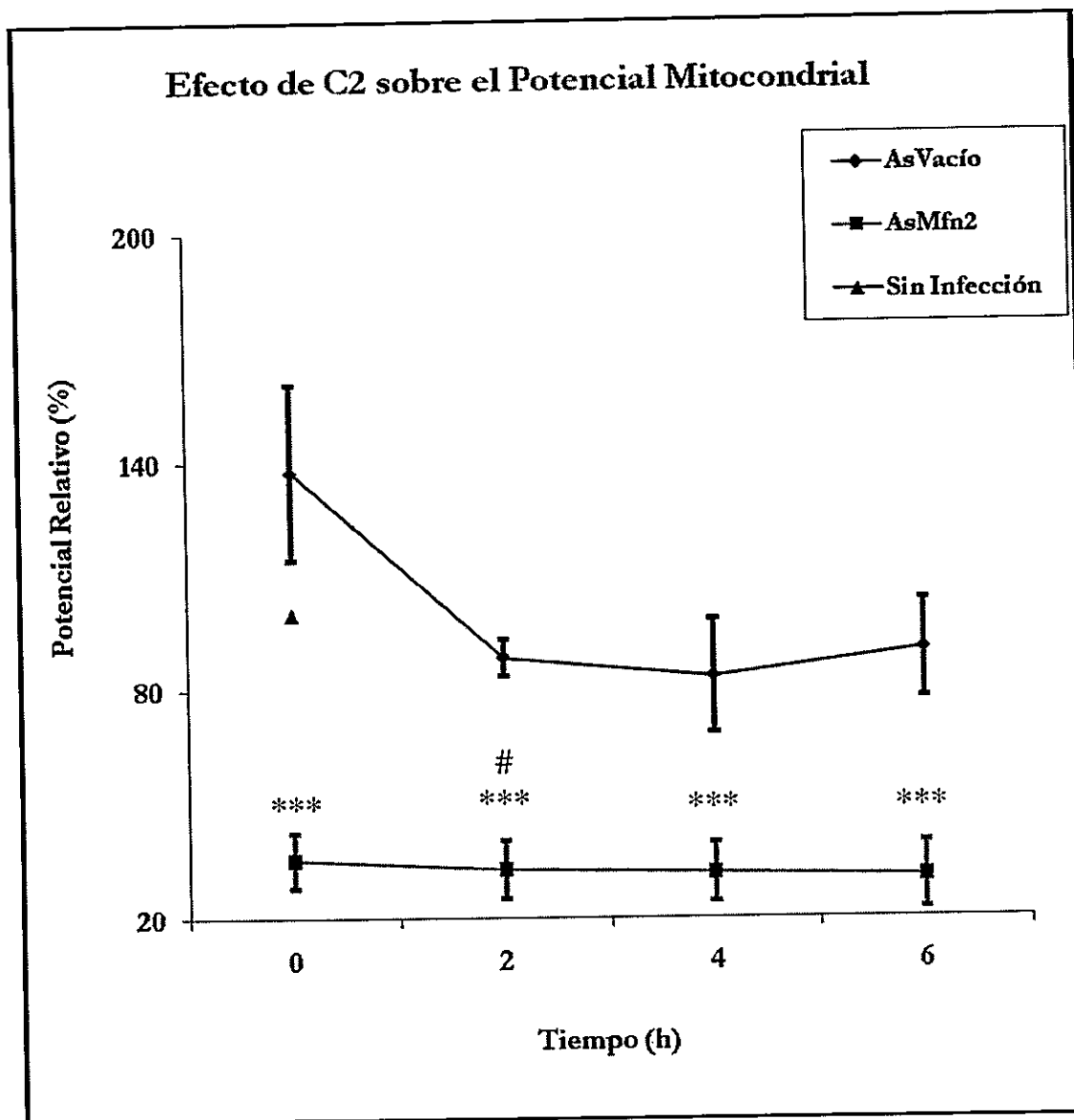


Figura 19. Efecto de conjunto de AsMfn2 y C₂-ceramida en el potencial mitochondrial.

Determinación del potencial de membrana mitochondrial mediante Citometría de flujo y TMRM en cardiomiocitos neonatos estimulados con C₂-ceramida y su análogo inactivo DH-C₂-ceramida, luego del tratamiento con AsMfn2 y Adeno Vacío a las 24 h post transducción. Los resultados corresponden a valores promedio ± SEM (N = 4), ***p<0.001 v/s control y #p<0.05 v/s vacío.

6. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios en los cuales se investiga la dinámica mitocondrial, que involucran procesos balanceados y reversibles de fisión y fusión, lo hacen desde una perspectiva morfológica del organelo o desde una aproximación molecular, haciendo una caracterización de las proteínas que intervienen en dicha morfolología. Muy pocos trabajos se han centrado en la implicancia que podrían tener estos eventos dinámicos, en la bioenergética celular [Benard y col, 2007; Pich y col, 2005]. Teniendo en cuenta que las mitocondrias son la principal fuente de energía intracelular [Marín-García y Goldenthal, 2002], surge la necesidad de conocer el papel que cumple la dinámica mitocondrial en el funcionamiento bioenergético de diferentes tipos celulares, principalmente en aquellos que poseen un gran número de estos organelos, como lo son los cardiomiocitos y células musculares, siendo los primeros el tipo celular más importante para el funcionamiento del órgano que constituye el "motor" de la vida, el corazón [Parra, 2006].

Los procesos de fusión y fisión mitocondrial no se habían considerado en estudios metabólicos clásicos, debido a la falta del equipamiento necesario para su visualización y el modo en que dichos estudios han sido realizados [Medina, 2008]. Estos últimos, se han centrado principalmente en la medición de las actividades enzimáticas y en el seguimiento del funcionamiento de los componentes de la cadena respiratoria *in vitro* o de una forma que no conserva la integridad intracelular [Berg y col, 2002; Alberts y col, 2004].

El objetivo principal de la presente investigación fue estudiar el metabolismo celular en condiciones no invasivas para la arquitectura intracelular, manteniendo principalmente, la integridad del organelo mitocondrial y tratando de reproducir de forma nativa el ambiente fisiológico de la célula cardíaca.

Como se ha mencionado anteriormente, los parámetros metabólicos en los cuales se centró esta tesis, son aquellos en que la mitocondria tiene un papel protagónico al nivel del metabolismo celular, siendo éstos el contenido del ATP intracelular, el potencial de membrana mitocondrial, el consumo de oxígeno y la producción de ROS.

La metodología experimental utilizada consistió básicamente en la intervención de la dinámica mitocondrial induciendo la fisión mitocondrial mediante dos estímulos, el uso de un adenovirus antisentido para la proteína Mfn2 y el uso de C₂-ceramida. A pesar de que las acciones de estos tratamientos no se encuentran relacionados directamente, ambos inducen un claro efecto sobre la fisión de la red mitocondrial, lo cual fue comprobado mediante el uso de microscopía confocal. Una vez fisiónada la red, se realizaron los ensayos que dieran cuenta del estado metabólico de la célula mediante la medición de los parámetros ya mencionados.

El principal hallazgo de este trabajo fue el efecto diferencial sobre el metabolismo del cardiomiocito de dos estímulos que inducen fisión de la red mitocondrial. Un estímulo, el AsMfn2, fragmenta la red organelar de forma irreversible, haciendo que disminuyan todos los niveles metabólicos monitoreados pero sin afectar la viabilidad celular, mientras que el segundo estímulo, la C₂-ceramida, fragmenta la red previo a un proceso de muerte celular y haciendo que aumente la producción energética de ATP. Esta última sería

necesaria para la activación de proteínas implicadas en el proceso de muerte celular programada tipo I o apoptosis [Narula y col, 1999; Siskind y col, 2008, Siskind y col, 2006]. Se ha descrito que C₂-ceramida formaría poros estables en la membrana mitocondrial externa, lo que permite especular un probable posterior desacoplamiento de la cadena respiratoria debido a la liberación de las proteínas constituyentes de algunos de los complejos de la cadena respiratoria al citoplasma [Gazaryan y Brown, 2007; Siskind y col, 2008, Siskind y col, 2006]. Todos estos análisis se realizaron utilizando técnicas que dan cuenta del estado metabólico intracelular y que conservan la arquitectura celular.

6.1 EFECTO DE ASMFN2 EN EL METABOLISMO CELULAR

En los resultados obtenidos encontramos que el AsMfn2 produce una disminución del flujo de electrones en la cadena respiratoria, ya que produce una disminución de los parámetros monitoreados. Adicionalmente se observó una dependencia lineal en la caída del contenido de ATP intracelular con el tiempo de exposición de las células al AsMfn2, lo cual indica que la ausencia de esta proteína causa una sensible pérdida de la capacidad de producción energética celular. En cuanto al potencial de membrana mitocondrial, se observó que ocurre una conservación del potencial de membrana a tiempos tempranos, ocurriendo dicha disminución a partir de las 24 h. Esta conservación del potencial mitocondrial a tiempos tempranos puede ser entendido desde un punto de vista de supervivencia celular, ya que la gradiente protónica que genera el potencial de membrana interna mitocondrial, constituye la mayor fuente de la principal molécula energética utilizada por la célula, el ATP [Alberts y col, 2004], por lo tanto, la célula destina parte del

alicaído stock de esta molécula, a la mantención del diferencial protónico de membrana, y así mantener la producción de ATP, acorde al requerimiento intracelular. Esta caída es irreversible, llegando a un valor crítico, ya que células con idéntico tratamiento y que posteriormente son estimuladas con C₂-ceramida, estímulo que también causa una caída transiente en el potencial mitocondrial, no muestran un efecto aditivo en la disminución de este parámetro. Por otro lado, el consumo de oxígeno y la producción de ROS, también se ven afectados, indicando que los complejos que son alterados por la disminución de la proteína Mfn2, son los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones, los cuales son altamente dependientes de la morfología de la membrana interna [Rodríguez-Hernández y col, 2009]. Esto es, una alteración en la capacidad de fusión de la membrana externa, obliga a un remodelado morfológica de la membrana interna, hecho que afecta los parámetros anteriormente mencionados. Estos resultados son concordantes con lo descrito en la literatura, sobre la represión de Mfn2 inhibe los complejos I, II, III y V de la cadena transportadora de electrones en células musculares [Pich y col, 2005], por lo que el potencial de membrana disminuiría por la falta de fuerza redox en los complejos I y II, disminuiría el consumo de oxígeno y la generación de ROS por la inhibición del complejo III, disminuiría el contenido de ATP intracelular por la inhibición del complejo V.

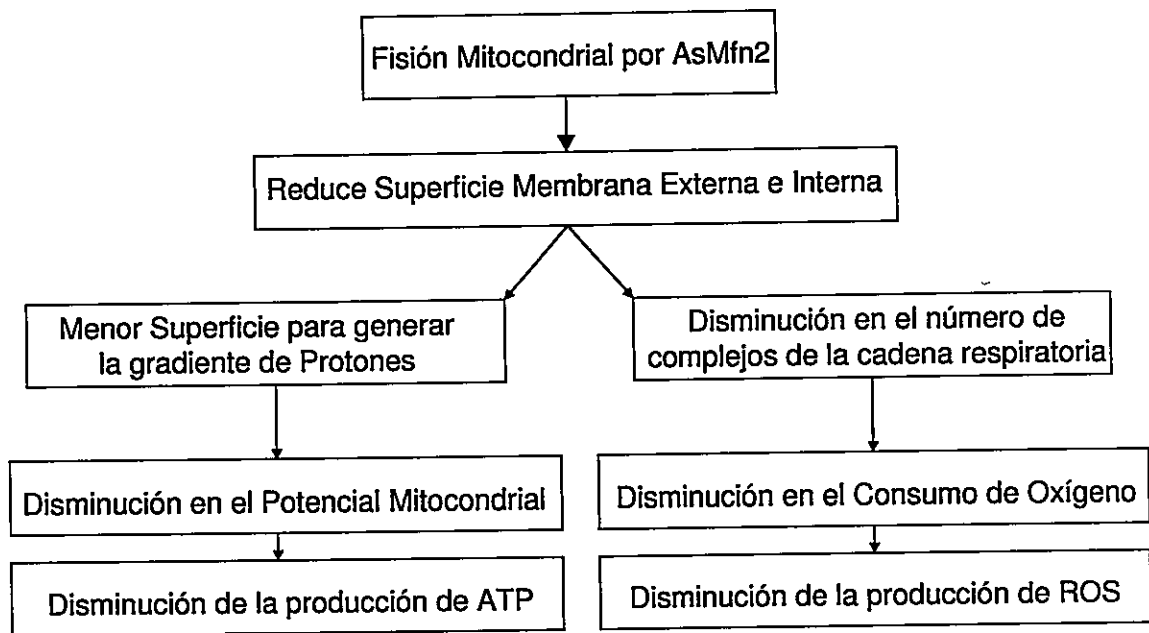


Figura 20. Esquema de acción de AsMfn2 en el metabolismo.

6.2 EFECTO DE C₂-CERAMIDA EN EL METABOLISMO CELULAR

En el caso de la C₂-ceramida, su forma de acción es sustancialmente diferente, pero el efecto morfológico de fondo, la fragmentación de la red mitocondrial, es similar. Observando el efecto de la C₂-ceramida en el potencial, observamos un efecto conservativo del potencial que incluye una disminución transitoria y reversible a las 4 h, el cual posteriormente se recupera a las 6 h, debido al gasto de ATP para recuperar el potencial de membrana. Esta mantención en un rango normal del potencial mitocondrial, explicaría la alta capacidad productiva de ATP, que será utilizado posteriormente para activar proteínas efectoras de la muerte celular por vía mitocondrial, parámetro que se ve

incrementado por este estímulo. Como hemos mencionado en este trabajo, las células tratadas con C₂-ceramida en los tiempos evaluados, muestran un proceso de preparación metabólica previo a un proceso de muerte celular mediada por la vía mitocondrial. El consumo de oxígeno, si bien es cierto no fue medido con este estímulo, esperaríamos que se mantuvieran a tiempos tempranos debido a la incrementada producción de ROS en toda la célula, para disminuir posteriormente a tiempos tardíos, debido a la liberación de algunas de las proteínas constituyentes de la cadena respiratoria por los poros generados por C₂-ceramida. En cuanto a la producción de ROS, el componente mitocondrial no sería claro, ya que la acción de la C₂-ceramida induce la producción de ROS citosólico, el cual puede inducir la vía mitocondrial de muerte celular por la activación de JNK dependiente de ROS. [Chen y col, 2009; Holland y Summers, 2008; Siskind y col, 2008].

En el modo de acción de C₂-ceramida implica una mantención del potencial mitocondrial a tiempos tempranos, una mantención del consumo de oxígeno, y un alza en la producción de ATP y ROS. Por lo tanto, estimularía el metabolismo a tiempos tempranos, llevando el sistema metabólico a la saturación y, posterior catástrofe por la formación del poro en la membrana externa, dando inicio a la muerte celular por liberación de proteínas mitocondriales.

Si bien es cierto estos resultados de modificación de los parámetros metabólicos de forma individual, pueden ser justificados por antecedentes bibliográficos, podemos señalar que aquí se describe por primera vez que distintos y no relacionados cambios en el metabolismo como lo son la inhibición del flujo electrónico irreversible por el AsMfn2, y la inducción de apoptosis por la C₂-ceramida convergen en una morfología mitocondrial

común, la fisión mitocondrial. Las técnicas utilizadas en esta tesis abren la posibilidad de caracterizar el metabolismo celular en un sin número de condiciones, permitiendo conocer a cabalidad la implicancia metabólica de la dinámica mitocondrial. También resulta interesante la situación inversa, en que si la fusión podría aumentar estos parámetros metabólicos, analizar la posibilidad de que ocurra un “rescate” en el metabolismo de células que tengan su red mitocondrial fragmentada, en otras palabras, ver la posibilidad de que la fusión mejore el funcionamiento de una cadena con flujo de electrones deficiente. Para este objetivo, es posible, la transducción con un adenovirus que disminuya los niveles de una proteína que forme parte de la maquinaria de fisión mitocondrial (como un dominante negativo de Drp1), y medir los parámetros metabólicos durante este proceso, lo cual permitiría caracterizar la implicancia de la fusión mitocondrial en el metabolismo. También resultaría interesante la utilización de inhibidores químicos específicos para cada complejo de la cadena respiratoria blanco de nuestras mediciones, como oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa) y mixotiazol (inhibidor del complejo III implicado en el consumo de oxígeno y la producción de ROS), con el fin de identificar el aporte de las fuentes celulares de producción ATP, consumo de oxígeno y producción de ROS, exógenos a la mitocondria para evaluar la importancia de este organelo en las mediciones obtenidas.

Una interesante aplicación a este conocimiento de la implicancia metabólica de la dinámica mitocondrial viene dado por estudios recientes, en que se ha descrito una importante reducción en proteínas implicadas en la fusión mitocondrial (Mfn2 y PARL) en estados de resistencia a insulina [Bach y col, 2003]. También, existe evidencia que una disminución de fusión mitocondrial sería un factor etiológico importante en el desarrollo de obesidad, resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo-2 y enfermedades asociadas al

envejecimiento. Esta disminución en la fusión mitocondrial, afectaría la capacidad metabólica de la célula. Por lo tanto, el estudio de la modulación de la morfología mitocondrial por insulina en el corazón, es un interesante blanco de estudio, con las herramientas aquí propuestas.

7. CONCLUSIONES

La disminución de los niveles de la proteína de la fusión mitocondrial Mfn2, mediada por un adenovirus antisentido específico produce:

- 1) Fragmentación de la red mitocondrial.
- 2) Inhibición del flujo electrónico irreversible entre los complejos de la cadena respiratoria.
- 3) Disminución del contenido de ATP intracelular en un 30%.
- 4) Disminución del potencial de membrana interna mitocondrial en un 60%.
- 5) Disminución del consumo de oxígeno en un 50%.
- 6) Disminución de la producción de ROS en un 60%.

Por otro lado, y a diferencia del AsMfn2, C₂-ceramida a una concentración de 40 M produce:

- 1) Fragmentación de la red mitocondrial.
- 2) Una conservación del potencial de membrana a tiempos tempranos, disminuyendo posteriormente una vez iniciada el proceso apoptótico.
- 3) Un aumento en la producción de ATP en un 25% a tiempos tempranos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, USA.
- Amiott E, Lott P, Soto J, Kang P, McCaffery M, DiMauro S, Abel D, Flanigan K, Lawson V, Shaw J. 2008. Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Experimental Neurology*. (Aceptado para publicación).
- Archer S, Gombert-Maitland M, Maitland M, Rich S, García J, Weir K. 2007. Mitochondrial Metabolism, Redox Signaling and Fusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (Aceptado para publicación).
- Bach D, Pich S, Soriano F, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard J, Lloberas J, Camps M, Zierath J, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacín M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A. 2003. Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* 278(19): 17190-17197.
- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R. 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of Cell Science* 48(2): 30-35.
- Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Delage J, Casteilla L, Letellier T, Rossignol R. 2006. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: 1172-1182.
- Benard G, Rossignol R. 2008. Ultrastructure of the Mitochondrion and Its Bearing on Function and Bioenergetics. *Antioxidans & Redox Signaling* 10(8): 1313-1343.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L. 2002. *Biochemistry*. W.H. Freeman. New York.
- Chen H, Chan D. 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human Molecular Genetics* 14(2): 283-289.
- Chen T, Chi K, Wang J, Chien C, Lin W. 2009. Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses. *Free Radical Biology & Medicine* (Aceptado para publicación).
- Detmer S, Chan D. 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 870-879.
- Duchen M. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine* 25: 365-451.

- Fang L, Moore X, Gao X, Dart A, Leng Lim Y, Du X. 2007. Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Sciences* 80: 2154-2160.
- Garlid K, Costa A, Quinlan C, Pierre S, Dos Santos P. 2008. Cardioprotective signaling to mitochondria. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Aceptado para publicación).
- Gazaryan I, Brown A. 2007. Intersection between Mitochondrial Permeability Pores and Mitochondrial Fusion/Fission. *Neurochem Res* 32: 917-929.
- Guillery O, Malka F, Frachon P, Milea D, Rojo M, Lombe A. Brown (2007). "Intersection between Mitochondrial Permeability Pores and Mitochondrial Fusion/Fission." *Neurochem Res* 32: 917-929.
- Hamana L, Suárez C. 2002. Patología mitocondrial en las enfermedades del miocardio. *Gaceta Médica Caracas* 110(4): 478-493.
- Holland W, Summers S. 2008. Sphingolipids, Insulin Resistance, and C. Suárez (2002). "Patología mitocondrial en las enfermedades del miocardio." *Gaceta Médica Caracas* 110(4): 478-493.
- Knott A, Bossy-Wetzel E. 2008. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147: 283-292.
- Knott A, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. 2008. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 505-518.
- Kodde I, Van der Stock J, Smolenski R, de Jong J. 2007. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 26-39.
- Koopman W, Visch H, Verkaart S, van den Heuvel P, Smeitink J, Willems P. 2005. Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: 881-890.
- Loucks FA, Schroeder EK, Zommer AE, Hilger S, Kelsey NA, Bouchard RJ, Blackstone C, Brewster JL, Linseman DA. 2009. Caspases indirectly regulate cleavage of the mitochondrial fusion GTPase OPA1 in neurons undergoing apoptosis. *Brain research* 1250: 63-74.
- Marín-García J, Goldenthal M. 2002. La mitocondria y el corazón. *Revista Española de Cardiología* 55(12): 1293-1310.
- Martins de Brito O, Scorrano L. 2008. Mitofusin-2, A Mitochondria-Shaping Protein with Signaling Roles Beyond Fusion. *Antioxidans & Redox Signaling* 10(3): 1-13.
- McBride H, Neuspiel M, Wasiak S. 2006. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* 16: 551-560.

Medina M. 2008. Fosforilación Oxidativa.

http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/Biofvirtual/Tema-FO/FO.htm

Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie F, Dal Bello B, Semigran M, Bielsa-Masdeu A, Dec W, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. 1999. Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8144-8149.

Newsholme P, Haber E, Hirabara S, Rebelato E, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio H, Carpinelli A, Curi R. 2007. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 583(1): 9-24.

Parra V. 2006. Fisión Mitocondrial en la Muerte Celular Programada del Cardiomiocito. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago, Universidad de Chile. Título de Bioquímico: 79.

Parra V, Eisner V, Chiong M, Criollo A, Moraga F, García A, Härtel S, Jaimovich E, Zorzano A, Hidalgo C, Lavandero S. 2008. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovascular Research* 15:77(2): 387-397.

Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A. 2005. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Human Molecular Genetics* 14(11): 1405-1415.

Rodríguez-Hernández A, Cordero M, Salviati L, Artuch R, Pineda M, Briones P, Gómez Izquierdo L, Cotán D, Navas P, Sánchez-Alcázar J. 2009. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* 5(1): 19-32.

Shen T, Zheng M, Cao C, Chen C, Tang J, Zhang W, Cheng H, Chen K, Xiao R. 2007. Mitofusin-2 is a Major Determinant of Oxidative Stress-mediated Heart Muscle Cell Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 282(32): 23354-23361.

Siskind L, Feinstein L, Yu T, Davis J, Jones D, Choi J, Zuckerman J, Tan W, Hill B, Hardwick M, Colombini M. 2008. Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins Disassemble Ceramide Channels. *The Journal of Biological Chemistry* 283(11): 6622-6630.

Siskind L, Kolesnick R, Colombini M. 2006. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 6: 118-125.

Twig G, Hyde B, Shirihai O. 2008. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. *Biochimica et Biophysica Acta* (Aceptado para publicación).

Wang X, Su B, Siedlak S, Moreira P, Fujioka H, Wang Y, Casadeus G, Zhu X. 2008. Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(49): 19318-19323.

Zorzano A, Bach D, Pich S, Palacín M. 2004. Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético. *Revista Médica Universidad de Navarra* 48(2): 30-35.