

**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA  
CARDIOPATÍA ISQUÉMICA:  
ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON  
HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES Y  
ANÁLISIS DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL  
DE LOS CORAZONES PATOLÓGICOS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**Mariana Fernández Caggiano**

**DIRECTORA**

**Nieves Doménech García**

**LA CORUÑA, 2013**







Dra **Nieves Doménech García**, Investigadora del Programa de Estabilización Miguel Servet y Directora del Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña,

**CERTIFICA:**

Como directora de la Tesis Doctoral que lleva por título: **“PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES Y ANÁLISIS DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL DE LOS CORAZONES PATOLÓGICOS”** presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas **Dña. Mariana Fernández Caggiano**, que dicho trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña. El presente trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente para optar al grado de doctora por la Universidad de A Coruña.

Y para que así conste firmo el presente informe en A Coruña, a 11 de Enero de 2013.

Vº Bº Directora del trabajo

Asdo. Dra. Nieves Doménech García

Dr. **Isaac Fuentes Boquete**, profesor del Departamento de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud en la Universidad de A Coruña,

**CERTIFICA:**

Como tutor de la Tesis Doctoral que lleva por título: **“PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CON HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES Y ANÁLISIS DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL DE LOS CORAZONES PATOLÓGICOS”** presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas **Dña. Mariana Fernández Caggiano**, que dicho trabajo ha sido realizado bajo mi tutela. El trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente para optar al grado de doctora por la Universidad de A Coruña.

Y para que así conste firmo el presente informe en A Coruña, a 11 de Enero de 2013.

Vº Bº Tutor del trabajo

Dr. Isaac Fuentes Boquete  
Profesor del Departamento de Medicina  
Facultad Ciencias de la Salud

*A Javi.*





# AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, me gustaría agradecer a Nieves, mi Directora de Tesis, por haberme dado la oportunidad de empezar de investigar en el campo de la cardiología, proporcionarme los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo, por entenderme, escucharme en incontables situaciones y muchas de ellas no sólo como directora. A Isaac, mi tutor, por facilitarme las cuestiones burocráticas que conlleva la solicitud de becas y la presentación de una tesis.*

*Gracias a Guillermo y a Ramón por su profesionalidad, inestimable ayuda en el desarrollo del modelo animal y perseverancia cuando las cosas no salían bien. A Eduardo, Alberto y todo el equipo de la Unidad de Cirugía Experimental por todo el apoyo logístico prestado para realizar nuestros experimentos.*

*A Philip Eaton y a todo su grupo por permitirme formar parte de él y ayudarme a mejorar como investigadora. A mis compañeros del St Thomas' Hospital, en especial Aminah, Yemi y Lyn por las charlas, tartas y comidas que comparten conmigo haciéndome sentir cada día más cómoda.*

*A la gente del INIBIC, por su consejo, ánimo y colaboración. Al grupo de proteómica, Bea, Luci, Vale... por el buen ambiente que crean a su alrededor, siempre con buen humor. A Nacho, por haber tenido una paciencia infinita conmigo sobre todo cuando estaba empezando, por echarme una mano con la parte genética de este trabajo y por estar siempre dispuesto a ayudar. A María, siempre queriendo hacer la inmuno perfecta, gracias. A Nati, por ayudarme con el papeleo que muchas veces sobrepasa mi poder de entendimiento.*

*A las personas que hicieron que la "U" del fondo a la izquierda de planta baja fuera mi sitio favorito del laboratorio. Gracias, porque aunque estuviérais muy apretados siempre hacíais un hueco para mi, escuchándome y ayudándome. Carlitos, Noita, Lauri (pioji), Romi y la otra "infiltrada" Emma... Sin que lo sepan, me han enseñado grandes lecciones de perseverancia, sacrificio, trabajo en equipo y la más importante, de amistad. De hecho, quien me iba a decir a mí que uno de mis dos mejores descubrimientos durante mis años de tesis sería encontrar una gran amiga y surfista amateur.*

*A la gente que me ha dado muchos ánimos y consejos durante la escritura de esta tesis, Ana, Yuki, Berta, Rafa, Julia, Juan y Ceres... Con especial mención a la familia Barallobre-Barreiro por su gran ayuda y comprensión. Marisa, gracias por*

*prestarme tu oído siempre que lo necesité. María gracias por comprender mi desorden y ayudarme en la recta final.*

*A mis amigas, las mejores. Sinceramente creo que una gran parte de esta “Mariana” y por qué no decirlo, el estar ahora escribiendo los agradecimientos de mi tesis, se lo debo a ellas. Iria, Andre, Lidi, Clau, Luiña y María. Siempre han tenido una influencia extremadamente positiva en mi, desde la escuela. No sólo me han ofrecido ayuda incondicional propia de la mejor de las amistades, sino que verlas luchar por sus objetivos y conseguirlos, convirtiéndose en grandes mujeres, me ha hecho pelear por los míos. Iria, déjame dedicarte el 50% de esta tesis.*

*A mis padres, porque las decisiones que han ido tomando me han convertido en lo que soy, me han enseñado que luchando, los sueños se consiguen. A mi hermano, por creer en mí, por su interés en mi trabajo, no me importa explicarle una y mil veces “de qué va mi trabajo”. A mis abuelos que, como lo que fueron, siempre confiaron en mi haciéndome sentir un poquito más segura mientras crecía, me habría gustado que leyeran estas líneas.*

*A Javi. No se me ocurría cómo agradecerle tantas cosas y luego recordé una pequeña historia de Eduardo Galeano que me hace pensar en él:*

*“Un hombre del pueblo de Neguá, en la costa de Colombia, pudo subir al alto cielo. A la vuelta, contó. Dijo que había contemplado, desde allá arriba, la vida humana. Y dijo que somos un mar de fueguitos. —El mundo es eso —reveló—. Un montón de gente, un mar de fueguitos. Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.”*

*Gracias por ser esta última clase de “fueguito”. Gracias por tanto.*

*“Es justamente la posibilidad de realizar un  
sueño lo que hace que la vida sea interesante.”*  
Paulo Coelho



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>A. EL CORAZÓN Y EL TEJIDO CARDIACO</b>	
1. Fisiología del corazón .....	3
2. Organización y funciones de los componentes celulares del corazón.....	6
2.1 Cardiomiocitos .....	6
2.2 Otras células: cardioblastos, células endoteliales y células musculares lisas.....	9
<b>B. LA MITOCONDRIA</b>	
1. Función y morfología .....	11
2. El ADN mitocondrial (ADNmt) humano .....	11
2.1 Estructura y organización del ADNmt.....	11
2.2. Haplogrupos mitocondriales .....	14
2.3. Haplogrupos mitocondriales en el desarrollo de patologías .....	15
3. Fosforilación oxidativa .....	16
3.1. La cadena de transporte mitocondrial .....	16
3.2. Producción de ERO en la mitocondria .....	18
<b>C. CARDIOPATÍA ISQUÉMICA</b>	
1. Definición .....	20
2. Factores de riesgo .....	20
3. Fisiología de la cardiopatía isquémica .....	23
<b>D. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA</b>	
1. Mitocondria, inflamación y aterosclerosis .....	26
2. Mitocondria e Isquemia/Reperfusión .....	27
2.1. Daño por apoptosis tras Isquemia/Reperfusión.....	30
2.2 Daño por necrosis tras Isquemia/Reperfusión .....	31
<b>E. MODELOS EXPERIMENTALES DE CARDIOPATÍA ISQUÉMICA</b>	
1. Modelos de simulación de isquemia miocárdica .....	33
1.1. Modelo Langendorff .....	34
1.2. Modelo de corazón aislado .....	36

1.3. Modelo de oclusión arterial .....	36
1.3.1 Sistemas quirúrgicos de inducción de isquemia o hibernación miocárdica crónicas .....	37
1.3.2 Sistemas quirúrgicos de inducción de isquemia-reperusión .....	38
2. Modelos animales en la cardiopatía isquémica .....	38
2.1 Modelos animales en animales pequeños .....	39
2.2 Modelos en animales grandes .....	40
2.2.1 Anatomía del corazón porcino comparada con la humana .....	42
3. Consideraciones éticas referentes al uso de animales de experimentación .....	45
<b>F. PROTEÓMICA E INVESTIGACIÓN CARDIOVASCULAR</b>	
1. Tecnología en el campo de la Proteómica .....	46
2. Identificación y cuantificación de proteínas .....	48
3. Fraccionamiento en proteómica .....	50
4. Proteómica mitocondrial .....	52
4.1 Proteómica mitocondrial y enfermedades cardiovasculares	53
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	57
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
▪ <b>ASOCIACIÓN DE HAPLOGRUPOS CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA</b>	63
A. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	63
B. DETERMINACIÓN DE HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES..	64
1. Extracción y cuantificación del ADN genómico.....	64
2. PCR Multiplex .....	64
3. Purificación del producto de PCR con ExoSAP-IT .....	66
4. Ensayo de SBE ( <i>Single Base Extension</i> ) .....	66
5. Purificación de los productos de la reacción SBE .....	67
6. Reacción de secuenciación .....	67
7. PCR-RFLP .....	68
C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	69
▪ <b>ANÁLISIS DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL CARDÍACO EN CORAZONES SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN</b>	72
A. MODELO EXPERIMENTAL DE I/R <i>IN VIVO</i> .....	72
1. Población de estudio .....	72
2. Inducción experimental de Isquemia/Reperusión .....	73
3. Sacrificio de los animales .....	74
4. Disección de los corazones y recogida de muestras .....	74

B. MUESTRAS DE TEJIDO CARDÍACO HUMANO .....	75
C. MODELO EXPERIMENTAL DE I/R <i>IN VITRO</i> .....	76
1. Extracción de cardiomiocitos ventriculares adultos de rata .....	76
2. Simulación de Isquemia/Reperfusión en cardiomiocitos .....	76
D. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS .....	77
1. Tinciones histoquímicas .....	77
2. Tinciones inmunológicas .....	78
2.1 Inmunohistoquímica indirecta en tejido cardiaco .....	78
2.2. Inmunofluorescencia indirecta para cardiomiocitos en cultivo .....	79
E. TÉCNICAS DE ANÁLISIS PROTEÓMICO .....	80
1. Aislamiento de las mitocondrias y cuantificación proteica .....	80
2. Separación electroforética .....	81
3. Tinción con azul Comassie y corte de las bandas .....	81
4. Digestión en gel de las proteínas .....	82
5. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y espectrometría de masas en tandem (MS/MS) .....	82
6. Identificación y bases de datos .....	83
7. Análisis de la distribución de proteínas de acuerdo con su función celular .....	84
F. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS .....	86
1. Western blot .....	86
G. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	87
1. Análisis de expresión génica .....	87
1.1. Extracción de ARNm de tejido cardiaco .....	87
1.2. Retrotranscripción .....	87
1.3. Diseño de cebadores de ADN .....	88
1.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) .....	88
1.5. Cálculo de la expresión relativa de los genes de estudio ...	89
H. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	91
1. Análisis estadístico de las diferencias a nivel proteómico, genómico y validación por western blot .....	91
2. Análisis de componentes principales .....	91
3. Mapas térmicos .....	92

#### **IV. RESULTADOS**

▪ <b>ASOCIACIÓN DE HAPLOGRUPOS CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA</b>	
A. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	95
B. ASIGNACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE HAPLOGRUPOS	96

MITOCONDRIALES .....	
1. Eficacia de la técnica de la PCR multiplex y SBE (Single Base Extension) .....	96
2. Distribución de haplogrupos en la población de estudio .....	96
3. Comparación de la frecuencia de haplogrupos en este estudio y otras poblaciones europeas .....	97
4. Distribución de haplogrupos en función de los factores de riesgo clásicos para el desarrollo de CI .....	98
5. Análisis de la frecuencia de SNPs .....	100
▪ <b>ANÁLISIS DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL DE CORAZONES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA</b> .....	102
A. PUESTA A PUNTO DEL MODELO ANIMAL .....	102
B. EVALUACIÓN DEL MODELO ANIMAL .....	102
1. Análisis morfométrico .....	103
2. Electrocardiogramas .....	104
3. Diferencias en la fracción de eyección media a 0, 3 y 15 días post I/R .....	105
4. Análisis histomorfológico del tejido miocárdico .....	106
C. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS Y ANÁLISIS LC-MS/MS .....	108
1. Eficacia del aislamiento de mitocondrias a partir de tejido cardíaco .....	108
2. Identificación de proteínas mitocondriales .....	109
3. Análisis de componentes principales .....	114
4. Análisis de expresión proteica tras isquemia-reperfusión .....	115
5. Procesos mitocondriales implicados 3 y 15 días tras I/R. Mapas térmicos .....	117
D. VALIDACIÓN POR TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO .....	121
1. Validación por Western blot .....	121
2. Validación en tejido porcino y humano por inmunohistoquímica .....	122
3. Análisis de la expresión génica de BRP44L, VDAC1, LONP1 y HSP60 .....	124
4. Análisis de la expresión por inmunofluorescencia de BRP44L, VDAC1, LONP1 y HSP60 en un modelo de Isquemia/Reperfusión en cardiomiocitos de rata .....	125
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	131
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	147
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	149
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	165



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ADNmt:** ADN mitochondrial.

**Apaf-1:** Del inglés *Apoptotic Protease Activating Factor 1*.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**BRP44L:** Del inglés *Brain protein 44-like protein*.

**Ca<sup>+2</sup>:** Iones calcio.

**CI:** Cardiopatía isquémica.

**CMLV:** Célula muscular lisa vascular.

**CRS:** Del inglés Cambridge Reference Sequence.

**Ct:** Ciclo umbral de detección.

**CTM:** Cadena de transporte mitochondrial.

**CTT:** Cloruro de trifeniltetrazolio.

**DAPI:** 4', 6'-diamidino-2-fenilindol.

**ddNTP:** Dideoxínucleósido trifosfato.

**dNTP:** Deoxínucleósido trifosfato.

**ECG:** Electrocardiograma.

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno.

**FADH:** Flavín adenín dinucleótido.

**FE(VI):** Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

**GPX:** Glutación peroxidasa.

**GSH:** Glutación reducido.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**HIFs:** Del inglés *Hypoxia inducible factors*.

**HPLC:** Del inglés *High performance liquid chromatography*. Cromatografía líquida de alta eficacia.

**HRP:** Del inglés *Horseradish peroxidase*. Peroxidasa de rábano.

**HSP-60:** Del inglés *Heat shock protein 60*.

**I/R:** Isquemia-reperfusión

**IC:** Intervalos de confianza

**LC-MS/MS:** Del inglés *Liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. Cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem.

**LDL:** Del inglés *Low density lipoprotein*. Lipoproteína de baja densidad.

**m/z:** Ratio masa/carga.

**MEM:** Membrana externa mitocondrial.

**MET:** Microscopía electrónica de transmisión.

**MIM:** Membrana interna mitocondrial.

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido.

**NO:** Óxido nítrico.

**OR:** Del inglés *Odds Ratio*.

**OXPHOS:** Del inglés *Oxidative phosphorylation*.

**PAGE:** Del inglés *Polyacrylamide gel electrophoresis*. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

**PBS:** Del inglés *Phosphate buffered saline*. Tampón fosfato salino.

**Pi:** Fosfato inorgánico.

**PTP:** Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

**Q:** Ubiquinona.

**QH2:** Ubiquinol.

**qRT-PCR:** Del inglés *Quantitative real-time PCR*. PCR cuantitativa a tiempo real.

**RS:** Retículo sarcoplásmico.

**SAP:** Del inglés *Shrimp alkaline phosphatase*.

**SBE:** Del inglés *Single Base Extension*.

**SNP:** Del inglés *Single nucleotide polymorphism*.

**SOD:** Superóxido dismutasa.

**Tm:** Del inglés *Melting temperature*. Temperatura de fusión.

**VDAC:** Del inglés *Voltage-dependent anion channel*.

**VEGF:** Del inglés *Vascular endothelial growth factor*.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Anatomía del corazón. ....	4
<b>Figura 2</b>	Células cardiacas.....	7
<b>Figura 3</b>	Anatomía del músculo cardíaco. ....	8
<b>Figura 4</b>	Mitocondria .....	11
<b>Figura 5</b>	Mapa genético del ADN mitocondrial humano.....	13
<b>Figura 6</b>	Anagrama que representa los diferentes haplogrupos distribuidos en África, Europa y Asia .....	15
<b>Figura 7</b>	Fosforilación oxidativa, producción de superóxido y rutas de reducción de oxidantes en la mitocondria. ....	17
<b>Figura 8</b>	Muerte celular en diferentes procedimientos tras la isquemia ...	23
<b>Figura 9</b>	Mitocondria e Isquemia/Reperfusion .....	28
<b>Figura 10</b>	Gráfica en la cual se representa el efecto de 90 minutos de isquemia seguidos de 30 minutos de reperfusión en la actividad de SOD2 y producción de O <sub>2</sub> en mitocondrias <i>in vitro</i> .....	29
<b>Figura 11</b>	Esquema de la cascada que conduce a la liberación de estímulos apoptóticos desde la mitocondria.....	31
<b>Figura 12</b>	Modelo Langendorff .....	37
<b>Figura 13</b>	Sistemas quirúrgicos de inducción de isquemia miocárdica.....	38
<b>Figura 14</b>	El corazón porcino .....	44
<b>Figura 15</b>	Simplificación y análisis en las muestras en proteómica .....	51
<b>Figura 16</b>	Ejemplo representativo de 11 productos de PCR Multiplex en gel de agarosa.....	65
<b>Figura 17</b>	Secuencia de referencia en la que se representan las variantes alélicas para cada sitio polimórfico .....	68
<b>Figura 18</b>	Esquema de trabajo para la determinación de haplogrupos mitocondriales .....	70
<b>Figura 19</b>	Esquema de la toma de muestras. ....	75
<b>Figura 20</b>	Esquema de trabajo para el análisis proteómico.....	85
<b>Figura 21</b>	Cálculo de la expresión relativa de los genes de estudio empleando el método 2 delta delta Ct .....	90
<b>Figura 22</b>	Características clínicas de los grupos de estudio .....	95
<b>Figura 23</b>	Imagen representativa de corazones porcinos en diferentes etapas post-isquémicas. ....	103
<b>Figura 24</b>	Grosor medio del tejido cardíaco afectado. ....	104

<b>Figura 25</b>	Electrocardiogramas. ....	105
<b>Figura 26</b>	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.....	106
<b>Figura 27</b>	Análisis histomorfológico de los diferentes grupos experimentales.....	107
<b>Figura 28</b>	Western blot de los diferentes extractos proteicos obtenidos durante el aislamiento mitocondrial. ....	108
<b>Figura 29</b>	Distribución de las proteínas por peso molecular .....	109
<b>Figura 30</b>	Análisis de componentes principales.....	115
<b>Figura 31</b>	Análisis de proteínas significativas 3 y 15 días tras I/R. ....	116
<b>Figura 32</b>	Frecuencia de las funciones mitocondriales de las proteínas identificadas como diferencialmente expresadas 3 y 15 días tras la I/R .....	117
<b>Figura 33</b>	Mapas térmicos de expresión de las proteínas diferencialmente expresadas para cada uno de los procesos celulares analizados .....	120
<b>Figura 34</b>	Validación de identificaciones proteicas mediante western blot.	122
<b>Figura 35</b>	Validación de la presencia de BRP44L, VDAC1 y HSP60 inmunohistoquímica en tejido cardíaco porcino.....	123
<b>Figura 36</b>	Confirmación de la localización de las proteínas BRP44L, VDAC1 y HSP60 en tejido cardíaco humano .....	124
<b>Figura 37</b>	Expresión relativa de ARNm para los genes BRP44L, VDAC1, LONP1 y HSP60.....	125
<b>Figura 38</b>	Validación de la presencia de BRP44L mediante inmunofluorescencia sobre cardiomiocitos de rata .....	126
<b>Figura 39</b>	Validación de la presencia de VDAC1 mediante inmunofluorescencia sobre cardiomiocitos de rata .....	127
<b>Figura 40</b>	Validación de la presencia de LONP1 mediante inmunofluorescencia sobre cardiomiocitos de rata .....	128
<b>Figura 41</b>	Validación de la presencia de HSP60 mediante inmunofluorescencia sobre cardiomiocitos de rata .....	129
<b>Figura 42</b>	Implicación de las ERO en la aterosclerosis .....	138
<b>Figura 43</b>	Propuesta del esquema de las rutas metabólicas encontradas alteradas tras el análisis proteómico durante la isquemia miocárdica .....	136

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Análisis multivariante del riesgo relativo para la CI tomando los valores de LDL como referencia.....	22
<b>Tabla 2</b>	Mortalidad asociada al infarto agudo de miocardio estratificada en base a la topografía del área afectada por la isquemia.....	24
<b>Tabla 3</b>	Secuencias de cebadores utilizadas para la PCR Multiplex ....	64
<b>Tabla 4</b>	Sitios polimórficos del ADNmt usados para asignar los 6 haplogrupos europeos más frecuentes .....	65
<b>Tabla 5</b>	Secuencia de cebadores empleados para el ensayo de SBE ..	67
<b>Tabla 6</b>	Secuencia de cebadores empleados para la técnica de PCR-RFLP.....	69
<b>Tabla 7</b>	Frecuencias y OR de los haplogrupos mitocondriales y clusters en el grupo control y en el grupo de pacientes con CI.	97
<b>Tabla 8</b>	Frecuencias de poblaciones control en este estudio y en otros estudios europeos.....	98
<b>Tabla 9</b>	Frecuencias de haplogrupos mitocondriales (%) clasificados según los diferentes factores de riesgo para el desarrollo de la cardiopatía isquémica.....	99
<b>Tabla 10</b>	Análisis multivariante de los grupos de estudio.....	99
<b>Tabla 11</b>	Polimorfismos analizados en cada posición nucleotídica siguiendo la secuencia de referencia de Cambridge.....	101
<b>Tabla 12</b>	Proteínas mitocondriales diferencialmente expresadas tras el proceso de isquemia y reperfusión.....	107

### ANEXO

<b>Figura I</b>	Espectros MS/MS representativos de las proteínas identificadas y validadas en este estudio .....	iii
<b>Tabla I</b>	Material y métodos. Listado de anticuerpos utilizados en este estudio.....	iv
<b>Tabla II</b>	Material y métodos. Lista de cebadores de DNA utilizados para los experimentos de expresión génica.....	iv
<b>Tabla III</b>	Resultados. Características de los cerdos utilizados para este trabajo.....	v
<b>Tabla IV</b>	Resultados. Resumen del análisis proteómico para las proteínas mitocondriales identificadas.....	vi



# RESUMEN

**ANTECEDENTES.** Los eventos que suceden en la mitocondria juegan un papel fundamental en la cardiopatía isquémica (CI).

**OBJETIVOS.** El primer objetivo de este estudio ha sido analizar la influencia de los principales haplogrupos europeos y los polimorfismos que los definen sobre el desarrollo de la CI en una población española. El segundo objetivo ha sido investigar el perfil proteico mitocondrial de la región ventricular sana, próxima a la zona de infarto en un modelo porcino de isquemia y reperfusión (I/R).

**MÉTODOS.** Para el primer objetivo, se detectaron los polimorfismos que definen los distintos haplogrupos mitocondriales en muestras de ADN de 423 controles y 358 pacientes con CI. Para el segundo se extrajeron proteínas mitocondriales de tejido cardíaco de 11 cerdos (*Sus scrofa*) 3 o 15 días tras el procedimiento de I/R. Los cambios en la expresión de las proteínas mitocondriales con respecto al grupo control de cerdos sin operar fueron detectados mediante espectrometría de masas en tándem.

**RESULTADOS.** En el primer estudio, el haplogrupo H se encontró significativamente sobrerrepresentado en el grupo patológico (OR=1,50,  $p<0,05$ ) al mismo tiempo que la frecuencia del haplogrupo J en el grupo de pacientes con CI fue significativamente menor que en la población control (OR=0,47,  $p<0,05$ ). En el análisis del proteoma mitocondrial, se identificaron 70 proteínas mitocondriales significativamente reguladas. Se observó un incremento de la expresión de proteínas implicadas en la cadena de transporte de electrones y en la glucólisis a los 3 días, como posible mecanismo para compensar la demanda energética en las zonas próximas a la lesión. A los 15 días el patrón proteico revirtió hacia uno más próximo al observado en animales control, sugiriendo un sesgo hacia la estabilización del tejido. Se validó por primera vez la sobreexpresión de la proteína BRP44L, un transportador de piruvato, que podría ser esencial para la obtención de energía tras la isquemia.

**CONCLUSIONES.** 1) Se ha demostrado por primera vez que haplogrupos con fenotipos opuestos en relación con la producción de especies reactivas de oxígeno son respectivamente factores de riesgo (H) y de protección (J) para el desarrollo de CI. 2) Se han determinado diferencias en el perfil proteómico mitocondrial 3 y 15 días tras la I/R mostrando un aumento de proteínas de transporte y metabolismo de piruvato e involucradas en la producción de energía. El estudio en profundidad de proteínas detectadas en este estudio, como BRP44L, podrían ser útiles para el desarrollo de terapias enfocadas a la estabilización del tejido miocárdico en etapas post-isquémicas.

# RESUMO

**FONDO.** Os eventos que suceden na mitocondria xogan un papel fundamental na cardiopatía isquémica (CI).

**OBXECTIVOS.** O primeiro obxectivo deste estudo foi analizar a influencia dos principais haplogrupos europeos e os polimorfismos que os definen sobre o desenvolvemento da CI nunha poboación española. O segundo obxectivo foi o de investigar o perfil proteico mitocondrial da rexión ventricular sá, próxima á zona de infarto nun modelo porcino de isquemia e reperfusión (I/R).

**MÉTODOS.** Para o primeiro obxectivo, detectáronse os polimorfismos que definen os distintos haplogrupos mitocondriais en mostras de ADN de 423 controles e 358 doentes con CI. Para o segundo extraéronse proteínas mitocondriais de tecido cardíaco de 11 cerdos (*Sus scrofa*) 3 ou 15 días tras o procedemento de I/R. Os cambios na expresión das proteínas mitocondriais con respecto ó grupo control de cerdos sen operar foron detectados mediante espectrometría de masas en tándem.

**RESULTADOS.** No primeiro estudo, o haplogrupo H atopouse significativamente máis representado no grupo patolóxico (OR=1,50,  $p<0,05$ ) ao mesmo tempo que a frecuencia do haplogrupo J no grupo de doentes con CI foi significativamente menor que na poboación control (OR=0,47,  $p<0,05$ ). No análise do proteoma mitocondrial identificaróñse 70 proteínas mitocondriais significativamente reguladas. Observouse un incremento da expresión de proteínas implicadas na cadea de transporte de electróns e na glucólise ós 3 días como posible mecanismo para compensar a demanda enerxética das zonas próximas á lesión. Ós 15 días o patrón proteico revertiu a un máis próximo ó observado en animais control, suxerindo un sesgo cara a estabilización do tecido. Validóuse por primeira vez a sobreexpresión da proteína BRP44L, un transportador de piruvato que podería ser esencial para a obtención de enerxía tras a isquemia.

**CONCLUSIÓNS.** 1) Demostrouse por primeira vez que haplogrupos con fenótipos opostos en relación á produción de especies reactivas de osíxeno son, respectivamente, factores de risco (H) e de protección (J) para o desenvolvemento da CI. 2) Determináronse diferencias no perfil proteico mitocondrial 3 e 15 días tras a I/R amosando un aumento de proteínas de transporte e metabolismo de piruvato e involucradas na produción de enerxía. O estudo en profundidade das proteínas detectadas neste estudo, coma BRP44L, poderían ser utilies para o desenvolvemento de terapias enfocadas á estabilización do tecido miocárdico en etapas post-isquémicas.



# ABSTRACT

**BACKGROUND.** The events that occur in the mitochondria play a key role in ischemic cardiomyopathy (IC).

**OBJECTIVES.** The first objective of the study was to analyze the influence of major European haplogroups and polymorphisms that define the development of IC in a Spanish population. The second objective was to investigate the mitochondrial protein profile of a healthy ventricular region, adjacent to the site of infarction in a porcine model of ischemia and reperfusion (I/R).

**METHODS.** To accomplish the first aim the polymorphisms that define the different mitochondrial haplogroups were detected in DNA samples of 423 controls and 358 patients with IC. For the second objective mitochondrial proteins were extracted from heart tissue from 11 pigs (*Sus scrofa*), 3 or 15 days after I/R. Changes in mitochondrial protein expression were detected and compared against non-operated pigs by tandem mass spectrometry.

**RESULTS.** In the first study, haplogroup H was significantly overrepresented in the pathological group (OR=1.50,  $p<0.05$ ) while the frequency of haplogroup J in the group of patients with IC was significantly lower compared against the control population (OR=0.47,  $p<0.05$ ). In the analysis of the mitochondrial proteome, we identified 70 significantly regulated mitochondrial proteins. An increase in the expression of proteins involved in the electron transport chain and glycolysis were observed 3 days post I/R. This is a possible mechanism to compensate for the energy demand in the areas surrounding the lesion. Interestingly, the protein expression pattern had changed dramatically after 15 days, reverting to a similar pattern to that observed in control animals, suggesting a bias toward tissue stabilization. The overexpression of BRP44L, a pyruvate transporter that could be essential for the energy uptake after the ischemia, was validated for the first time.

**CONCLUSIONS.** 1) This study has demonstrated for the first time that haplogroups with opposite phenotypes regarding the production of reactive oxygen species are respectively risk (H) and protective factors (J) for the development of IC. 2) Differences in mitochondrial proteomic profile 3 and 15 days post I/R have been determined showing an increase expression of proteins involved with pyruvate transport, metabolism and energy production. An in-depth analysis of proteins detected in this study such as BRP44L, could be useful for the development of therapies aimed at stabilizing the myocardial tissue in post-ischemic stages.



# I. INTRODUCCIÓN



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **A. EL CORAZÓN Y EL TEJIDO CARDIACO**

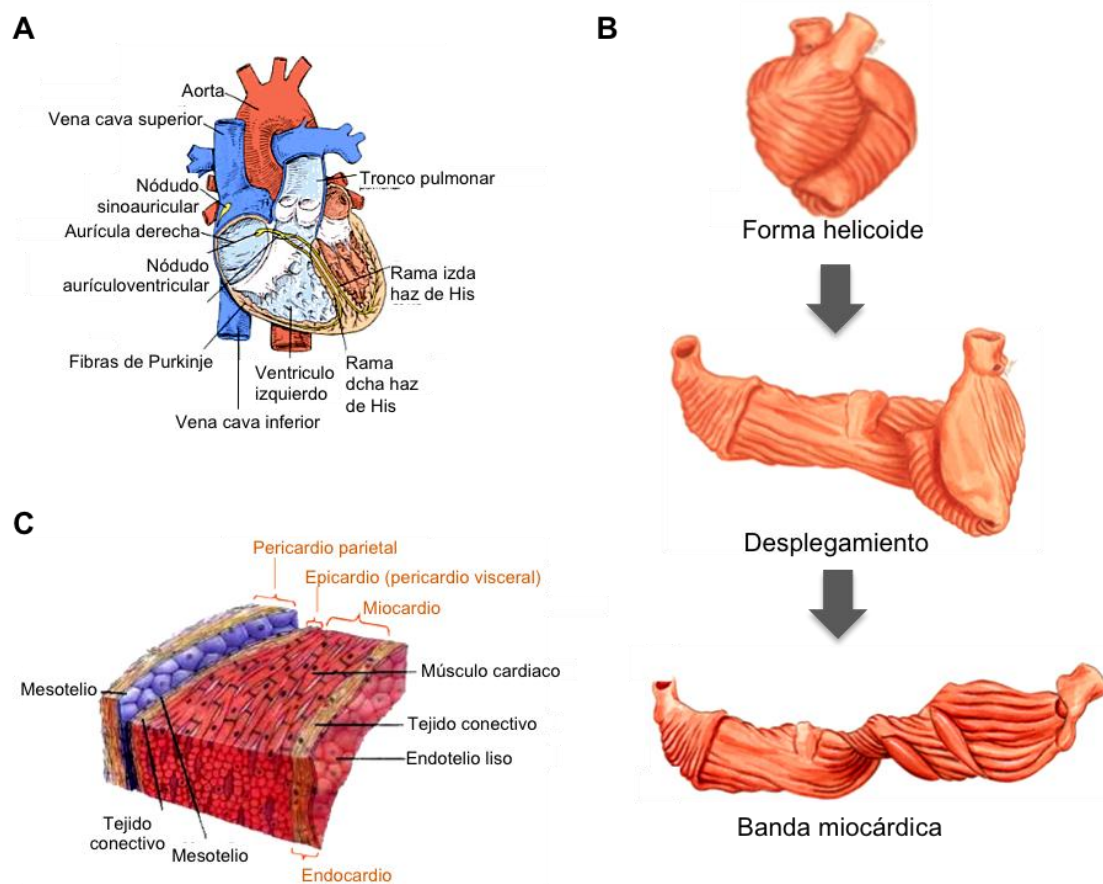
#### **1. Fisiología del corazón**

El corazón se define como un órgano que bombea sangre al resto de los órganos del cuerpo asegurando el aporte de oxígeno y nutrientes y la retirada de productos de desecho en todos los tejidos. Aunque esto es cierto, es más preciso considerar al corazón como una bomba que recibe sangre de las venas a baja presión impartándole energía por contracción dentro de las cámaras cardíacas y luego expulsándola a mayor presión hacia las arterias. Es importante entender que el flujo de la sangre hacia los órganos no está solo provocado por la contracción del corazón *per se*, sino también por la presión generada dentro del sistema arterial junto con el bombeo de sangre hacia la vasculatura, que actúa como resistencia<sup>1</sup>.

El corazón consta cuatro cámaras, dos aurículas y dos ventrículos. Ambos ventrículos están constituidos por una sola banda de miocardio con doble hélice, un asa o bucle basal que se inicia desde la base de la arteria pulmonar y se continúa con otra asa apical de doble hélice que termina en la aorta<sup>2</sup>. Las aurículas son las encargadas de recibir la sangre de las venas y los ventrículos son responsables de la propulsión de la sangre fuera del corazón a través de las arterias (Figura 1.A). El tejido que separa la parte derecha del corazón y la izquierda se denomina septo o tabique, funcionalmente se divide en dos partes no separadas: la superior o tabique interauricular y la inferior o tabique interventricular<sup>3</sup>.

La arquitectura del miocardio descrito por Torrent-Guasp consolida los aspectos funcionales del corazón como bomba de succión y expulsión<sup>4</sup>. Los ventrículos del corazón no constituyen en sí dos cavidades independientes sino que son resultado del enrollamiento de una única banda de tejido muscular (banda ventricular). Así, ambos ventrículos son formados por una misma banda ventricular continua que se trenza y gira sobre sí misma en forma de una helicoides y que tiene inicio y final en el nacimiento de ambos troncos arteriales. Esta banda adopta una disposición tridimensional helicoidal, en la cual se pueden establecer dos lazadas, la basal y la apical. Ambas lazadas forman estructuras anatómicas y funcionalmente diferentes, que se integran en diferentes segmentos de miocardio ventricular (Figura 1.B).

En el adulto el corazón pesa de media 300 gramos en el hombre y 250 gramos en la mujer. Está situado dentro del saco pericárdico, que lo protege y mantiene su posición en el tórax. El pericardio fibroso es la parte más externa del saco, y lo fija a las estructuras cercanas como esternón, diafragma y grandes vasos que entran y salen del corazón. El pericardio seroso secreta líquido pericárdico que lubrica la superficie del corazón, para aislarlo y evitar la fricción mecánica que sufre durante la contracción. El corazón está formado por tres capas: el epicardio, que es la capa más externa; el miocardio, que es la capa principal formada por el tejido muscular cardíaco encargado de la contracción del corazón, y el endocardio, que es una fina capa interna de revestimiento (Figura 1.C)<sup>5</sup>.



**Figura 1. Anatomía del corazón.** A. Anatomía de las diferentes partes del corazón<sup>6</sup>. B. Detalle de la disección del corazón que muestra su organización helicoidal formando una banda miocárdica<sup>7</sup>. C. Distribución de las capas tisulares que constituyen el corazón<sup>6</sup>.

Las contracciones rítmicas del corazón se originan en el propio músculo cardíaco. La autoexcitación rítmica y su conducción ordenada en el corazón dependen de un sistema especializado, constituido por fibras musculares modificadas que incluye el nódulo senoauricular, el nódulo aurículoventricular, el haz de His y la red de Purkinje (Figura 1.A). El potencial de acción iniciado en el nódulo senoauricular afecta a

las fibras miocárdicas auriculares que se contraen (sístole auricular). Esta excitación alcanza el nódulo auriculoventricular y atraviesa el haz de His, donde se conduce a gran velocidad por la red de Purkinje, de modo que en aproximadamente 0.03 segundos la excitación alcanza toda la superficie endocárdica ventricular y en un tiempo similar se ha propagado a la pericárdica (Figura 1.C). La regulación intrínseca del ritmo cardíaco por los nódulos senoauricular y auriculoventricular, haz de his y red de Purkinje es suficiente para mantener el ritmo regular sin necesidad de intervención nerviosa extrínseca. Sin embargo, el ritmo y la fuerza de las contracciones también están regulados tanto por impulsos llegados del sistema nervioso autónomo así como por acción hormonal<sup>8</sup>.

La sangre circula a través de un circuito pulmonar o a través de un circuito sistémico. La circulación pulmonar se produce por el transporte de la sangre desoxigenada desde el corazón hasta los pulmones, para luego regresarla oxigenada de vuelta al corazón. El término contrasta con la circulación sistémica en donde la sangre deoxigenada retorna al corazón a través de la vena cava superior en la aurícula derecha y es bombeada a través de la válvula tricúspide hacia el ventrículo derecho, para ser impulsada a través de la válvula pulmonar hacia los pulmones. En su retorno, la sangre oxigenada regresa a través de las venas pulmonares a la aurícula izquierda desde donde es bombeada a través de la válvula mitral hacia el ventrículo izquierdo. La contracción del ventrículo izquierdo provoca la salida de la sangre a través de la válvula aórtica hacia la circulación sistémica<sup>9</sup>.

El gasto sanguíneo coronario, es decir, el volumen de sangre expulsada por un ventrículo en un minuto es muy elevado y depende del gradiente de presión y del diámetro de los vasos coronarios. En condiciones de reposo el corazón (0,5% del peso corporal) recibe el 5% del gasto sanguíneo total. Al aumentar el gasto cardíaco, el flujo coronario también lo hace, adecuándose a las mayores demandas nutritivas. Es por ello que la contracción continuada del corazón precisa de un suministro continuo de nutrientes aportado al tejido a través de un enorme entramado de vasos sanguíneos conocido como sistema circulatorio coronario. Las arterias y venas de primer orden son epicárdicas; proceden directamente de la arteria aorta o drenan hacia la aurícula derecha respectivamente. Los vasos de menor magnitud procedentes de éstos, irrigan y drenan el interior del miocardio<sup>3</sup>.

## **2. Organización y funciones de los componentes celulares del corazón**

El epicardio está compuesto por una única capa de células mesoteliales (cuyas células varían entre planas o cúbicas según el grado de distensión), de tejido conectivo laxo (contiene los vasos sanguíneos y nervios) y de una importante cantidad de tejido adiposo. El endocardio reviste las cámaras cardíacas y está formado por células endoteliales y una delgada capa de tejido conectivo laxo. El miocardio constituye la gran parte del grosor del corazón, está compuesto por cardiomiocitos y tejido conectivo. Aunque los cardiomiocitos representan la mayor parte de la masa cardíaca, aproximadamente el 70% de las células no corresponden a este tipo celular sino que se trata de células más pequeñas, en las cuales se incluyen células musculares lisas, células endoteliales y fibroblastos. Éstos últimos son los que secretan y mantienen las fibras de tejido conectivo que contribuye a la dureza y tensión del corazón.

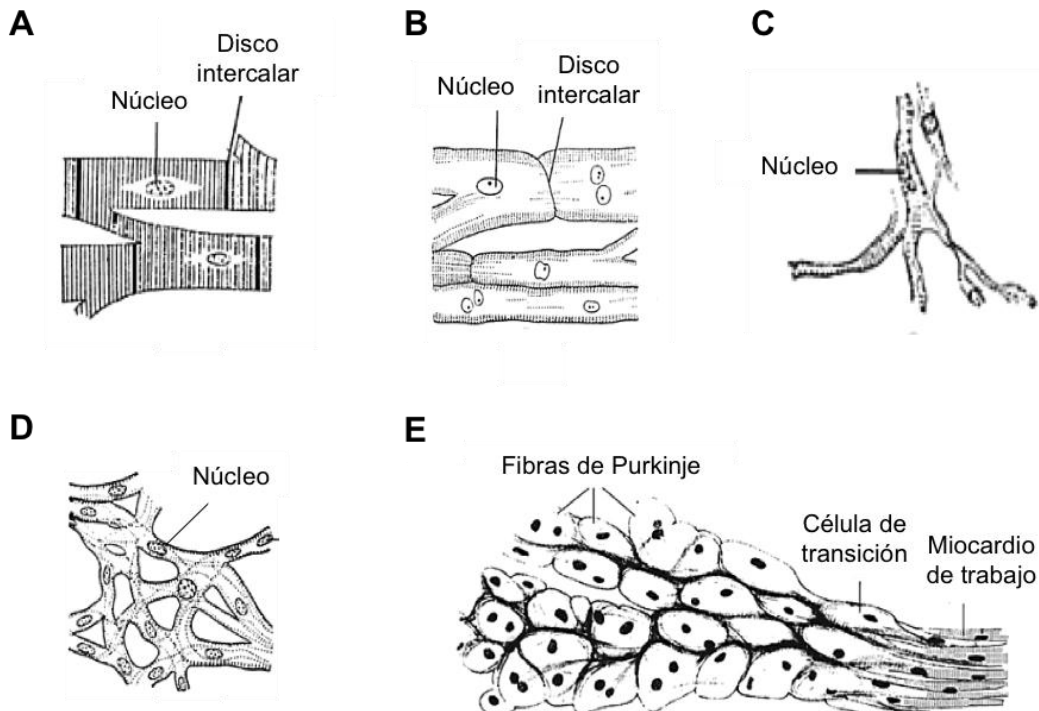
### **2.1 Cardiomiocitos**

En el corazón adulto se han descrito diversos tipos de células cardíacas. Los cardiomiocitos de trabajo (Figura 2.A), los cuales están especializados en la contracción, se sitúan en la aurícula y en el ventrículo. Son células cilíndricas con uno o varios núcleos, rodeadas de una membrana compleja llamada sarcolema y llenas de haces de miofibras que constituyen el elemento contráctil. Los cardiomiocitos de la aurícula son más pequeños que los del ventrículo. Las fibras de Purkinje se localizan en las paredes internas ventriculares del corazón, por debajo de la cabeza del endocardio (Figura 2.B). Estas células son alargadas y ricas en glucógeno especializadas en la conducción del estímulo nervioso a gran velocidad. Las células del nódulo sinoatrial se encuentran en la pared de la aurícula derecha cerca de la entrada de la vena cava superior y forman parte de ese 1% de células cardíacas que poseen la habilidad de generar impulsos eléctricos (Figura 2.C). Al grupo de células del nódulo auriculoventricular se les conoce como “el marcapasos del corazón” (Figura 2.D) y se encuentran entre la aurícula izquierda y el ventrículo derecho, dentro del septo auricular. Las células de transición se encuentran en una interfase entre el miocardio de trabajo y las células de Purkinje (Figura 2.E).

Cabe destacar que desde el momento del nacimiento hasta la edad adulta, se siguen detectando células madre cardíacas dentro del corazón<sup>10</sup>. Así, hasta hace poco, se creía que las células musculares cardíacas no podían regenerarse. Sin



embargo, Olaf Bergmann *et al.* (2009)<sup>11</sup> analizaron la integración del carbono-14 en el ADN de los cardiomiocitos en individuos nacidos antes y después de los ensayos nucleares de la Guerra Fría. De esta forma pudieron analizar la edad de los cardiomiocitos en los seres humanos. Observaron que los cardiomiocitos se renuevan, aunque menos del 50% son los que se recambian durante un periodo de vida normal, sugiriendo que puede ser lógico trabajar hacia el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a la dinamización del proceso de división en las patologías cardíacas.

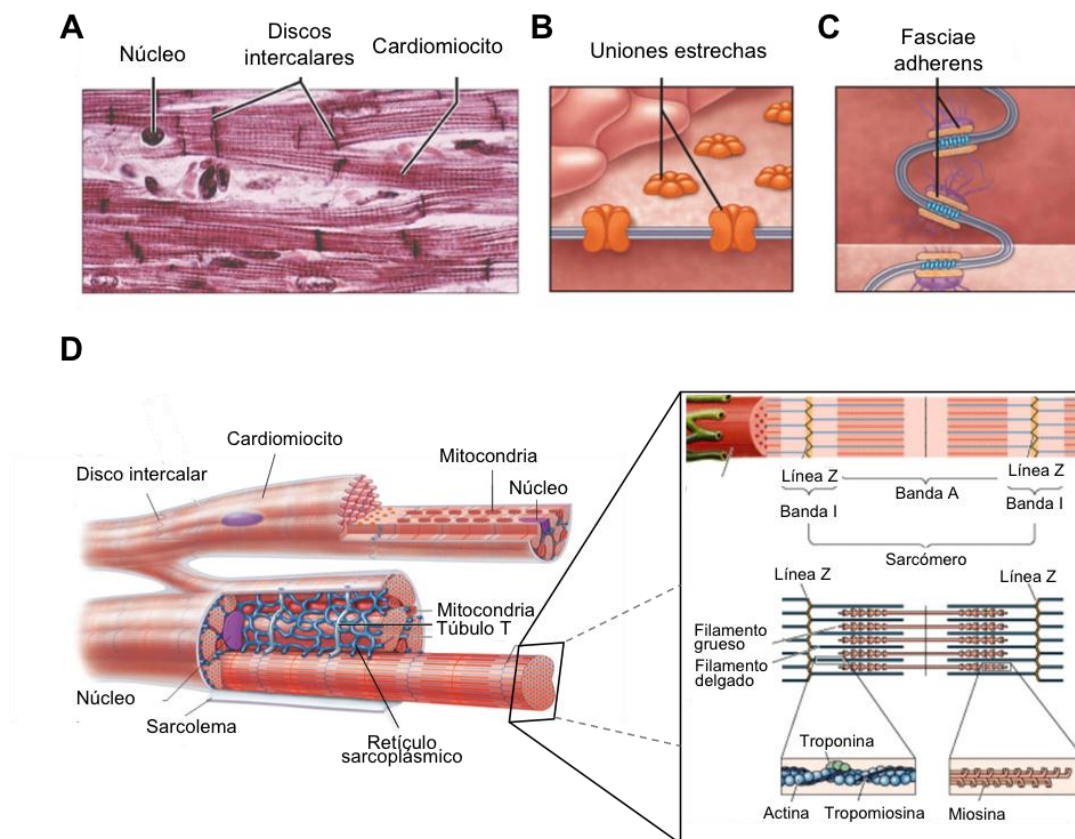


**Figura 2. Células cardíacas.** **A.** Cardiomiocitos de trabajo. Contienen estriaciones, núcleo central y discos intercalares. **B.** Células de Purkinje. Son alargadas y con estriaciones menos visibles que los cardiomiocitos de trabajo. **C.** Células del nódulo sinoatrial. **D.** Células del nódulo auriculoventricular. Son células pequeñas y separadas que forman redes. **E.** Células de transición. Se encuentran entre las fibras de Purkinje y el miocardio de trabajo<sup>9</sup>.

La integración funcional de los cardiomiocitos está mediada por estructuras exclusivas del músculo cardíaco llamadas discos intercalares, que unen las células individuales (Figura 3.A). En los discos intercalares se encuentran presentes uniones intercelulares especializadas que permiten tanto el acoplamiento mecánico como el eléctrico (iónico), a las que se denomina uniones estrechas (*gap junctions*) (Figura 3.B). Estas uniones facilitan la contracción sincrónica de los miocitos al proporcionar el acoplamiento eléctrico con un paso relativamente no restringido de iones a través de las membranas de células adyacentes. Éstas consisten en grupos de canales de la membrana plasmática, que unen directamente los compartimentos citoplasmáticos de células vecinas. Además, los cardiomiocitos están unidos entre sí por una combinación

de desmosomas y amplias placas de adhesión denominadas fascia adherens<sup>12</sup> (Figura 3.C).

La membrana plasmática de los cardiomiocitos o sarcolema envuelve los haces de miofibras que constituyen el elemento contráctil del corazón. El sarcolema presenta invaginaciones que forman una red tubular (túbulos T) que extienden el espacio extracelular hacia el interior de la célula asegurando un intercambio y comunicación continuos entre los compartimentos intra y extracelulares. El espacio entre el sarcolema y las miofibras está ocupado en buena parte por una gran cantidad de mitocondrias que aseguran el suministro de ATP para mantener los gradientes de iones necesarios para la contracción (Figura 3.D).



**Figura 3. Anatomía del músculo cardíaco.** A. Sección transversal de músculo cardíaco en el que se observan los cardiomiocitos con el núcleo en el centro y los discos intercalares. B y C Detalle de las uniones estrechas y los fasciae adherens. D. El sarcómero, cuya organización se muestra con mayor detalle, constituye la unidad contráctil básica de la fibra muscular<sup>13</sup>.

El retículo sarcoplásmico (RS) es el sistema membranoso intracelular que se extiende a modo de red en estrecha asociación con el sarcolema. El compartimento celular creado por el RS constituye un reservorio celular de iones calcio ( $Ca^{+2}$ ) que serán liberados a través de los canales de  $Ca^{+2}$  para iniciar el ciclo contráctil tras la onda de despolarización. El suministro de  $Ca^{+2}$  al RS está asegurado gracias a la

estrecha asociación de este con los túbulos T y a la presencia de bombas de  $\text{Ca}^{+2}$  (SERCA) incluidas en las membranas del RS. El flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  a través del espacio extracelular y sobretodo entre los diferentes compartimentos celulares, resulta fundamental para la contracción puesto que es la unión de este ión a la troponina-C lo que provoca el deslizamiento de los filamentos de actina y miosina que constituyen el sarcómero, la unidad contráctil básica (Figura 3.D). Las anomalías en la distribución espacial de las uniones comunicantes y sus proteínas respectivas en la CI pueden contribuir a la disfunción electromecánica<sup>12</sup>.

## **2.2 Otras células: cardiofibroblastos, células endoteliales y células musculares lisas**

Los fibroblastos cardíacos son células de origen mesenquimal que se encuentran asociadas con diversas formas de tejido conectivo. Existen importantes diferencias fenotípicas entre fibroblastos provenientes de diferentes tejidos y condiciones fisiológicas. En general, se caracterizan por la ausencia frecuente de una membrana basal y su tendencia a formar extensiones citoplasmáticas. Contienen un núcleo oval, retículo plasmático extenso, aparato de Golgi prominente y abundante material granular<sup>14</sup>.

Los fibroblastos cardíacos están situados para contribuir a las propiedades estructurales, bioquímicas, mecánicas y eléctricas del tejido. La contribución de los cardiofibroblastos es esencial en la síntesis y mantenimiento de los componentes de la matriz extracelular. Además, son fundamentales para otras funciones fisiológicas determinadas por interacciones dinámicas célula-célula y célula-matriz extracelular, esenciales para el mantenimiento de una función cardíaca normal. En este papel, dichas células responden a diversos estímulos mecánicos y eléctricos, además de a estímulos químicos tales como hormonas, factores de crecimiento y citoquinas<sup>15</sup>. Los fibroblastos cardíacos son también una fuente de factores de crecimiento con actividad paracrina<sup>16</sup> y de diversas citoquinas y factores de crecimiento. En situaciones de fibrosis miocárdica, fibroblastos de diferentes orígenes migran a los tejidos dañados obedeciendo a diversas señales y se suman a los residentes.

Las células endoteliales forman el endotelio vascular que es un epitelio plano simple que recubre la cara interna de los vasos sanguíneos y el corazón. Las células endoteliales tienen varias funciones en la homeostasis, formando una superficie lisa que facilita el flujo laminar de la sangre y el intercambio de nutrientes entre el plasma y el intersticio celular, regulando al mismo tiempo el transporte de sustancias entre

ambos. Regulan la angiogénesis y el remodelado vascular contribuyendo a la formación y mantenimiento de la matriz extracelular<sup>17</sup>. Además estas células producen factores de crecimiento en respuesta al daño vascular (influyendo especialmente en la proliferación del músculo liso vascular) y sustancias que regulan la agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis<sup>18</sup>. Las células endoteliales también sintetizan y degradan diversas hormonas y participan en la respuesta inmune generando citoquinas que modulan la actividad de los linfocitos<sup>19</sup>. El endotelio vascular produce y libera sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Entre las vasodilatadoras figuran: el óxido nítrico (NO) (antiguamente conocido como factor relajador derivado del endotelio), factor hiperpolarizante derivado del endotelio y prostaciclina. Entre las sustancias vasoconstrictoras figuran: las endotelinas y el tromboxano A<sub>2</sub><sup>20</sup>.

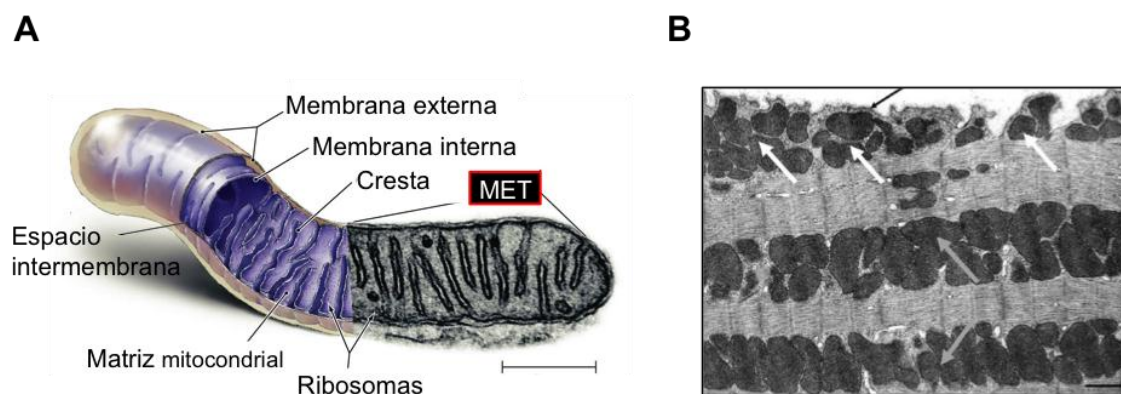
Las células musculares lisas vasculares (CMLV) son células contráctiles de las arterias y las venas. Regulan el calibre del vaso y por lo tanto la determinación de la perfusión tisular y el drenaje venoso a través del cuerpo. Además, estas células se adaptan a las demandas del tejido y son capaces de responder ante una lesión. Debido a esta necesidad, las células retienen una plasticidad notable durante toda la vida, lo que permite una regulación reversible hacia un estado activado, no contráctil, fenotipo de la célula migratoria y proliferativa<sup>21</sup>. El subtipo principal de CMLV tiene una morfología epitelioide o cúbica, acumula más ésteres de colesterol que las células musculares lisas con forma de huso y fenotipo contráctil de la capa media<sup>22</sup>. En algunas situaciones, las CMLV pueden incluso diferenciarse hacia otros tipos de células del mismo linaje, incluyendo adipocitos<sup>23</sup>. A menudo, la modulación es controlada, pero a su vez puede contribuir también de manera significativa (positiva o negativamente) a las principales anomalías vasculares incluyendo aterosclerosis, hiperplasia neointimal y vasculopatía del aloinjerto<sup>24,25</sup>.

## B. MITOCONDRIA

### 1. Función y morfología

Las mitocondrias son orgánulos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. Es por ello que son muy abundantes en el corazón, un tejido de gran demanda energética, donde constituyen un 20-40% del volumen celular. Las mitocondrias están rodeadas de dos membranas: la membrana externa mitocondrial (MEM) y la membrana interna mitocondrial (MIM). Ambas son diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas y separan dos espacios: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Figura 4.A).

Mediante microscopía electrónica de transmisión de tejido cardiaco se han observado las mitocondrias como orgánulos elípticos situados, bien en racimos debajo del sarcolema (mitocondrias subsarcolemales), o en filas paralelas y longitudinales ocultas dentro del aparato contráctil (mitocondrias interfibrilares) (Figura 4.B). Las dos poblaciones mitocondriales difieren en la morfología de sus crestas, con una orientación lameliforme en las subsarcolemales y tubular en las interfibrilares<sup>26</sup>.



**Figura 4. Mitocondria.** **A.** Estructura detallada de la mitocondria. **B.** Fotografía de miocardio de ratón. Grupos de mitocondrias subsarcolemales (flechas blancas) se sitúan en grupos debajo del sarcolema (flecha negra). Filas de mitocondrias interfibrilares se sitúan dentro del aparato contráctil (flechas grises). Barra: 1  $\mu$ m. MET: Microscopía electrónica de transmisión<sup>26</sup>.

## 2. El ADN mitocondrial (ADNmt) humano

### 2.1. Estructura y organización del ADNmt

Una de las principales características de las mitocondrias es la de poseer un sistema genético propio y la maquinaria necesaria para sintetizar el ADN, ARN y las

proteínas que codifica. El número de copias de ADN mitocondrial por célula oscila (1000-10000 copias) dependiendo de la demanda energética del tejido. Es por ello que debido a la gran demanda energética, los cardiomiocitos poseen 10 copias de ADN dentro de cada mitocondria y 10.000 copias de ADNmt por célula.

El ADN mitocondrial (ADNmt) humano presenta un patrón de herencia no mendeliano heredándose por vía materna. Consiste en una molécula circular de doble cadena que abarca 16569 pares de bases. Las dos cadenas complementarias tienen una proporción de C y G muy diferente, por lo que tienen un peso molecular distinto. Existe una hebra rica en bases púricas que es la cadena pesada o H (del inglés *heavy*) y la cadena complementaria rica en pirimidinas conocida como cadena ligera o L (del inglés *light*). La cadena del genoma mitocondrial que se representa por convenio y sobre la que se realiza la numeración de la posición 1 a la 16569 es la cadena L.

El ADN mitocondrial presenta la información genética compactada, ya que sus genes no presentan intrones, se disponen uno a continuación de otro sin tramos intermedios no codificantes y algunos incluso llegan a solaparse, como los ATPasa 6 y ATPasa 8. Los 37 genes que contiene están dentro de una gran región codificante que representa el 90% del total de la molécula, 28 de estos genes están codificados por la cadena H y 9 por la L.

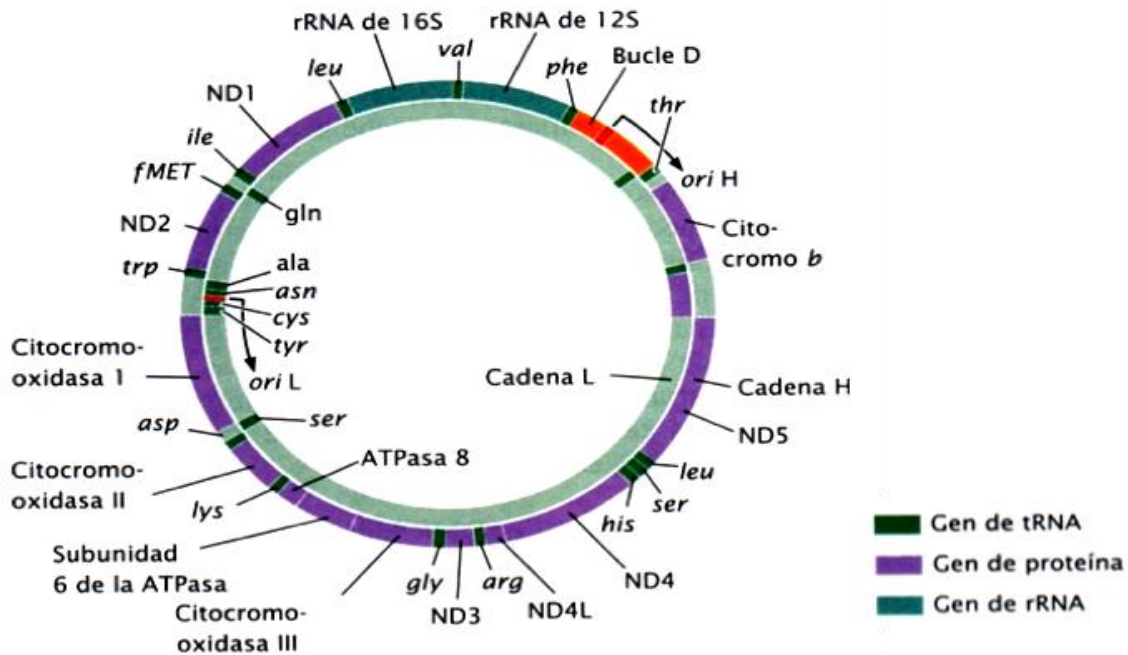
De los 37 genes, 22 codifican para ARNt, 2 para ARNr (12S y 16S) y 13 codifican para 13 ARNm que se traducen en 13 polipéptidos implicados en la cadena de fosforilación oxidativa: 7 de las 48 subunidades de la NADH deshidrogenasa para el complejo I, 1 citocromo b del complejo III, 3 de las 13 subunidades de la citocromo oxidasa c del complejo IV y 2 ATPasas (ATPasa 6 y 8) del complejo V (Figura 5). Por tanto, aunque las mitocondrias tienen su propio material genético, no son genéticamente autosuficientes. Los genes de muchas de las proteínas y enzimas estructurales que se encuentran en las mitocondrias realmente son codificados por el ADN nuclear, traducidos en los ribosomas del citoplasma y luego transportados a las mitocondrias.

El 10% restante de la molécula es ADN no codificante, contiene aproximadamente 1,2 Kb y es conocida como región control. Contiene fundamentalmente los promotores de la transcripción de ambas cadenas, el origen de replicación del a cadena pesada y secuencias de regulación. También contiene lugares de unión de factores de transcripción, secuencias conservadas relacionadas con el inicio de la replicación de la cadena H y secuencias asociadas a la finalización del bucle de desplazamiento o D-loop. El D-loop es una región de aproximadamente



1100 pares de bases, que se genera durante la replicación de la cadena H por la síntesis de un corto segmento de la hebra pesada, ADN 7S, que permanece unido al ADN molde, desplazando la cadena H y formando una triple hélice.

Otra característica especial del ADNmt es que el código genético está alterado con respecto al universal ya que 4 de los 64 codones presentan un significado diferente al que posee para la síntesis citoplasmática<sup>27</sup>.



**Figura 5. Mapa genético del ADN mitocondrial humano<sup>27</sup>.** El ADNmt humano es una molécula circular de doble cadena en la que sus genes no presentan intrones. Contiene 37 genes dentro de una gran región codificante y de ellos, 22 codifican para ARNt, 2 para ARNr (12S y 16S) y 13 codifican para 13 ARNm que se traducen en 13 polipéptidos implicados en la cadena de fosforilación oxidativa: 7 de las 48 subunidades de la NADH deshidrogenasa para el complejo I, 1 citocromo b del complejo III, 3 de las 13 subunidades de la citocromo oxidasa c del complejo IV y 2 ATPasas (ATPasa 6 y 8) del complejo V.

Debido a que el ADNmt humano carece de histonas protectoras y muchos de los mecanismos de reparación del genoma nuclear<sup>28</sup> y se encuentra próximo a la fuente de generación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) es muy vulnerable a sufrir daños. De hecho, muchas mutaciones en el ADNmt se asocian con enfermedades cardiovasculares. La oclusión aterosclerótica y posterior reperusión se asocia con un aumento significativo del daño en el ADNmt y un aumento compensatorio en la expresión de genes de fosforilación oxidativa<sup>29</sup>. Se ha observado que los corazones de pacientes con enfermedad coronaria arterial tienen entre 8 a 2000 veces más deleciones en el ADNmt que en individuos sanos de su misma

edad<sup>30</sup>. El daño en el ADNmt, conduce a su vez a un aumento de la producción de ERO y aterogénesis<sup>31</sup>.

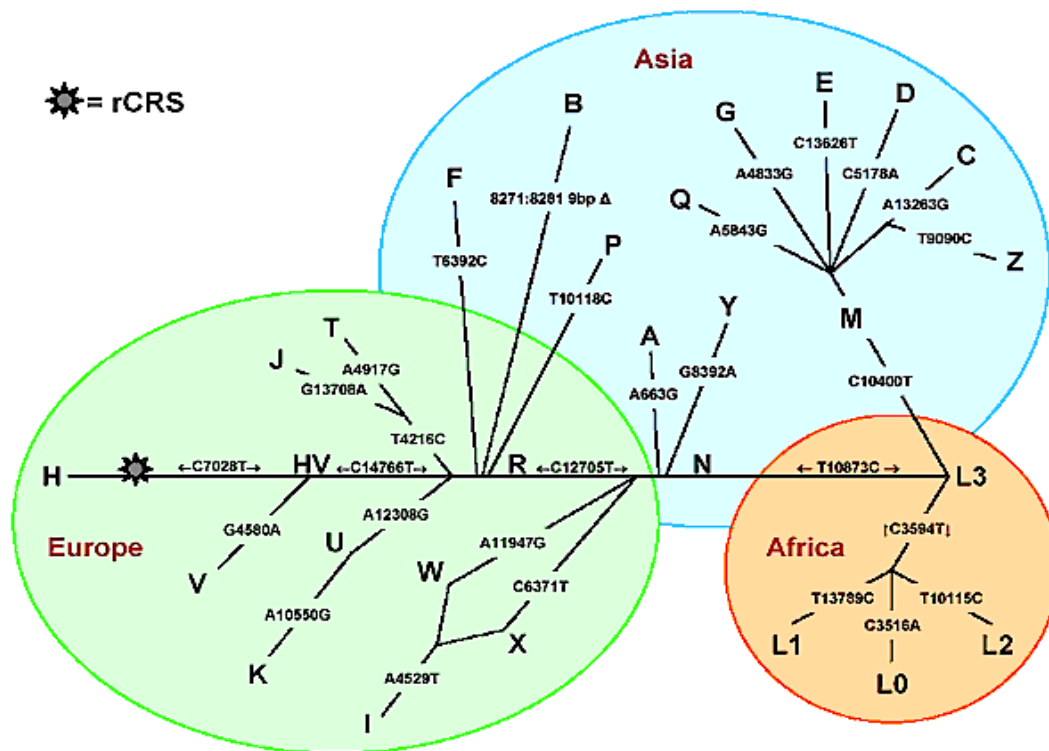
## **2.2. Haplogrupos mitocondriales**

El ADNmt presenta una tasa de mutación muy superior respecto al ADN nuclear al estar más expuesto a daño oxidativo. Las mutaciones que ha ido adquiriendo el genoma mitocondrial han subdividido a la población humana en un número discreto de haplogrupos. Cuando una mutación puntual se observa en una frecuencia superior al 1% se conoce como SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Por tanto, se define un haplogrupo mitocondrial como un conjunto de variantes genéticas caracterizadas SNPs específicos. Así, los diferentes haplogrupos forman una serie de linajes específicos.

Los polimorfismos que caracterizan los haplogrupos se originaron hace unos diez mil años y aún hoy en día tienen una alta prevalencia. Los polimorfismos menos prevalentes presentes en dichos haplogrupos son los que han ocurrido más recientemente. Muchos de los polimorfismos que determinan los haplogrupos son específicos de cada continente<sup>32</sup>, éste es un fenómeno que se ha atribuido a la deriva genética y/o a la posible selección climática (Figura 6). El nombramiento de los haplogrupos se realiza mediante letras que van de la A a la Z. Como los haplogrupos fueron asignados en el orden de su descubrimiento, el orden de las letras no refleja las relaciones genéticas reales. Teniendo en cuenta que el ADNmt se hereda por vía materna, la mujer presente en la raíz de todos estos haplogrupos que constituye el antepasado matrilineal común más reciente para todos los seres humanos que viven actualmente es comúnmente conocida como "La Eva mitocondrial".

Todos los polimorfismos son descritos como diferencias con respecto a una secuencia de referencia. Dicha secuencia fue publicada por Anderson, S. y col en 1981 en Cambridge es por ello que se le denomina "secuencia de referencia de Cambridge" o "secuencia de Anderson" o CRS (del inglés *Cambridge Reference Sequence*)<sup>33</sup>. La secuencia CRS establece que las posiciones de cada base son numeradas de acuerdo con un convenio internacional y sirve para comparar cualquier otra secuencia puesto que es el patrón universal. Por consiguiente, a la hora de describir una secuencia estudiada, solo se mencionan aquellas posiciones en las que la secuencia difiera de CRS.





**Figura 6. Anagrama que representa los diferentes haplogrupos distribuidos en África, Europa y Asia.** Se parte de una secuencia de referencia (rCRS *revised Cambridge Reference Sequence*) indicada con una estrella. Los polimorfismos que definen cada haplogrupo se representan indicando a la izquierda del número de posición el nucleótido de la secuencia de referencia y a la derecha el nucleótido que ha sido sustituido. [www.mitomap.org]

### 2.3. Haplogrupos mitocondriales en el desarrollo de patologías

Se considera que las mutaciones en el ADNmt que definen a los diferentes haplogrupos no son patológicas *per se*. Sin embargo, podrían modular funciones biológicas importantes e influir en el desarrollo de enfermedades complejas o enfermedades relacionadas con el envejecimiento humano.

Los haplogrupos mitocondriales podrían modular el metabolismo mitocondrial y conducir a diferencias leves en la actividad de la fosforilación oxidativa, lo que también podría afectar a la interacción que existe entre los genomas nucleares y mitocondriales<sup>34,35</sup>. Así, líneas celulares de ratón con genoma nuclear homogéneo pero con diferentes haplogrupos mitocondriales presentan diferencias en respiración celular y mecanismos de protección frente a ERO dependiendo del haplogrupo<sup>36</sup>. Los polimorfismos específicos de cada haplogrupo pueden influir de diferente forma en el ensamblaje de los complejos proteicos de la cadena de transporte mitocondrial<sup>37</sup>. Por

ejemplo, individuos con el haplogrupo J presentan un menor consumo de oxígeno si se comparan con individuos de otros haplogrupos. Esto se ha relacionado con una menor eficiencia en la cadena de transporte electrónico, que conlleva a una menor producción de ATP y de especies reactivas de oxígeno<sup>38</sup>.

Las mutaciones del ADNmt podrían tener consecuencias a nivel bioquímico influyendo en el desarrollo de enfermedades complejas o relacionadas con el envejecimiento humano. Así, los haplogrupos mitocondriales son factores a tener en cuenta cuando se evalúa el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas<sup>39,40</sup>, cáncer<sup>41</sup>, osteoartritis<sup>42</sup> o el desarrollo de trastornos mitocondriales<sup>43</sup>.

Puesto que las disfunciones en la energética mitocondrial están estrechamente implicadas en la fisiopatología de diversas cardiopatías, los polimorfismos específicos de cada haplogrupo podrían contribuir también su desarrollo<sup>44,45,46</sup>. En cuanto a esto, se ha observado que el haplogrupo T es más frecuente en pacientes con cardiopatía hipertrófica<sup>47</sup> y que los haplogrupos H1<sup>48</sup>, K<sup>49</sup> y N9b<sup>50</sup> son factores de protección frente al el infarto isquémico. También se ha observado que los haplogrupos A y M7A predisponen al desarrollo de la aterosclerosis coronaria<sup>51</sup>. De hecho, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial están unidos a muchos factores de riesgo de infarto isquémico como son la hipertensión<sup>52</sup>, diabetes<sup>53</sup>, inflamación<sup>54</sup> y ruptura de placas ateroscleróticas<sup>55</sup>.

### 3. Fosforilación oxidativa

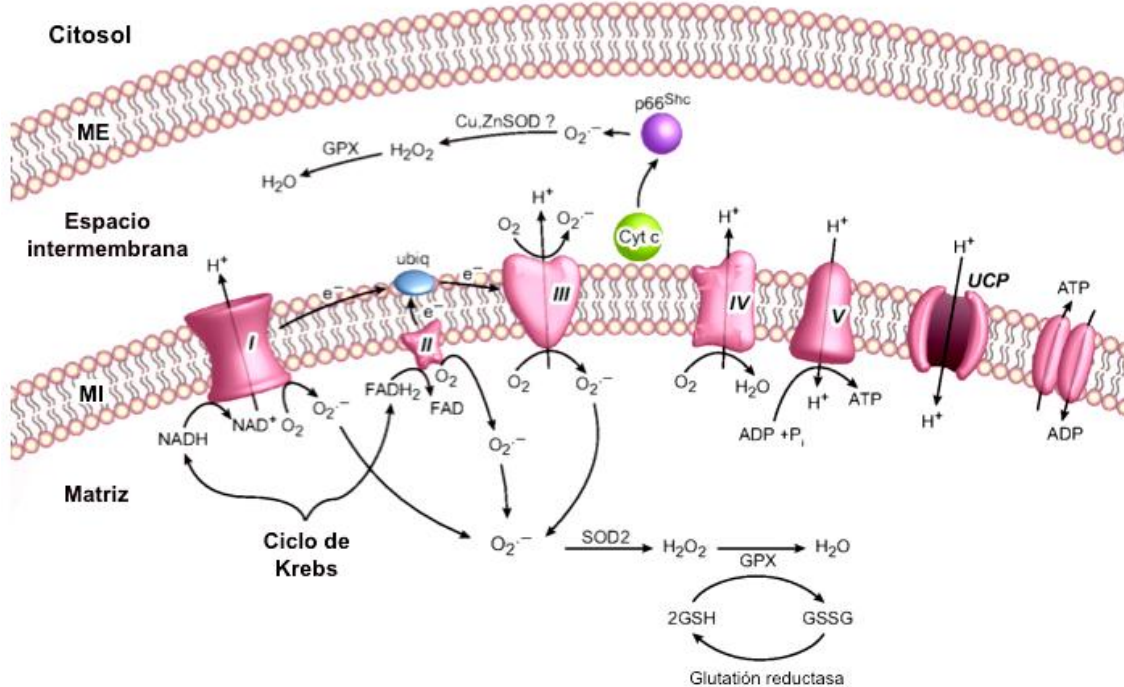
#### 3.1. La cadena de transporte mitocondrial

La producción de ERO tiene lugar en la vía implicada en la producción de energía en las mitocondrias: la fosforilación oxidativa (OXPHOS del inglés *Oxidative phosphorylation*). La OXPHOS es realizada por 5 subunidades de complejos de múltiples enzimas incrustadas en la membrana mitocondrial interna que se encargan de transferir los electrones desde NADH a oxígeno molecular a través de una cadena de transporte de electrones (CTE). La CTE consta de los complejos I (NADH deshidrogenasa), II (succinato ubiquinona oxi-doreductasa), III (ubiquinol citocromo oxidorreductasa), IV (citocromo c oxidasa) y V (ATP-sintasa) (Figura 7).

El complejo I capta dos electrones del NADH mientras que el complejo II los capta del succinato. Ambos transfieren los electrones a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q). El producto reducido se conoce con el nombre de

ubiquinol (QH<sub>2</sub>). El complejo III obtiene dos electrones del QH<sub>2</sub> y se los transfiere a dos moléculas de citocromo c, que es un transportador de electrones hidrosoluble que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. El complejo IV capta cuatro electrones de cuatro moléculas de citocromo c y se las transfiere al oxígeno (O<sub>2</sub>), para producir dos moléculas de agua (H<sub>2</sub>O).

La transferencia de electrones a través de la CTE conduce al bombeo de protones a través de la membrana interna mitocondrial en los complejos I, III, y IV, creando gradiente electroquímico transmembrana. La fuerza motriz protónica, que impulsa la reentrada de protones en la matriz, es utilizada por el complejo V (ATP sintasa) para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Se ha estimado que entre el 0,2 al 2,0% del oxígeno molecular consumido por las mitocondrias es reducido mediante una transferencia de electrones individual a través de la CTE para formar el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sup>56</sup>.



**Figura 7. Fosforilación oxidativa, producción de superóxido y rutas de reducción de oxidantes en la mitocondria.** Los electrones (e<sup>-</sup>) de la NADH y la FADH<sub>2</sub> atraviesan el complejo I y el II, respectivamente, y luego al complejo III vía ubiquinol. El citocromo c transfiere electrones del complejo III al IV, el cual reduce O<sub>2</sub><sup>-</sup> para formar H<sub>2</sub>O. El flujo de electrones es acompañado por la transferencia de protones (H<sup>+</sup>) a través de la membrana interna mitocondrial a través de los complejos I, III y IV, creando un gradiente electroquímico. Los protones vuelven a entrar a la matriz mitocondrial a través del complejo V, el cual usa la energía generada por el paso de electrones para la generación de ATP. La fuerza motriz que genera el paso de protones también conduce al intercambio ATP-ADP por la adenina nucleótido translocasa (ANT). El UCPs permite la vuelta de los protones hacia la matriz reduciendo la formación de EROs. El complejo I pierde electrones para generar O<sub>2</sub><sup>-</sup> hacia la matriz, mientras que el complejo II genera O<sub>2</sub><sup>-</sup> tanto hacia la matriz como hacia el espacio

intermembrana. P66 sustrae los electrones del citocromo c en el espacio intermembrana y genera  $O_2^-$ . El radical superóxido es catalizado hacia  $H_2O_2$  por la Cu, Zn SOD en el espacio intermembrana y SOD2 en la matriz mitocondrial. El  $H_2O_2$  es reducido por la glutatión peroxidasa (GPX) empleando GSH como sustrato, el glutatión oxidado resultante (GSSG) es reducido nuevamente a GSH por la glutatión reductasa. Pi es fosfato inorgánico<sup>57</sup>.

### 3.2. Producción de ERO en la mitocondria

En la CTE mitocondrial, el complejo IV retiene todos los productos intermedios parcialmente reducidos hasta que se consigue la reducción total de oxígeno<sup>58</sup>, aunque otros complejos pueden ceder electrones al oxígeno. Los complejos I y III son la principal fuente de producción de superóxido ( $O_2^-$ ) mitocondrial. El superóxido se libera en la matriz desde el complejo I, mientras que es liberado tanto a la matriz como al espacio intermembranoso por el complejo III<sup>59,9,60</sup>.

La generación de ERO en la mitocondria está regulada por una serie de factores, tales como la concentración de oxígeno, la eficacia de CTE, la disponibilidad de donantes de electrones incluyendo NADH y  $FADH_2$ , y la actividad de las proteínas desacoplantes y citoquinas<sup>29,61,30,62</sup>. La producción mitocondrial de  $O_2^-$  aumenta linealmente con el aumento de la concentración de oxígeno<sup>31,63</sup>. Por esta ecuación, la formación de ERO debería disminuir con la hipoxia. Sin embargo, un aumento paradójico de la generación de ERO mitocondrial se observa bajo condiciones de hipoxia moderada<sup>32,64</sup>.

Las proteínas desacoplantes son otro conjunto de importantes reguladores fisiológicos de la producción mitocondrial de ERO<sup>33,65</sup>. La activación de estos transportadores de la membrana mitocondrial interna aniones permite que los protones se transporten de nuevo a la matriz mitocondrial, disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial y la generación de ERO<sup>34,66</sup>.

Los aniones superóxido en la matriz mitocondrial son rápidamente convertidos a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la superóxido dismutasa 2 (SOD2), mientras que aquellos en el espacio intermembranoso son convertidos por SOD1 (Figura 7). El  $H_2O_2$  puede ser reducido a radical hidroxilo altamente reactivo en presencia de metales de transición reducidos<sup>14,67</sup>. En las mitocondrias, el  $H_2O_2$  se reduce a agua por la enzima glutatión peroxidasa o catalasa<sup>68,69</sup>. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción de 2 electrones del  $H_2O_2$  usando glutatión reducido (GSH) como el donador de hidrógeno. El GSH, es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina que se sintetiza en el citosol y se transporta hacia a las mitocondrias. Durante el proceso de reducción de  $H_2O_2$  el GSH se oxida para producir glutatión oxidado. La enzima glutatión reductasa utiliza

NADPH para reducir el glutatión oxidado y producir nuevamente GSH. Sin embargo, con la excepción de las mitocondrias del corazón, la catalasa no está presente en las mitocondrias de otros tejidos<sup>28,70</sup>.

## C. CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

### 1. Definición

La **cardiopatía isquémica** (CI) es el término empleado para describir enfermedades ateroscleróticas que producen disfunción del tejido miocárdico con un funcionamiento anormal de la pared cardiaca. La CI se caracteriza por un desbalance entre el aporte y la demanda de oxígeno y sustratos en el tejido cardiaco. Este desequilibrio conduce a un déficit de producción de ATP, necesario para la contracción, y una acumulación excesiva de productos metabólicos de desecho. Este conjunto de enfermedades se presentan en tres manifestaciones clínicas<sup>56,71,72</sup>:

**Angina pectoris.** Se manifiesta como un dolor torácico provocado por la falta de oxígeno debida a la obstrucción o espasmo de la arteria en una situación de estrés. Sus efectos son reversibles a nivel tisular si el flujo normal se restaura.

**Infarto agudo de miocardio.** Es resultado de la interrupción del flujo sanguíneo en una arteria coronaria provocando la muerte celular. El tejido miocárdico se necrosa, pierde su capacidad contráctil normal.

**Muerte súbita cardiaca.** Es una de las manifestaciones más dramáticas de la CI. En el 50% de los casos la isquemia es responsable de la pérdida de eficiencia en la contracción que provoca la fibrilación ventricular y muerte del individuo dentro de la primera hora tras la obstrucción.

### 2. Factores de riesgo

Existen gran cantidad de factores que determinan el riesgo de sufrir CI, y todavía se destinan esfuerzos importantes a la identificación de nuevas variables que puedan afectar a este riesgo. De hecho, el grado de capacidad predictiva disponible influye de modo crucial en la eficacia de estrategias o tratamientos preventivos, resultando un pilar fundamental en la lucha contra patologías con prevalencias elevadas, que ponen en grave riesgo la salud pública.

De modo general, los factores de riesgo se pueden dividir en dos grandes grupos. Los factores modificables incluyen los hábitos tóxicos, presión arterial, niveles de colesterol o diabetes mellitus. Los factores no modificables incluyen la edad, el género y la herencia genética. En esta clasificación, es importante precisar que los factores genéticos contribuyen también a factores de riesgo aquí considerados como

modificables tales como la hipertensión o la diabetes. En los últimos años, se están llevando a cabo estudios para comprobar la eficacia predictiva de factores de riesgo adicionales tales como los niveles de proteína c-reactiva y otros<sup>73</sup>.

La contribución de los factores de riesgo en el desarrollo de la CI se ilustra en un estudio de 2010 realizado sobre la población de Islandia. Este estudio reveló que, entre 1981 y 2006, la mortalidad derivada de enfermedades coronarias se redujo en un 80% en 25 años. Los modelos matemáticos de ponderación (IMPACT) mostraron que aproximadamente un 75% de la caída en mortalidad era atribuible al control ejercido sobre los principales factores de riesgo, y solo un 25% se debió a tratamientos individuales frente a la enfermedad (revascularización, estatinas, anti-hipertensivos etc)<sup>74</sup>.

En 1948, 5.209 personas residentes en Framingham (Estados Unidos) fueron reclutadas para formar parte del primer estudio prospectivo que trataba de desvelar patrones comunes en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares<sup>75</sup>. Este estudio ha sido desde entonces la base para el desarrollo de numerosas herramientas de predicción. Así, basándose en los patrones observados para para el Estudio Framingham (Tabla 1), se han desarrollado puntuaciones de riesgo que incluyen los principales factores de riesgo no genéticos tales como edad, presión sanguínea, hábitos tóxicos, niveles de colesterol o diabetes. De modo similar, existen tablas de riesgo para predecir enfermedades coronarias basadas en el riesgo primario de aterosclerosis (Estudio ARIC)<sup>76</sup>.

Desafortunadamente, estos factores son prevalentes en una amplia proporción de la población, y se ha estimado que los algoritmos basados en parámetros de riesgo convencionales para el síndrome coronario agudo, tan sólo predicen correctamente un 11% de los casos a diez años<sup>77</sup>. De hecho, algunos estudios han estimado que entre un 30% y un 60% de la variabilidad interindividual en la susceptibilidad a enfermedades coronarias se debe a factores genéticos<sup>78</sup>, y esto hace que muchas de las terapias sean administradas uniformemente sobre un espectro heterogéneo de etiologías y perfiles genéticos.

El avance de las tecnologías de análisis genómico ha permitido evaluar la contribución de multitud de SNPs a la susceptibilidad a desarrollar enfermedades coronarias. Sin embargo, se ha demostrado que la contribución de variantes genéticas individuales al riesgo de enfermedades coronarias es pequeña<sup>79</sup>, lo que subraya la naturaleza poligenética de este conjunto de enfermedades y hace recomendable

completar estudios adicionales que permitan afinar las tablas de predicción basadas en riesgo genético.

La raza, considerado una variable de riesgo importante durante largo tiempo, ha sido recientemente reducida a variable marginal tras comprobarse que las disparidades en la incidencia de enfermedades coronarias son principalmente debidas a diferencias de status socioeconómico asociados a distintos grupos étnicos dentro de contextos geográficos similares<sup>80,81</sup>.

**Tabla 1. Análisis multivariante del riesgo relativo para la CI tomando los valores de LDL como referencia.**

	Riesgo relativo	IC 95%	Riesgo relativo	IC 95%
<b>Edad (años)</b>	1,05	1,04-1,06	1,04‡	1,03-1,06
<b>Presión sanguínea</b>				
Normal	1,00	Ref	1,00	Ref
Normal-alta	1,32	0,98-1,78	1,34	0,88-2,05
HT de grado I	1,73‡	1,32-2,26	1,75†	1,21-2,54
HT de grado II	1,92‡	1,42-2,59	2,19‡	1,46-3,27
<b>Tabaquismo (s/n)</b>	1,71‡	1,39-2,10	1,49†	1,13-1,97
<b>Diabetes (s/n)</b>	1,47*	1,04-2,08	1,80†	1,18-2,74
<b>LDL-C (mg/dl)</b>				
<130	1,00	Ref	1,00	Ref
130-159	1,19	0,91-1,54	1,24	0,84-1,81
≥160	1,74‡	1,36-2,24	1,68†	1,17-2,40
<b>HDL-C (mg/dl)</b>				
<35	1,46†	1,15-1,85	2,08†	1,33-3,25
35-59	1,00	Ref	1,00	Ref
≥60	0,61*	0,41-0,91	0,64†	0,47-0,87

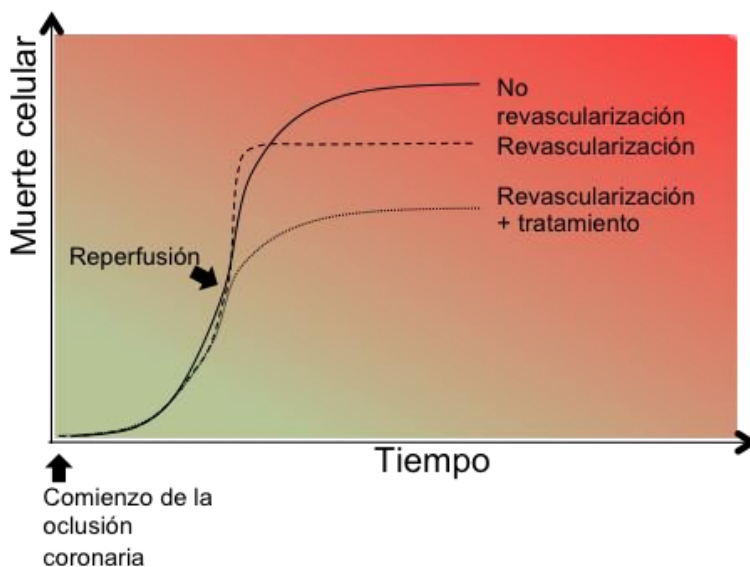
Los modelos multivariante fueron realizados de forma separada para hombres y mujeres. Cada modelo incluyó simultáneamente todas las variables descritas en la tabla. \*p-valor<0,05, †p-valor<0,01, ‡p-valor<0,001<sup>82</sup>. Tabla adaptada de Wilson, P. W. *et al.*



### 3. Fisiología de la cardiopatía isquémica

Durante la isquemia, la arteria coronaria que aporta al tejido miocárdico nutrientes y oxígeno se encuentra lo suficientemente ocluida para impedir el aporte de moléculas esenciales a las células. Hace unos años se creía que la muerte celular ocurría principalmente durante la isquemia, fundamentalmente como resultado del descenso de los niveles de ATP y sus múltiples consecuencias. En este viejo paradigma, se pensaba que la reperfusión era esencial para restaurar la síntesis de ATP y consecuentemente prevenir el daño celular durante la isquemia. Sin embargo, resultó paradójico observar que la reperfusión tras la isquemia provocaba aún más daño en las células que sobreviven debido al incremento repentino de oxígeno (Figura 8). Este proceso de isquemia-reperfusión (I/R) induce el cambio de proteínas celulares y de la expresión de genes incluyendo la activación de genes apoptóticos y la represión de genes antiapoptóticos.

El miocardio puede tolerar pequeños períodos (hasta 15 minutos) de isquemia total o severa sin resultar en la muerte de los cardiomiocitos. Esto se comprobó al observarse la recuperación de tejido en situaciones de vasoespasmo coronario, angina o angioplastia usando balón en los 15 minutos siguientes a la isquemia<sup>56,71,72</sup>.



**Figura 8. Muerte celular en diferentes procedimientos tras la isquemia.** La muerte celular después de la isquemia es máxima en ausencia de revascularización. La revascularización del tejido produce menor muerte celular, excepto en las primeras fases de la revascularización. El tratamiento médico con estatinas puede disminuir la muerte celular tras la I/R<sup>83</sup>.

Debido al daño ocasionado la capacidad del corazón para contraerse se ve seriamente comprometida. En un momento por mantener la función contráctil y como consecuencia se produce un proceso conocido como remodelado ventricular. En un

estadio temprano dicho remodelado está asociado con dilatación ventricular, hipertrofia celular y elevados niveles de citoquinas que provocan cambios en la actividad autónoma que mantiene la funcionalidad cardíaca. En estadios más avanzados del remodelado, la fibrosis, deposición de colágeno, fallos en la señalización por calcio, el estrechamiento de la pared cardíaca y el continuo y elevado ratio de muerte celular contribuyen al fallo cardíaco.

El nivel de afectación de tejido debido a la isquemia dependerá del punto en el cual se produce la obstrucción del flujo sanguíneo en el corazón. Así, el punto de obstrucción de flujo es determinante para la supervivencia del individuo puesto que, cuanto mas próximo se encuentre a la aorta, mayor será el volumen de tejido afectado y peor el pronóstico (Tabla 2)<sup>58,59,84,85</sup>.

**Tabla 2. Mortalidad asociada al infarto agudo de miocardio estratificada en base a la topografía del área afectada por la isquemia. Basada en datos de la población GUSTO-I, que recibió reperfusión<sup>85</sup>.**

Categoría	Topografía arterial de la obstrucción	Mortalidad (%)	
		30 días	1 año
Arteria descendente anterior proximal	Proximal a 1ª septal	19,6	25,6
Arteria descendente anterior media	Distal a 1ª septal, proximal a diagonal	9,2	12,4
Arteria descendente anterior distal/diagonal	Distal a diagonal grande o diagonal	6,8	8,4
Inferior moderado/grande (posterior, lateral, ventrículo)	Coronaria derecha o circunfleja	6,4	8,4
Inferior estricto (pequeño)	Coronaria derecha o rama de circunfleja	4,5	6,7

La capacidad de regeneración limitada de los cardiomiocitos adultos es una de las razones principales por la cual constituyen un foco de interés clínico. Aunque los cardiomiocitos post-natales son capaces de dividirse, el número de replicaciones que tendrían que producirse para repoblar el miocardio dañado es demasiado elevado. Es por ello que el desequilibrio existente entre la pérdida y la regeneración celular es un factor a tener en cuenta a la hora de entender las causas del remodelado y el fallo cardíaco.

Debido a esta capacidad limitada de proliferación, otras células cardíacas asumirán algunas de las funciones de los cardiomiocitos tras el infarto de miocardio.

Así, los cardioblastos por su parte, se diferencian hacia miofibroblastos, proliferan y comienzan a sintetizar proteínas del aparato contráctil y del sistema de propagación del impulso eléctrico<sup>86,87</sup>. La adquisición de potencial miogénico les permitirá contribuir temporalmente a la contracción pero, en un entorno tisular ya dañado, el acoplamiento de estas células es deficiente y esto conduce a la aparición de arritmias graves que comprometen todavía más la función cardíaca. En la zona de daño focal, tras un proceso inflamatorio agudo que se extiende a lo largo de los 3-4 primeros días tras la isquemia<sup>88</sup>, la pared ventricular no solo pierde su funcionalidad contráctil sino también su robustez. A partir de ese momento, y a riesgo de comprometer de forma definitiva la contracción, el tejido empieza a sintetizar de forma apresurada la matriz extracelular que constituirá la cicatriz, para evitar así la rotura del tejido y el subsecuente fallo total del órgano. El aumento del estrés mecánico de la pared miocárdica desencadena una serie de eventos que incluyen una respuesta inflamatoria en las zonas borde de infarto. Así, se produce una acumulación de linfocitos y macrófagos, además de la secreción un importante número de citocinas pro- y antiinflamatorias. Por otra parte, el tejido aún contráctil asumirá la carga energética necesaria para que el flujo sanguíneo a través del corazón no se vea comprometido. Por tanto, los procesos que ocurren en la zona borde de infarto son responsables de restaurar la homeostasis, funcionalidad y integridad tisular del corazón.

Cuando el tejido cardíaco está sometido a isquemia se activan los procesos de arteriogénesis (remodelado de vasos pre-existentes) y angiogénesis (proliferación de capilares *de novo*). La activación de rutas moleculares pro-angiogénicas inducidas por hipoxia es un mecanismo de protección que asegura el suministro de nutrientes en el tejido afectado<sup>89</sup>. Los HIFs (del inglés *hypoxia inducible factors*) por ejemplo, son factores de transcripción cuya expresión se activa en condiciones de estrés hipóxico y son capaces de inducir la expresión de genes que, como VEGF (del inglés *vascular endothelial growth factor*), promueven la angiogénesis. Sin embargo, cuando el tejido sufre una lesión extrema, los mecanismos de homeostasis que resultan efectivos para el mantenimiento normal del tejido resultan insuficientes. De hecho, las respuestas agudas a la hipoxia tisular pueden no ser necesariamente beneficiosas para la recuperación funcional del tejido. Así, la proliferación de nuevos vasos como respuesta a la hipoxia va acompañada de un incremento de factores vasodilatadores como el óxido nítrico y VEGF. Estas moléculas incrementan la permeabilidad vascular y pueden conducir a la formación de edemas tras el infarto de miocardio<sup>90</sup>.

## **D. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA**

### **1. Mitocondria, inflamación y aterosclerosis**

Las consecuencias que la disfunción mitocondrial puede tener durante el desarrollo de la aterosclerosis son múltiples, entre las que se incluyen el proceso de inflamación causado por un incremento de ERO, la apoptosis y la senescencia. Así, la disfunción mitocondrial promueve directamente las situaciones que conllevan a la obstrucción de la arteria.

Entre las muchas fuentes celulares de producción continua de ERO, las mitocondrias y la NADH oxidasa son las más importantes bajo condiciones fisiológicas<sup>91</sup>. El aumento de la producción de ERO produce daño a nivel de lípidos, proteínas, ADN nuclear y ADNmt. Este último es, a nivel fisiológico, el más sensible a la fragmentación provocada por un incremento del estrés oxidativo. La fragmentación del ADNmt produce un descenso en los transcritos de ARNm, síntesis de proteínas mitocondriales y en el potencial de membrana.

El paso inicial en la aterogénesis es el aumento de LDL (del inglés *low density lipoprotein*), y su posterior deposición, retención y modificación en el subendotelio. Este proceso, seguido por el reclutamiento de monocitos circulantes en la íntima vascular y su posterior transformación en células espumosas, son elementos clave en la aterosclerosis. La infiltración se produce preferentemente en sitios que tienen alterada la dinámica de flujo, donde el endotelio se vuelve disfuncional a nivel celular y molecular y aumenta su permeabilidad a macromoléculas tales como LDL. Paralelamente, se produce un aumento de la expresión de moléculas de adhesión endotelial de leucocitos y factores quimiotácticos. La activación de la cascada de adhesión conduce, en última instancia, a la transmigración de monocitos hacia el espacio subendotelial de la íntima y la subsiguiente diferenciación en macrófagos. Allí, su activación acelera la generación de ERO y la oxidación de LDL<sup>92</sup>

Curiosamente, se ha demostrado también que los derivados de O<sub>2</sub> mitocondriales son esenciales para la oxidación de LDL *in vitro*<sup>93</sup>. El LDL oxidado (LDL<sub>ox</sub>) induce la apoptosis de todas las células implicadas en aterogénesis, y las diferentes rutas mitocondriales juegan un papel crítico en este proceso. Por ejemplo, la apoptosis en células umbilicales endoteliales humanas producida por LDL<sub>ox</sub> está mediada por la disfunción en el potencial de membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c al citosol<sup>94</sup>. De hecho, la ciclosporina A previene la apertura de los poros permeables mitocondriales evitando la liberación de citocromo c hacia el citosol e inicio

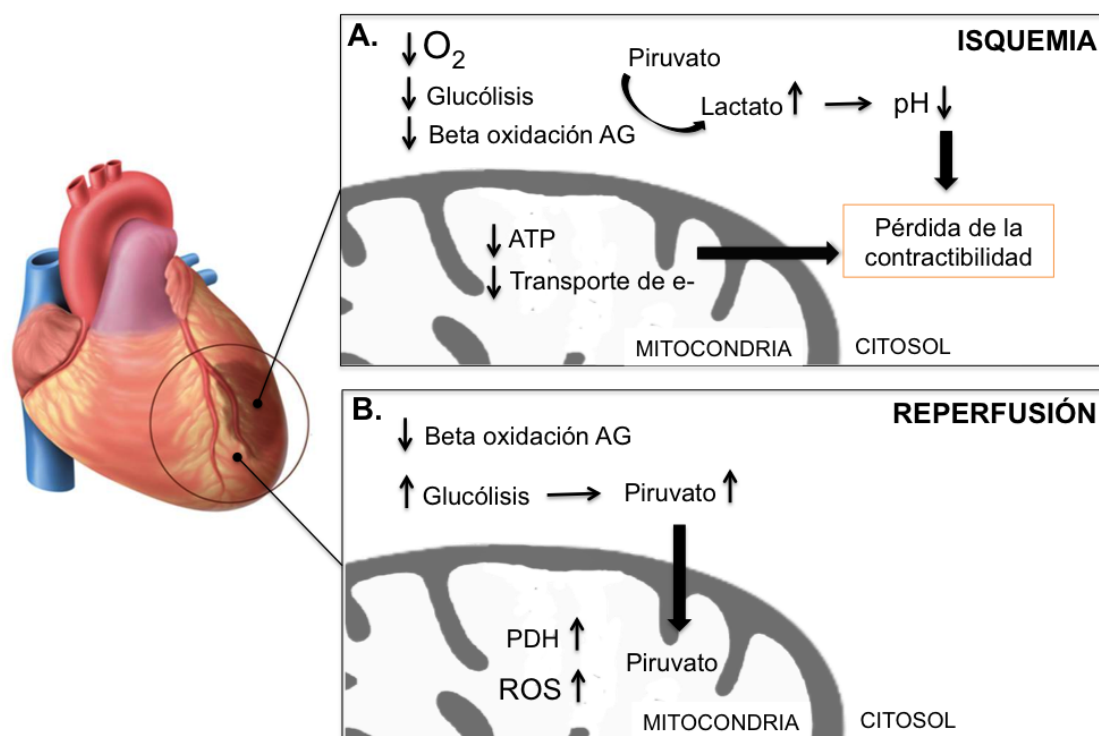
de la apoptosis. Esto convierte a la ciclosporina A en un agente antiaterogénico correlacionado con la prevención de la disfunción mitocondrial<sup>95</sup>. Por otra parte, el LDLox también indujo producción de ERO en células endoteliales amplificando la señal apoptótica<sup>96</sup>. Recientemente, se ha demostrado que la apoptosis inducida por LDLox implica dos rutas mitocondriales distintas dependientes de calcio. La primera, está mediada por la liberación de un agente proapoptótico de la familia Bcl-2, la apertura del poro de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c, y la posterior activación de la caspasa-3<sup>97</sup>. La segunda vía está mediada por la liberación del factor inductor de apoptosis, que no es sensible a la ciclosporina y es caspasa independiente<sup>98</sup>.

Varios inhibidores farmacológicos del metabolismo energético mitocondrial que incrementan la producción de ERO perjudican de manera dosis-dependiente la relajación del endotelio vascular<sup>99</sup>. Por ejemplo la rotenona, un inhibidor del transporte de electrones en mononucleótido flavina, es capaz de inhibir la relajación del endotelio mediada por acetilcolina<sup>100</sup>. Del mismo modo, la antimicina A, inhibidor el transporte de electrones en el citocromo b-c1 y la oligomicina, inhibidor mitocondrial F1-ATPasa, son capaces de inhibir la producción de NO endotelial en aorta<sup>101</sup>. En conjunto, estos datos ilustran que la disfunción mitocondrial afecta a la viabilidad endotelial induciendo la apoptosis, dando lugar al desarrollo de la aterosclerosis.

## **2. Mitocondria e Isquemia/Reperfusión**

Cuando el aporte de oxígeno es limitado, como ocurre durante la isquemia miocárdica, la fosforilación oxidativa y el flujo del transporte electrónico disminuyen, se produce una depleción rápida de las reservas de creatin-fosfato, disminuye la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos y se deteriora la producción de ATP. La hidrólisis del ATP derivado de la glucólisis y la acumulación de lactato conducen a una disminución del pH intracelular y al desarrollo de acidosis intracelular. Tanto la reducción del pH como el aumento de fosfato inorgánico son los factores moleculares responsables de la disminución inmediata de la contractibilidad, que conducen a la acinesia de la zona isquémica. Si la restricción de oxígeno se mantiene, las mitocondrias se convierten en dianas para el daño por isquemia, disminuyendo la posibilidad de que recuperen la normalidad en su metabolismo y función (Figura 9.A). Sin embargo, cuando se produce la reperfusión del tejido tiene lugar un cambio en las rutas metabólicas de obtención de energía en el corazón. La glucólisis se convierte en la ruta principal de obtención de ATP en lugar de la beta oxidación de los ácidos

grasos. Teóricamente, esta adaptación metabólica es beneficiosa debido a que la oxidación de la glucosa es más eficiente que la oxidación de ácidos grasos en términos de consumo de oxígeno. Un cambio completo hacia el metabolismo de la glucosa reduce la demanda de oxígeno en un 11-13%<sup>1</sup>. Hasta la fecha no se ha prestado mucha atención a las rutas de señalización y los cambios en el metabolismo de la energía durante la isquemia y la reperfusión. Un análisis combinado proteómica y metabolómica de corazones de ratones transgénicos con sobreexpresión de la proteína quinasa C epsilon mostraron cambios en la expresión de las enzimas clave del metabolismo de la glucosa, incluyendo la piruvato deshidrogenasa (PDH)<sup>102</sup>, lo que podría estar asociado a un incremento del transporte de piruvato al interior de la matriz mitocondrial (Figura 9.B).



**Figura 9. Mitocondria e isquemia reperfusión.** **A.** Isquemia. Durante la isquemia el aporte de oxígeno en la zona en la cual se produce el trombo es insuficiente lo que provoca la disminución de la oxidación del piruvato e incremento de la concentración de lactato y el pH celular baja. Al mismo tiempo, debido a la falta de precursores metabólicos, disminuye el transporte de electrones en la CTM y por tanto, la producción de ATP. Esta situación provoca la pérdida de la contractibilidad del tejido. **B.** Reperfusión. Tras la reperfusión del tejido la beta oxidación de los ácidos grasos (AG) disminuye mientras que la glucólisis y por tanto, la concentración de piruvato, aumentan. Esto podría generar un incremento de piruvato al interior de la mitocondria y aumento de su metabolismo por la piruvato deshidrogenasa (PDH).

Se han descrito numerosas alteraciones mitocondriales como consecuencia de la isquemia o reperfusión postisquémica. Las mitocondrias extraídas a partir de corazones isquémicos muestran una disminución del potencial de la membrana, y disminución de la función de la NADH deshidrogenasa<sup>103</sup>. Estudios de resonancia

magnética nuclear en muestras de corazones isquémicos muestran que la fosforilación oxidativa podría ser todavía activa, pero el consumo de oxígeno no se correlaciona con el rendimiento<sup>104</sup>. Datos sobre los cambios inducidos por la isquemia muestran una alteración de la estructura mitocondrial cuando las mitocondrias son aisladas tras una isquemia prolongada<sup>105</sup>. Su función, sin embargo, sufre solo pequeños cambios incluso después de la isquemia grave, lo que sugiere que existe una función residual incluso en las mitocondrias extraídas de tejidos gravemente dañados. La figura 10 representa la actividad de SOD2 y la producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ) en mitocondrias aisladas tras diferentes períodos de isquemia. El aumento del período de isquemia reduce la actividad de la SOD2, con un aumento concomitante de la producción de  $O_2^-$  lo que provoca daño específico a nivel de los componentes de la cadena respiratoria responsables en parte del deterioro de su función<sup>106</sup>.

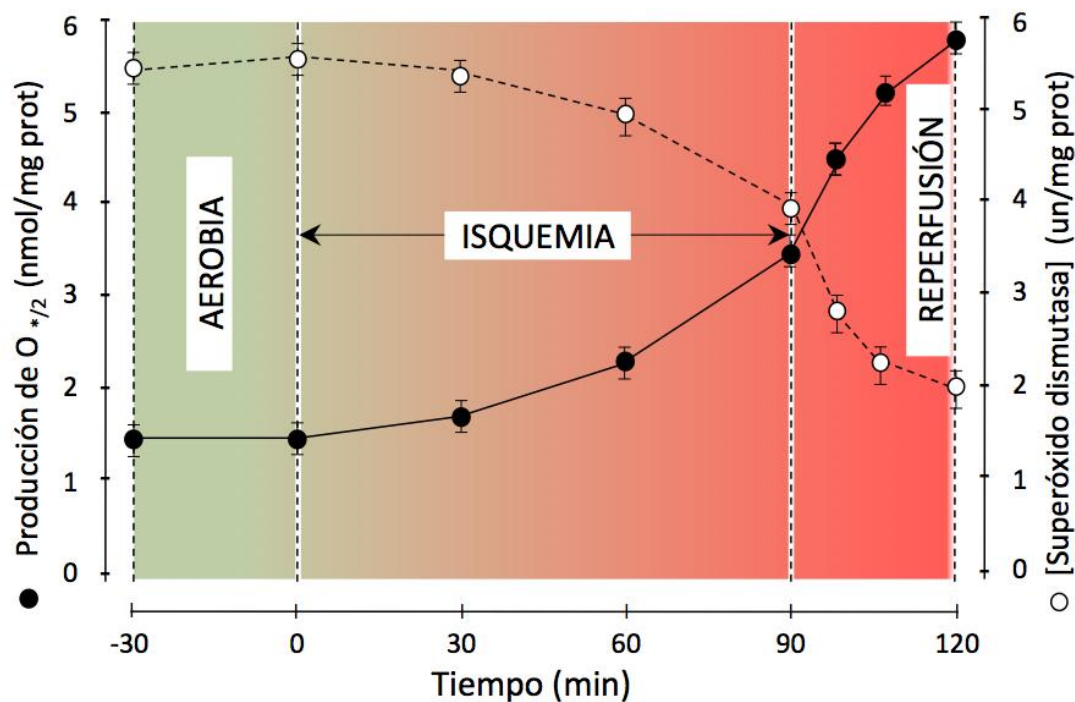


Figura 10. Gráfica en la cual se representa el efecto de 90 minutos de isquemia seguidos de 30 minutos de reperfusión en la actividad de SOD2 y producción de  $O_2^-$  en mitocondrias *in vitro*<sup>106</sup>.

Aunque durante las últimas 5 décadas se han documentado cambios en la estructura y función respiratoria mitocondrial durante la isquemia/reperfusión (I/R), ha sido durante los últimos 10 años cuando se ha demostrado su papel clave tras estrés celular<sup>35,107</sup>. La mitocondria se encuentra en un punto central a la hora de hablar de señalización de rutas que conducen a la inflamación, apoptosis o necrosis del tejido. Estas rutas conducen hacia la privación de nutrientes, oxígeno y factores de supervivencia, estrés oxidativo, daño de ADN y estrés proteotóxico. Los estudios



llevados a cabo hasta la fecha sugieren que las rutas mitocondriales que median la apoptosis y necrosis se encuentran tanto espacial como bioquímicamente separadas. El primer evento en la apoptosis es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial a la liberación de moléculas apoptóticas. En el caso de la necrosis, el evento inicial es la apertura de los poros de transición mitocondrial.

La composición molecular exacta de los poros permeables de transición es desconocida. Los principales componentes parecen ser el transportador del nucleótido adenina en la MIM, el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC, del inglés *voltage-dependent anion channel*) en la MEM y ciclofilina D en la matriz<sup>108</sup>. Además existen reguladores tales como el receptor de benzodiazepina, la hexoquinasa, y creatin kinasa. Los poros permeables de transición son calcio, redox, voltaje y pH dependientes tal que su probabilidad de apertura aumenta con la liberación de calcio, ERO, despolarización de membrana y alcalosis.

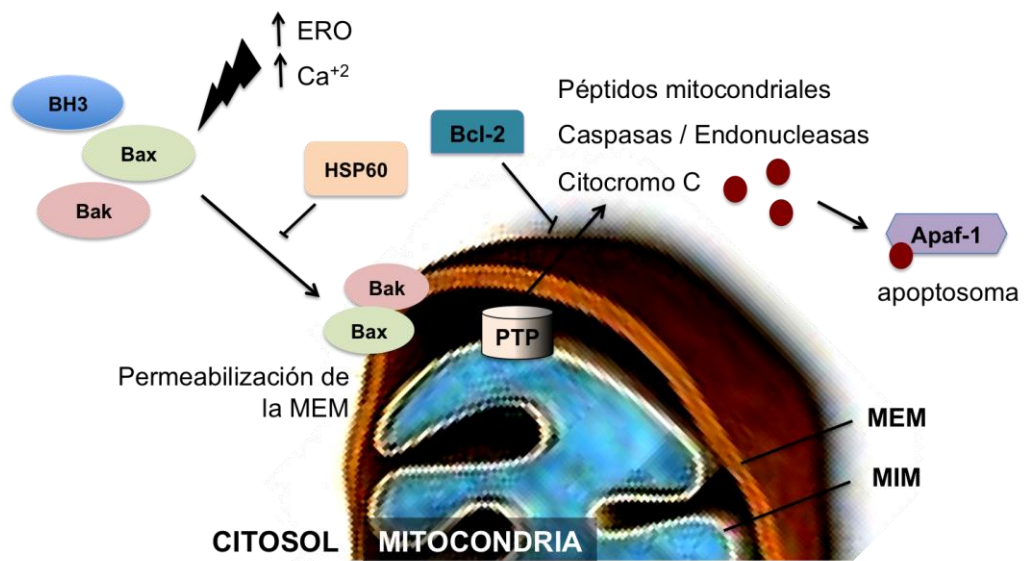
### **2.1. Daño por apoptosis tras Isquemia/Reperfusión**

Las principales reguladoras de la ruta mitocondrial de apoptosis son las proteínas de la familia Bcl-2<sup>36,109</sup>. Esta familia está compuesta tanto por miembros antiapoptóticos (ej. Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) como proapoptóticos; éstos últimos se dividen a su vez en proteínas multidominio (ej. Bax, Bak) y proteínas de un solo dominio (BH3)<sup>37,110,38,111</sup>. En células sanas, Bax se localiza principalmente en el citosol. En respuesta a un estímulo apoptótico Bax y Bak sufren un cambio conformacional y se translocan a la mitocondria insertandose en su membrana externa<sup>39,112</sup>. Una vez allí Bax y Bak oligomerizan produciendo una permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

La liberación de péptidos mitocondriales se produce por la apertura de un megacanal, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), un complejo multiproteico dinámico localizado en los puntos de contacto entre la MIM y la MEM, que se activa por la unión de proteínas proapoptóticas. Dicha permeabilización conduce a la liberación de apoptógenos, incluida la liberación del citocromo c, caspasas y endonucleasas desde la mitocondria hacia el citosol. El citocromo c se une a la proteína citosólica Apaf-1 (del inglés *Apoptotic Protease Activating Factor 1*) dando lugar a un complejo denominado apoptosoma<sup>40,113,41,114</sup>. La apertura del PTP está promovida por el influjo de Ca<sup>2+</sup> hacia la mitocondria y por la producción excesiva de radicales libres del oxígeno en la mitocondria<sup>42,115</sup> (Figura 11).



Por otra parte, existen numerosos inhibidores de las rutas apoptóticas. Entre ellos se incluyen las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 que bloquean la liberación de los apoptógenos mitocondriales o proteínas como Hsp-60 que actúan secuestrando los complejos Bax<sup>43,116</sup>. Se ha comprobado que la sobreexpresión de Hsp10 y Hsp60 inhibe la apoptosis mitocondrial en respuesta al daño por isquemia. Un estudio reciente mostró que el silenciamiento del gen Hsp60 estaba asociado con el incremento en la expresión de Bax y una reducción de Bcl-2. Esta situación daba lugar a la apoptosis en cardiomiocitos arrojando pistas sobre la posibilidad de que Hsp60 regule la apoptosis a través de la familia Bcl-2.



**Figura 11. Esquema de la cascada que conduce a la liberación de estímulos apoptóticos desde la mitocondria.** En respuesta a un estímulo apoptótico Bax y Bak se translocan hacia la membrana externa de la mitocondria donde oligomerizan produciendo su permeabilización. La unión de proteínas proapoptóticas activa el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) conduciendo a la liberación de apoptógenos como el citocromo c, caspasas y endonucleasas desde la mitocondria hacia el citosol. El citocromo c se une a la proteína citosólica Apaf-1 dando lugar al complejo apoptosoma. Por otra parte, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 bloquean la liberación de los apoptógenos mitocondriales. Hsp-60 por su parte actúa secuestrando los complejos Bax.

## **2.2. Daño por necrosis tras Isquemia/Reperusión**

En contraste a la permeabilización de la MEM en la apoptosis, el acontecimiento que inicia la necrosis en la mitocondria es la apertura de numerosos PTPs en la MIM. En mitocondrias sanas, la MIM es impermeable al agua, iones, protones e incluso protones individuales. Algunos activadores de esta vía, como el  $\text{Ca}^{2+}$  y las ERO, inducen la apertura de PTPs en la MEM durante la isquemia y la posterior reperusión, proceso que se ve a su vez potenciado por la deplección del ATP o ADP<sup>47,48,117,118</sup>. Esta situación provoca la pérdida repentina del potencial de membrana y cese de la

síntesis mitocondrial de ATP. Además, la apertura del poro produce una pérdida del gradiente osmótico en la matriz, que se llena de agua provocando la ruptura de la MEM. Esto facilita la liberación de citocromo c y consecuente activación de caspasas<sup>49,119</sup>. Sin embargo el mecanismo mediante el cual señales apoptóticas pueden contribuir a la necrosis es todavía fuente de debate.

La necrosis puede ocurrir como consecuencia primaria o secundaria a la apoptosis. Éste último proceso ocurre cuando la disposición de cuerpos apoptóticos se retrasa. En la necrosis primaria, el orificio en la MIM se produce al principio, antes de la liberación del citocromo c. Si la apertura en la MIM tiene lugar durante la apoptosis, esta se produce a la vez o bien posteriormente a la liberación del citocromo c. En este caso, la apertura de los PTPs en la MIM es dependiente de caspasas<sup>50,120</sup>. Aunque la cinética de estos eventos difiere notablemente, estas observaciones explican porqué la pérdida de la membrana mitocondrial puede ser un marcador tanto para la necrosis como para la apoptosis.

## **E. MODELOS EXPERIMENTALES DE CARDIOPATÍA ISQUÉMICA**

Para encontrar y describir cuáles son los procesos que subyacen a las distintas manifestaciones de fallo cardiaco es importante tener en cuenta la interacción entre diferentes órganos, tejidos o tipos celulares en un entorno fisiológico. Además, para probar la eficacia de nuevos tratamientos se requiere el uso de modelos simplificados. Un evento de isquemia miocárdica provocará en muchas ocasiones un descenso en la fracción de eyección, y las consecuencias a nivel metabólico se traducirán en respuestas hormonales y nerviosas que afectarán al desarrollo de la enfermedad coronaria. Potencialmente, los modelos animales que reproducen la lesión en enfermedades vasculares pueden conducir al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Sin embargo, los costes de la investigación con animales, especialmente si se trata de desarrollar nuevos modelos, es elevado, tanto desde el punto de vista económico como de mortalidad animal<sup>121</sup>.

En un intento de definir el papel exacto de los modelos animales como plataformas de futuro para la terapia humana se han llevado a cabo varias revisiones sistemáticas<sup>122,123</sup>. Una revisión de 76 estudios con animales demostró que sólo el 37%<sup>124</sup> de los estudios (n=28) fueron reproducidos en humanos, mientras que el 45% permaneció sin probarse<sup>125</sup>. Además, sólo ocho de los 28 estudios fueron aprobados finalmente para su uso clínico. Esta estadística se podría considerar relativamente baja, de hecho, un informe reciente de *NIH Heart, Lung and Blood Institute* de Estados Unidos concluyó que la selección inapropiada de modelos animales, así como la falta de reproducibilidad y de modelos estandarizados son responsables de la baja translacionalidad del laboratorio a la práctica clínica<sup>126</sup>.

### **1. Modelos de simulación de isquemia miocárdica**

Debido a la alta incidencia del infarto de miocardio, se han realizado muchos estudios en modelos animales con el objetivo de entender la patofisiología de esta enfermedad y del proceso de I/R. Los tres modelos principales a la hora de estudiar el proceso de I/R son:

1. Modelo Langendorff
2. Modelo de corazón aislado
3. Modelo de oclusión arterial

### **1.1. Modelo Langendorff**

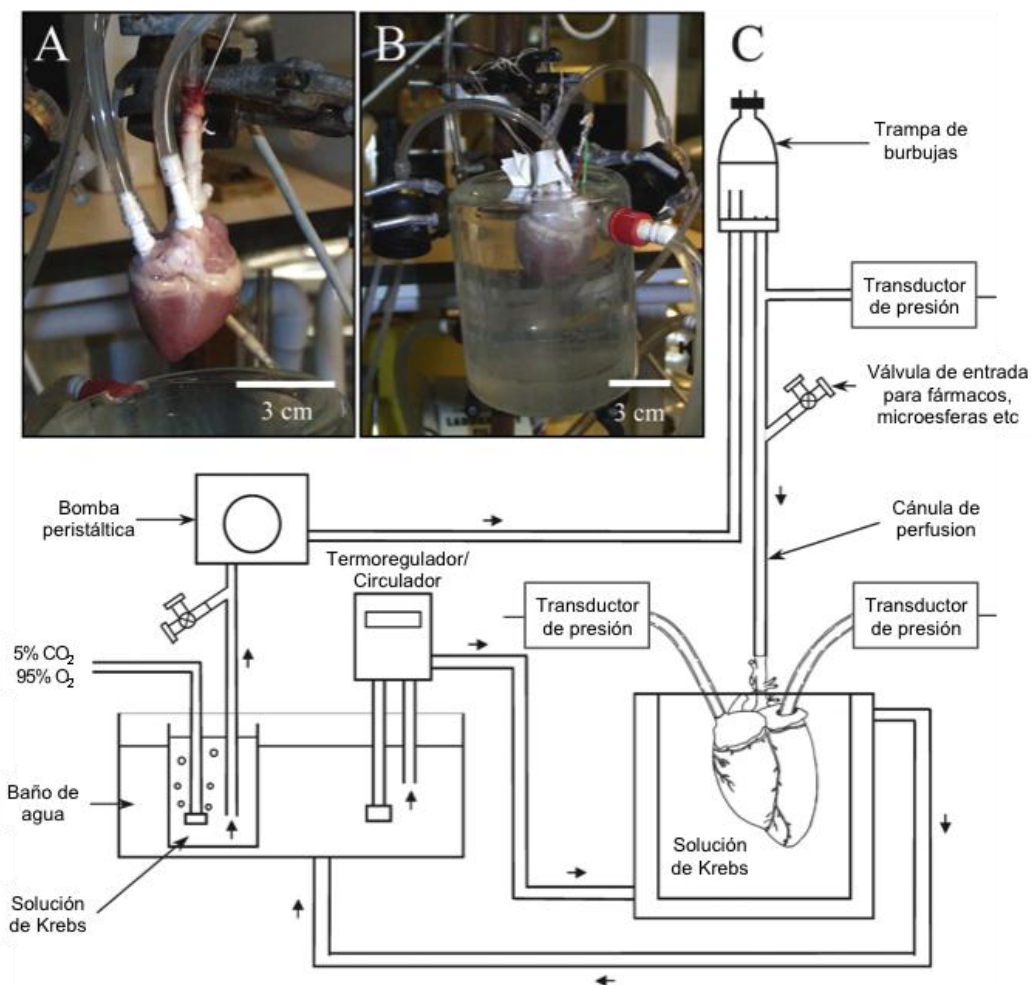
El sistema de Langendorff es un modelo *ex vivo* usado para estudiar la fisiología cardíaca. Resulta útil para modelos de isquemia y para testar la eficacia de un fármaco o terapia celular en el corazón<sup>127</sup>. Aunque puede ser utilizado con corazones de mamíferos grandes, los animales pequeños como ratones y ratas son los más usados, debido sobre todo a su bajo coste y manejabilidad logística. Además, la disponibilidad de ratones genéticamente modificados los hace idóneos para la investigación de citocinas miocárdicas y de rutas de señalización utilizando este sistema.

Elias Cyon en 1866 desarrolló el modelo precursor para la perfusión de un corazón aislado utilizando un corazón de rana explantado<sup>128</sup>. En 1895 este diseño fue modificado por Oscar Langendorff para estudiar el corazón de mamíferos. Langendorff utilizó una cánula aórtica para suministrar sangre a la aorta bajo presión constante. Este flujo cerrado enviaba sangre a las arterias coronarias y, posteriormente, hacia a el seno coronario y la aurícula derecha. El flujo coronario en la aurícula derecha se medía como el acortamiento muscular del corazón a través de un sistema de poleas conectadas al vértice del corazón<sup>129,128</sup>. Sin embargo, este modelo no medía el trabajo sistólico ventricular, es decir, el producto del volumen eyectado y la presión requerida para mover el fluido.

El modelo Langendorff moderno sólo conserva la perfusión cerrada desde la aorta (Figura 12). Una solución fisiológica descrita por Krebs y Hensleit (solución KH o de Krebs) sustituye a la sangre. La solución de KH es suministrada tanto a presión como a flujo constante. Para evaluar la función del corazón, el apéndice auricular izquierdo se escinde, y un globo conectado a un transductor de presión se coloca a través de la aurícula izquierda en el ventrículo izquierdo<sup>130</sup>. El globo se infla para mantener una presión constante. La contracción del ventrículo izquierdo contra el globo inflado genera una lectura continua de la presión que se convierte en mediciones de la frecuencia cardíaca, la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, la presión diastólica final, la tasa de contracción y la tasa de relajación.

Uno de los puntos fuertes del Langendorff es la capacidad de evaluar el impacto de la I/R regional o global del corazón. La lesión regional por I/R puede ser inducida a través de la ligadura transitoria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda<sup>131</sup> o a través de un catéter de doble espacio que proporciona selectivamente la perfusión a uno de los orificios coronarios<sup>132</sup>. La isquemia regional es arritmogénica, a menudo se usa para estudiar los efectos de las drogas sobre las arritmias. Por su parte, la I/R global es de especial interés desde el punto de vista quirúrgico, ya que

reproduce los efectos de cardioplegia y posterior reinicio en la cirugía cardíaca. Para inducir la isquemia global en el modelo Langendorff, la perfusión coronaria se detiene, y el corazón se sumerge en un baño de agua caliente para inducir la lesión por un tiempo determinado antes de la reperfusión. Existen cuatro diferencias fundamentales entre este modelo de I/R y el fallo cardíaco humano sometido a cirugía cardíaca. En primer lugar, en humanos se da cardioplejía fría para parar el corazón. En segundo lugar, el animal antes de la cardioectomía recibe heparina intraperitoneal y heparina no intravenosa. En tercer lugar, la isquemia caliente induce lesión en el modelo Langendorff *versus* la isquemia fría en el humano. Por último, en el modelo Langendorff el corazón aislado está libre de cualquier factor sistémico (por ejemplo, señalización autonómica, sangre completa).



**Figura 12. Modelo Langendorff.** A. Corazón fetal de oveja canulado para su perfusión. B. Corazón inmerso en el baño con solución de Krebs a 37 °C. C. Representación esquemática del aparato de perfusión<sup>133</sup>.

## **1.2. Modelo de corazón aislado**

Neely y sus colegas modificaron el modelo Langendorff para resolver su incapacidad de cuantificar el trabajo ventricular izquierdo<sup>134</sup> y desarrollaron el modelo del “corazón aislado de trabajo”. En este modelo, la solución de KH entra en la aurícula izquierda a través de una cánula unida a una bomba peristáltica. El ventrículo izquierdo expulsa este volumen contra un cabezal de presión constante creado por una columna hidrostática conectada a la aorta. Al proporcionar volumen de expulsión del ventrículo izquierdo, el trabajo puede ser calculado.

Otros han llevado la modificación de Neely un paso más allá con un modelo de cuatro cámaras de trabajo donde las cuatro cámaras del corazón se llenan y expulsan<sup>135</sup>. Esta última modificación se ha aplicado incluso a los corazones humanos que se consideraban no aptos para trasplante después de la explantación<sup>136</sup>. El modelo de corazón de trabajo ofrece la ventaja del estudio de la función cardíaca bajo condiciones de carga variables<sup>137</sup>. Aunque el modelo de “corazón aislado de trabajo” es técnicamente difícil, probablemente los resultados a partir de él ayuden a entender mejor la comprensión de la lesión miocárdica en un entorno *ex vivo*.

## **1.3. Modelo de oclusión arterial**

A diferencia del modelo Langendorff y el modelo de corazón aislado, que estudian el corazón fuera de un contexto fisiológico dentro del cuerpo<sup>128,137</sup>, el modelo de oclusión arterial da una idea de las influencias de todos los sistemas en conjunto en el corazón tras el proceso de I/R o de infarto de miocardio. La oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda se puede realizar a “corazón abierto” o “cerrado” en el modelo animal elegido. La disminución del diámetro arterial coronario puede ser total (isquemia crónica) o parcial (hibernación miocárdica). Además, puede simularse I/R si tras la oclusión total del vaso se produce una restauración del flujo. En este último caso, la duración del período de oclusión determinará la afectación del tejido. Sin embargo, la lesión del tejido tras la I/R no se observa hasta días después tras la operación<sup>138,139</sup>.

La evaluación de la función cardíaca *in vivo* se puede realizar en dos dimensiones empleando ecografía y resonancia magnética. Una forma de cuantificar el tamaño del infarto es perfundiendo cloruro de trifeniltetrazolio antes de la extracción del corazón, pues tiñe el tejido cardíaco delimitando las regiones de alto riesgo y de infarto.

### **1.3.1 Sistemas quirúrgicos de inducción de isquemia o hibernación miocárdica crónicas**

La simulación de la isquemia en un tejido se induce mediante la obstrucción total de la arteria. Esta situación provoca la muerte de los cardiomiocitos y la pérdida de la función contráctil. Sin embargo, cuando la situación que se desea simular es la de hibernación miocárdica se induce la estenosis de la arteria coronaria reduciéndose, pero no impidiéndose el flujo sanguíneo en el corazón. En el caso de la hibernación miocárdica los cardiomiocitos permanecen viables aunque se vea afectada su función contráctil.

**a. Ocluser hidráulico y constrictor ameroide.** Basados en la oclusión total o parcial de alguna rama arterial coronaria y empleados especialmente en animales de gran tamaño. Tras una incisión en el pericardio, se deja expuesta la arteria y a su alrededor se coloca un ocluser hidráulico que se infla hasta que se obtiene el grado de oclusión coronaria deseada (Figura 13.A)<sup>140</sup>. El constrictor ameroide está compuesto por un plástico de caseína que se hidrata a temperatura corporal y se dilata hasta obtener la constricción de la arteria (Figura 13.B)<sup>141</sup>. Puesto que el grado de oclusión puede ser fijado, ambos sistemas son adecuados tanto para modelos de isquemia crónica como de hibernación miocárdica.

**b. Ligamiento coronario.** Tras un procedimiento quirúrgico similar al anterior, la arteria es ligada utilizando hilo o tejido umbilical (Figura 13.C). Este sistema es utilizado en modelos animales de tamaños muy diversos<sup>142</sup> pero sólo es apropiado para la inducción de isquemia miocárdica permanente.

**c. Embolismo arterial coronario.** Se basa en la utilización de microesferas, agarosa, bolitas de poliestireno o la inyección intracoronaria de trombina y sangre autóloga con fibrinógeno para provocar una obstrucción coronaria<sup>143,144</sup> (Figura 13.D). Este procedimiento se lleva a cabo en animales grandes, y el efecto obtenido es de isquemia permanente. Presenta la ventaja frente a las demás, de ser una intervención percutánea, lo que reduce el riesgo de complicaciones por inflamación severa. Como desventaja, aparece la dificultad de controlar de forma precisa la localización exacta de la oclusión.

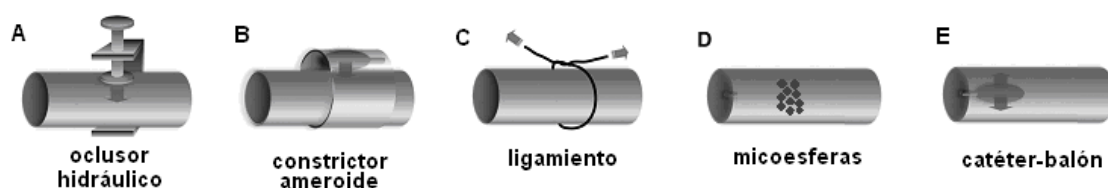


### 1.3.2 Sistemas quirúrgicos de inducción de isquemia-reperfusión

**a. Ocluser hidráulico y constrictor ameroide.** Utiliza el mismo procedimiento que en el caso de la oclusión permanente, pero extrayendo el ocluser para producir la reperfusión del tejido. En este caso es importante tener en cuenta que un tiempo de isquemia excesivo puede rebasar el límite del entorpecimiento miocárdico y derivar en infarto de miocardio.

**b. Ligamiento coronario transitorio.** Utiliza el mismo procedimiento que en el caso del ligamiento permanente. El nudo se mantiene cerrado durante el tiempo convenido y se retira al final de la operación. En este modelo, un pequeño tubo plástico se sitúa entre el cordón y el vaso, para minimizar el daño y permitir una mejor restauración del flujo coronario.

**c. Embolismo coronario transitorio.** La necesidad de utilizar técnicas quirúrgicas altamente invasivas es una desventaja puesto que el riesgo de inflamación severa y otras complicaciones hacen que la tasa de supervivencia sea baja. En animales grandes, el embolismo transitorio de la arteria coronaria puede provocarse utilizando cateterismo arterial mediante un procedimiento similar al cateterismo de reperfusión practicado en pacientes con eventos agudos de isquemia coronaria. A partir de una vía femoral o radial se avanza un catéter provisto de un balón apical hasta la arteria coronaria, en donde se infla mediante un sistema hidráulico hasta provocar la embolia total del vaso (Figura 13.E). Transcurrido el tiempo oportuno, se desinfla el balón y se retira el instrumental, suturándose la vía arterial<sup>145</sup>.



**Figura 13. Sistemas quirúrgicos de inducción de isquemia miocárdica.** Modificada de Klocke R. et al, 2007<sup>130</sup>.

## 2. Modelos animales en la cardiopatía isquémica

El estudio de la insuficiencia cardiaca requiere modelos animales viables mediante los cuales se pueda estudiar la evolución de los cambios crónicos en la estructura y función del miocardio, además de cuantificar la progresión de la



insuficiencia cardíaca y de la disfunción del ventrículo izquierdo. En el estudio de la CI se han desarrollado diversos modelos animales:

### **2.1. Modelos en animales pequeños**

**a. Rata.** Diferentes modelos de insuficiencia cardíaca fueron desarrollados originalmente en ratas debido a las numerosas ventajas potenciales inherentes a un modelo de animal pequeño<sup>146,147</sup>. Los costes de mantenimiento de las ratas son mucho menores que los animales grandes, por este motivo, se pueden aumentar el número de animales incluidos en un estudio y mejorar el poder estadístico. Por otra parte, los avances tecnológicos más recientes en ecocardiografía, resonancia magnética, y los microcatéteres para medir la conductancia permiten evaluar la función cardíaca en los roedores, eliminando un obstáculo importante para su utilización en la investigación cardíaca.

La manipulación y experiencia necesaria para realizar operaciones a corazón abierto, procedimientos quirúrgicos invasivos y evaluaciones hemodinámicas en ratas es mucho más fácil en comparación con la requerida para los ratones. Además, los investigadores son capaces de realizar un número mayor de análisis histológicos o moleculares dado que la masa del miocardio es aproximadamente 10 veces más en ratas que en ratones. Por estas razones, los modelos de rata han sido los modelos de corazón con éxito más ampliamente empleados en la investigación básica y traslacional.

**b. Ratón.** Los modelos de ratones con insuficiencia cardíaca ofrecen muchas de las mismas ventajas que los mencionados en los modelos de rata. El mayor beneficio en el uso de modelos de ratón es la disponibilidad de un gran número de ratones transgénicos y cepas *knockout* (KO)<sup>148,149</sup>. La posibilidad de tener ratones KO, transgénicos o con determinado tipo de células específicas, ha convertido a este modelo en una valiosa herramienta para estudiar la patogénesis de la insuficiencia cardíaca y para identificar nuevas dianas terapéuticas. Además, la incorporación de nuevas tecnologías como el ultrasonido de alta resolución<sup>150</sup> y el micromanómetro de conductancia para análisis de presión-volumen<sup>151</sup> ha permitido mejorar en gran medida las evaluaciones cardíaco-fisiológicas. Sin embargo, estas herramientas son extremadamente costosas y plantean importantes retos técnicos a los laboratorios sin una experiencia establecida. Mientras que los modelos de rata mencionados anteriormente se han utilizado ampliamente para explorar el potencial de nuevos agentes farmacológicos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, los modelos

de ratón se utilizan como "prueba piloto" para identificar genes importantes o dianas proteicas que faciliten el camino para el desarrollo de nuevas terapias moleculares o farmacológicas.

Pese a las ventajas mencionadas del uso de pequeños roedores, existen diferencias fisiológicas importantes entre estos modelos y los humanos<sup>152</sup>. El ratón tiene una masa corporal 3000-4000 veces inferior a un adulto medio, presenta una frecuencia cardíaca en reposo 5 veces superior y su tasa metabólica es entre 10 y 15 veces más alta. El potencial de acción de los cardiomiocitos de ratas y ratones se caracteriza por ser muy corto y carecer de la fase de meseta isoeléctrica<sup>153</sup>. La expresión de isoformas de la miosina difiere entre roedores y humanos<sup>154,155</sup> y, aunque la retirada del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico ocurre gracias a la actividad de Serca2 en roedores y humanos, el intercambio  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  resulta menos relevante en los roedores<sup>156</sup>.

Sin duda, gran cantidad de información sobre las bases moleculares y celulares de la biología cardiovascular proviene de los pequeños modelos animales. Sin embargo, existen diferencias significativas con respecto a las características fisiológicas cardíacas entre éstos y los humanos, tales como la frecuencia cardíaca, el consumo de oxígeno, las proporciones de receptores adrenérgicos y la respuesta a la pérdida de proteínas reguladoras<sup>154,157</sup>. Además, por ejemplo la expresión de proteínas contráctiles, críticas para la excitación-contracción proceso de acoplamiento, parecen diferir entre ratones y humanos<sup>154</sup>. Por último, existen importantes diferencias fenotípicas celulares entre el ratón y el humano. En consecuencia, la extrapolación de los sistemas murinos, en particular después de la inducción del estrés cardiovascular, se convierte en un problema a la hora de hacer interpretaciones de la fisiopatología de la CI en humanos.

## **2.2 Modelos en animales grandes**

Como se ha descrito en el anterior apartado, para sortear las desventajas fisiológicas que presenta el uso de animales pequeños se emplean modelos experimentales en animales grandes. Éstos más relacionados filogenéticamente a la fisiología, la función y la anatomía humana, son esenciales para el desarrollo de terapias clínicas e intervenciones para la CI.

**a. Modelos caninos.** Históricamente, el modelo canino ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la isquemia cardíaca y el infarto de miocardio. Así, Reimer et al. llevaron a cabo en 1979 un estudio orientado a describir de forma precisa la

evolución temporal de la lesión en relación con los tiempos de isquemia<sup>158</sup>. Otros estudios han utilizado modelos caninos de isquemia-reperusión para evaluar el remodelado ventricular y su relación con el sistema renina-angiotensina<sup>159</sup>, o el efecto de la inyección de células madre sobre la función cardíaca<sup>160</sup>.

Sin embargo, el sistema vascular coronario del perro se caracteriza por la presencia de una circulación colateral significativa<sup>161</sup> que ejerce un efecto protector sobre el daño por isquemia y altera el desarrollo de los procesos post-isquémicos, haciendo que el tamaño de los infartos inducidos sea muy impredecible<sup>162</sup>. Esto ha hecho trasladar paulatinamente las investigaciones hacia modelos alternativos.

**b. Modelo ovino.** En modelos en ovejas y cerdos, la anatomía coronaria y la ausencia de vasos colaterales preformados, hacen factible inducir infartos de tamaño y ubicación previsible que resultan adecuados para el estudio del remodelado ventricular post-isquémico<sup>163</sup>. El modelo ovino ha sido empleado para estudios relativos a la expansión temprana del infarto y la zona adyacente a éste, demostrando que las regiones adyacentes se extienden hacia zonas contiguas de tejido sano, implicándolas en el proceso de remodelado<sup>164</sup>. Sin embargo, como rumiantes domésticos, las ovejas presentan una anatomía gastrointestinal y un contorno torácico que dificulta la obtención de imágenes ecográficas y hace recomendable un enfoque invasivo<sup>164,163</sup>.

**c. Modelo porcino.** Aunque numerosos descubrimientos con respecto a la isquemia y al infarto de miocardio se han hecho empleando modelos caninos u ovinos, varios factores han contribuido a una transición hacia un modelo más próximo al humano. Teniendo en cuenta las dificultades éticas y logísticas de trabajar con primates, el cerdo se presenta como uno de los modelos más adecuados<sup>165,166</sup>. Su consistente anatomía coronaria arterial, la falta de vasos colaterales preformados, y la capacidad de obtener infartos de tamaño y ubicación predecibles lo señalan como una opción muy razonable para el estudio de la isquemia de miocardio y el remodelado post-infarto. No sólo eso, si que también estudios centrados en la cardiopatía dilatada<sup>167</sup> o terapia celular<sup>168</sup> avalan la validez de este modelo en el campo cardiovascular. Debido a las similitudes encontradas con el corazón humano, el cerdo ha sido utilizado incluso como donante en alguna de las escasas experiencias de xenotrasplante cardíaco<sup>169</sup>, y las válvulas cardíacas se utilizan actualmente como xenoinjertos en la práctica clínica<sup>170</sup>.

En los modelos animales grandes, mientras que la oclusión progresiva de una arteria coronaria puede producir disfunción del ventrículo izquierdo, el fenotipo de

infarto de miocardio se produce de forma más efectiva por la oclusión total de la arteria coronaria. La oclusión coronaria aguda disminuye la función del ventrículo izquierdo, lo que promueve la activación neurohormonal, satisfaciendo así varios criterios característicos del fenotipo del fallo cardíaco. Por ejemplo, la inducción de infarto de miocardio en los cerdos adultos ha permitido la colocación de marcadores radio-opacos para poder cuantificar una expansión reproducible y progresiva del infarto en un período de 2 meses. Estos resultados señalan al cerdo como un modelo adecuado para el estudio de terapias farmacológicas encaminadas a la atenuación de la expansión del infarto.

Una dificultad que se observa al utilizar el modelo porcino de MI es una predisposición de desarrollar arritmogénesis refractaria. Sin embargo, se han descrito métodos para evitar este problema, como la protección de las vías respiratorias y tratamiento ventilatorio, suplementos de electrolitos y administración de antiarrítmicos. Además, la inducción de infarto de miocardio se realiza cuando el animal presenta el torax cerrado con una línea circulatoria basal y función neurohormonal intacta<sup>171</sup>. Otra limitación es la carencia de bases de datos y catálogos completos para el cerdo a nivel genómico y proteómico. Sin embargo, esta dificultad aparece cada vez más superada con la secuenciación del genoma porcino<sup>172</sup> y el aumento del número de anticuerpos disponibles que reconocen moléculas porcinas.

### **2.2.1 Anatomía del corazón porcino comparada con la humana**

A pesar de las similitudes entre el corazón humano y porcino, existen algunas diferencias anatómicas que, sin embargo, pueden ser explicadas en su mayor parte por la diferente posición corporal de las dos especies (unguligrado/cuadrúpedo frente a ortógrado/bípedo) (Figura 14.A). Este factor ha ejercido un efecto determinante a nivel evolutivo haciendo que las dos especies hayan tenido que adaptarse de maneras diferentes a la gravedad. Junto con el hombre, solamente los restantes mamíferos bípedos, tales como los primates y los canguros, habrían adaptado su sistema cardiovascular a una postura ortógrada. Algunas de las diferencias pueden ser también explicadas por la forma lateralmente comprimida del tórax porcino cuando se compara con el humano. Como consecuencia de todo ello, el corazón porcino se encuentra suspendido por sus vasos mayores en la cavidad torácica, con su cara anterior descansando cerca del esternón y la mayoría de la superficie posterior adyacente al diafragma.

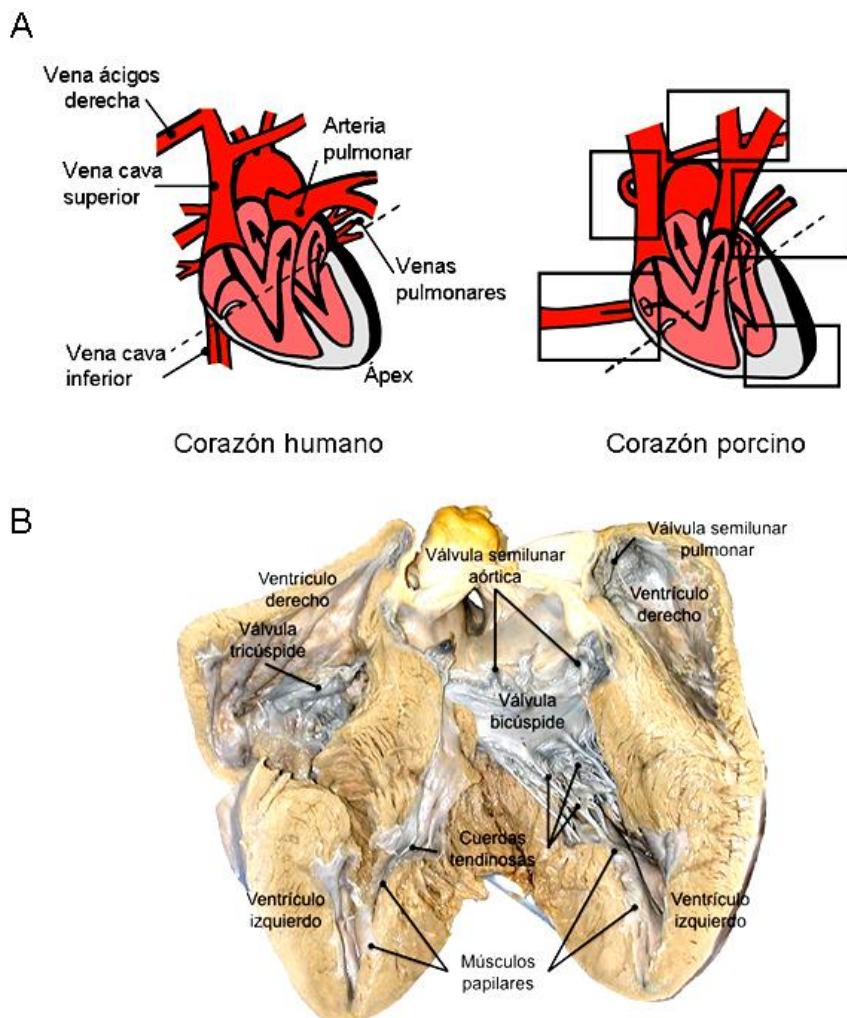
**Aurículas.** Las aurículas derecha e izquierda del corazón porcino son de tamaño similar, al contrario que en el hombre, en donde la aurícula derecha, y particularmente su orejuela, es apreciablemente mayor que la izquierda. La aurícula izquierda recibe dos venas pulmonares en el cerdo, mientras en humanos aparecen generalmente cuatro orificios de entrada para las venas pulmonares. En el cerdo, las venas cavas superior e inferior entran en la aurícula derecha formando un ángulo recto entre ellas. En el hombre se disponen formando un ángulo de 180 grados.

**Ventriculos.** La pared ventricular izquierda del cerdo adulto es mucho más gruesa que la de corazones humanos de la misma talla. Mientras que el ápex del corazón humano se sitúa entre ambos ventrículos, en el cerdo el ápex está compuesto totalmente por musculatura del ventrículo izquierdo (Figura 14.A, 14.B). Como consecuencia de la diferente postura, los vasos de entrada y salida aparecen directamente alineados en el cerdo, mientras que en el hombre aparecen dispuestos casi perpendicularmente<sup>173</sup>.

**Circulación coronaria.** Igual que en humanos, el corazón porcino presenta dos ramas arteriales que derivan en tres arterias coronarias principales. La primera rama, o arteria coronaria izquierda derivará en la arteria coronaria izquierda descendente anterior, que transcurre a lo largo del surco interventricular anterior, y la arteria circunfleja, que lo hace a través del surco auriculoventricular. La segunda rama, o arteria coronaria derecha, derivará en la arteria coronaria descendente posterior, que transcurre a lo largo del surco interventricular posterior, y la marginal derecha, que irriga el ventrículo derecho. La dominancia coronaria es generalmente diestra tanto en el cerdo<sup>173</sup> como en humanos, siendo la coronaria derecha la que surte a la descendente posterior. La evaluación cuantitativa de la anatomía y distribución de las arterias coronarias en el cerdo ha demostrado una presencia reducida de circulación colateral, que se restringe de forma dispersa a zonas del miocardio medio y el subendocardio<sup>174</sup>. Por su parte, el sistema venoso coronario porcino se caracteriza principalmente por carecer de una vena áigios derecha, que en humanos y otros mamíferos desemboca en la vena cava superior derecha. Por el contrario, una prominente vena áigios izquierda, vestigial en humanos<sup>175</sup>, drena el seno coronario.

**Tejido de Purkinje.** Si bien la anatomía gruesa y la fisiología del corazón porcino y el humano son ampliamente comparables, las mayores diferencias entre ambas especies se encuentran a nivel de las fibras de Purkinje. El tejido de Purkinje es una extensión cardíaca del sistema nervioso autónomo que en humanos se extiende por las paredes ventriculares internas, justo por debajo del endocardio. Su función es la de conducir el estímulo eléctrico y orquestar la contracción cardíaca. Su

distribución en el corazón porcino es diferente de aquella encontrada en primates y carnívoros y el origen de esta diferencia ha de buscarse en el origen evolutivo de estas especies. El cerdo ha evolucionado a partir de ancestros de gran talla, que poseían corazones enormes. La velocidad de propagación de la despolarización de las fibras miocárdicas (unos 0,4 m/s) es aproximadamente igual en los diferentes mamíferos. En mamíferos pequeños es suficiente con que el tejido de Purkinje se distribuya simplemente por debajo del endocardio para coordinar la contracción de todo el miocardio. Sin embargo, en animales grandes, la onda de despolarización tardaría tanto en llegar al otro lado de la pared ventricular, que la asincronía comprometería seriamente la eficiencia de la contracción cardiaca. Por ese motivo las fibras de Purkinje han de penetrar en la práctica totalidad del grosor del miocardio<sup>176</sup>.



**Figura 14. El corazón porcino. A)** Comparación anatómica entre un corazón humano y un corazón porcino. Las diferencias de mayor relevancia, expuesta en el texto, aparecen enmarcadas en el esquema del corazón porcino. **B)** Vista interna detallada de un corazón porcino. (<http://district.bluegrass.kctcs.edu>)

### **3. Consideraciones éticas referentes al uso de animales de experimentación**

Cada año, más de 75 millones de vertebrados se utilizan en todo el mundo con fines experimentales<sup>124</sup>, siendo ratones y ratas las especies preferidas. Diversos documentos a nivel nacional y europeo regulan la actividad de investigaciones que requieren animales (Real Decreto 1201/2005 y Directiva 2010/63/UE, respectivamente). De modo general se establece que aquellos experimentos que utilicen animales han de ser diseñados bajo el “Principio de las tres R”. 1) Sustitución (del inglés *replacement*) de los animales vivos por modelos *in vitro* o computerizados. 2) Reducción del número de animales utilizados para los experimentos. Para ello, es necesario un diseño que utilice animales estandarizados para reducir la variabilidad y realizar estimaciones previas de potencia estadística. 3) Refinamiento, significa proporcionar el máximo confort trasladando a los animalarios soluciones que, en la medida de lo posible, cubran las necesidades etológicas y fisiológicas de los animales, evitando además el sufrimiento innecesario mediante la utilización de anestésicos y cuidados adecuados<sup>177</sup>. El uso de animales de experimentación debe ser, en resumen, considerado cuando no exista otra alternativa viable. Es necesario tener en cuenta que el malestar y el estrés de los animales durante los experimentos, así como un diseño experimental no razonable, además de perjudicar gravemente de los derechos de los animales, conducirán inevitablemente a la obtención de efectos no específicos que desvirtuarán los resultados.



## **F. PROTEÓMICA E INVESTIGACIÓN CARDIOVASCULAR**

La investigación cardiovascular analiza los sistemas biológicos involucrados en la prevención, tratamiento y de desarrollo de la enfermedad. A menudo está orientada a conocer los principios fundamentales que rigen o subyacen en los caminos de la enfermedad a nivel molecular. Para lograr este objetivo, ha habido y hay una necesidad constante de desarrollo tecnológico. En este contexto, el desarrollo tecnológico se refiere a la mejora de técnicas, instrumentos y enfoques/estrategias que se utilizan para resolver los problemas planteados a lo largo de la investigación.

La proteómica es la disciplina encargada de abordar el estudio del proteoma, o conjunto de las proteínas expresadas en un momento dado en un organismo, órgano, tejido, célula o fracción subcelular<sup>178</sup>. Es un campo que ha sido impulsado por el desarrollo de aplicaciones y nuevas estrategias tecnológicas y sigue evolucionando rápidamente. Las tecnologías proteómicas se utilizan para estudiar la complejidad de las proteínas y sus funciones biológicas, incluidas las propiedades biofísicas, estructurales y funcionales. Las alteraciones de proteínas que se producen a causa de los procesos fisiológicos y patofisiológicos son un reflejo de los cambios en los niveles de genes, ARNm, miARN y metabolitos. Por lo tanto, el proteoma consta de información de la expresión de proteínas, sus modificaciones postraduccionales, su procesamiento y localización.

Para poder observar y cuantificar la diversidad de proteínas en el campo de la Proteómica se utilizan un amplio grupo de tecnologías y métodos derivados de la bioquímica de analítica proteínas, separación analítica, espectrometría de masas y bioinformática. Muchas tecnologías son sinérgicas y complementarias a la hora de aportar los datos que analizan cada proteoma. El desarrollo de la tecnología proteómica puede estar vinculada al plantamiento específico de preguntas biológicas y clínicas y a su vez aportar nuevos datos para dar lugar a nuevas hipótesis. Estas nuevas hipótesis conducen a menudo hacia un refinamiento metodológico, optimización, o incluso creación de nuevas tecnologías.

### **1. Tecnología en el campo de la Proteómica**

Desde finales de los años noventa el análisis proteómico ha sido cada vez más utilizado en la investigación cardiovascular. La electroforesis bidimensional en gel (2DE) es un método tradicional de separación de proteínas basado en la separación



de proteínas intactas por el punto isoeléctrico y por el peso molecular. Se desarrolló en la década de 1970<sup>179 180</sup>, y ha continuado creciendo desde entonces, aunque en los últimos años se han llevado a cabo menos estudios con esta técnica en comparación con el número total de estudios basados en proteómica. Esto es debido al uso cada vez más frecuente de otros métodos de separación de proteínas y péptidos que han sido desarrollados o refinados en la última década, además de las mejoras en la sensibilidad y precisión de los espectrómetros de masas y el uso de una bioinformática más integral. El método de geles 2DE es uno de los pocos métodos que permiten la determinación de potenciales modificaciones postraduccionales o de diferentes isoformas de proteínas, puesto que difieren en su punto isoeléctrico.

Otros métodos de separación de proteínas intactas implican el uso de fases líquidas, electroforesis capilar y cromatografía líquida. Tienen ventajas similares a 2DE y, curiosamente, a menudo determinan un conjunto diferente de proteínas<sup>181,182</sup>. Esto es atribuible a los parámetros de solubilización o separación. Al utilizar más de un método (fuera de línea o en línea con la espectrometría de masas) se puede aumentar la cobertura proteómica (número de proteínas observadas) y, a menudo la cobertura de proteína (número de péptidos observados para cada proteína). Hoy en día, muchos estudios observan y cuantifican de entre 1000 a 5000 proteínas, mientras que hace 5 años, esto no era factible incluso con métodos de separación extensos.

El tipo de datos que la proteómica puede ayudar a analizar se pueden dividir en:

I. Identificación de proteínas. Permite crear una base de datos para determinar la composición de proteína de un complejo de proteínas específicas, orgánulos, o de células.

II. Cuantificación de proteínas. Determinación de la contribución relativa o concentración absoluta de cada proteína en la mezcla.

III. Identificación de isoformas de proteínas.

IV. Determinación de modificaciones postraduccionales. Identificación de los residuos de aminoácidos que han sido modificados.

V. Cuantificación de cada residuo modificado.

## **2. Identificación y cuantificación de proteínas**

La identificación de proteínas está en el centro de la proteómica. Esto se puede lograr usando espectrometría de masas o mediante captura/detección específica de la proteína con anticuerpos. La detección con anticuerpos y la cuantificación de proteínas intactas ha ido mejorando con la producción a gran escala de anticuerpos frente a proteínas humanas proporcionados tanto por la industria como por el mundo académico. Es de destacar el atlas de proteínas humanas, que actualmente cuenta con más de 17.200 anticuerpos que reconocen los productos de genes a partir de 14.079 genes (<http://www.proteinatlas.org>). El uso de *arrays* de anticuerpos proporciona la capacidad para detectar un número cada vez mayor de proteínas, mientras que las matrices de antígeno opuesto, pueden permitir la detección de autoanticuerpos<sup>85,183,85,184</sup>.

La espectrometría de masas es el método de elección más común para la identificación y cuantificación de mezclas proteicas. Debido a las limitaciones para la resolver moléculas de masa elevada, la digestión enzimática/química de las proteínas para generar péptidos de menor masa es un paso común a todas las técnicas proteómicas. En esta metodología, la información de masa/carga obtenida de los péptidos es la que permite deducir las secuencias proteicas. Para ello, los datos obtenidos experimentalmente se cotejan frente a una base de datos de masa/carga teórica obtenidos a partir de digestiones *in silico*. El procesado de este tipo de datos precisa de motores de búsqueda que utilizan diferentes algoritmos de asignación. Entre los algoritmos que han alcanzado mayor popularidad entre la comunidad científica se incluyen Mascott, X! Tandem, Sequest y OSSMA. Cuando se utiliza espectrometría de masas para la identificación de proteínas, resulta crucial tener en cuenta unas normas rigurosas de análisis de datos y presentación de informes:

I. La exactitud de la masa obtenida de los datos experimentales afecta a la fiabilidad de las identificaciones, por lo tanto, el tipo de instrumentación a utilizar debe ser considerado teniendo en cuenta el tipo de muestra a analizar y la información que se desea obtener.

II. Hay muchos datos diferentes derivados de los algoritmos del motor de búsqueda, y cada algoritmo es probable que produzca algún resultado significativamente diferente a partir de los mismos datos.

III. Muchos de los motores de búsqueda intentan asignar la información de una secuencia de espectros aunque sea de mala calidad, lo que puede resultar en identificaciones incorrectas.

IV. Es crítico seleccionar una base de datos de proteína apropiada para la muestra. Las bases de datos pueden variar con respecto a su exactitud e integridad, así como contener nombres redundantes de una misma proteína, por lo que la misma secuencia de aminoácidos puede ser representado con números de acceso múltiples.

V. La claridad de datos puede verse comprometida si un espectro puede asignarse a múltiples secuencias de aminoácidos, debido a la ambigüedad, o bien a que la misma secuencia de un péptido se pueda asignar a múltiples proteínas, debido a la homología.

La cuantificación de proteínas es un aspecto muy importante de un análisis proteómico. Hay esencialmente 2 tipos de cuantificación que se utilizan actualmente en proteómica: cuantificación relativa y absoluta. Para la primera, a nivel de proteína, la técnica de 2DE es la más utilizada, mientras que la cuantificación en el nivel de péptido se consigue usando marcaje metabólico (SILAC, en células proliferantes) o químico (más a menudo marca los péptidos digeridos incluyen etiqueta isobárica para la cuantificación relativa y absoluta [también llamado iTRAQ])<sup>185</sup>. Además, a nivel de péptido, se incluye el etiquetado de masas en tándem (también llamado TMT40) o sin etiqueta (basado en el conteo de espectros)<sup>186</sup>. La comparación se hace entre 2 o más muestras, permitiendo la determinación de la relación cuantitativa relativa entre ellas.

Por otra parte, la cuantificación absoluta significa que el valor exacto de cada péptido o proteína en una muestra se determina independiente de otras muestras. Anteriormente, para obtener la cuantificación absoluta de una proteína se dependía únicamente de la técnica de ELISA o Western blot, los cuales requieren de alta calidad anticuerpos. Sin embargo, muchas veces no se dispone de anticuerpos de calidad. Además hay que tener en cuenta que, en el caso de los estudios proteómicos, las proteínas candidatas surgen tras el análisis y muchas veces se necesita cuantificar isoformas específicas de proteínas específicas (o aminoácidos modificados).

Con la reciente utilización de nuevas técnicas de monitorización de reacción múltiple (MRM), es posible obtener una cuantificación absoluta o relativa de proteínas objetivo sin necesidad de anticuerpos. Este método de espectrometría de masas es una tecnología establecida hace mucho tiempo a la hora de identificar metabolitos,

pero en los últimos años se ha optimizado para la medición de las moléculas más grandes, incluyendo péptidos<sup>187,188,189</sup>. La MRM mejora: (1) los estudios de proteínas a través de diferentes especies, (2) el análisis cuando el tamaño de muestra es limitado, (3) el estudio de las proteínas que no tienen anticuerpos (o de baja calidad), (4) la cuantificación simultánea de múltiples proteínas, (5) cuantificación de isoformas de proteínas, y (6) la cuantificación de los sitios específicos modificaciones postraduccionales dentro de una o más proteínas<sup>190</sup>.

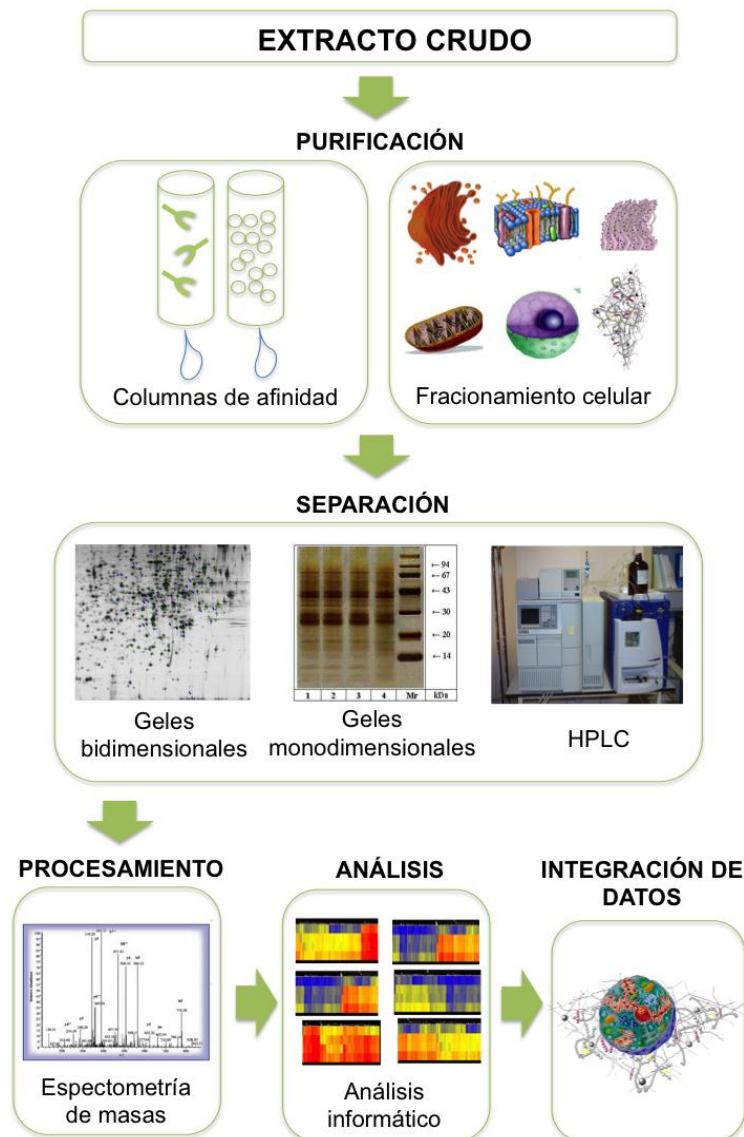
### **3. Fraccionamiento en proteómica**

Las células son excepcionalmente complejas y pueden contener más de 100.000 especies de proteínas con diferentes propiedades químicas y físicas. Debido a la potencia limitada de resolución de las técnicas de separación analíticas aplicadas actualmente en los perfiles de proteínas es preciso un fraccionamiento previo para reducir el rango dinámico de las proteínas que conforman las muestras a analizar<sup>191</sup>. El rango dinámico de un instrumento es aquel sobre el cual la señal del ión analizado correlaciona linealmente con la concentración de analito. Se han estimado rangos dinámicos de trabajo en un máximo de  $10^3$ - $10^4$ <sup>192</sup>.

Cualquier estrategia de reducción de la complejidad aumenta en gran medida el número de las proteínas menos abundantes que pueden ser analizados posteriormente. La simplificación de las mezclas de proteínas consiste bien en eliminar las proteínas más abundantes para poder así analizar las menos representadas, o bien en redirigir el estudio hacia subproteomas específicos<sup>193,194</sup>. El primero, se realiza utilizando técnicas de afinidad basadas en anticuerpos (columnas de afinidad o inmunoprecipitación) que detectan las proteínas que se desean eliminar, asumiendo la pérdida de proteínas por co-inmunoprecipitación. Por otra parte, el fraccionamiento subcelular, es de especial importancia para el análisis de los orgánulos intracelulares y complejos multiproteicos. Así, la proteómica funcional emplea los métodos iniciales de fraccionamiento acoplados con poderosas metodologías de separación son empleados en proteómica funcional para alcanzar una mejor comprensión de los mecanismos internos de una célula. El fraccionamiento inicial puede ser eficientemente combinado con geles 2D de alta resolución o análisis de espectrometría de masa, así como con técnicas en gel independientes. Revisiones recientes<sup>195,196</sup> describen en detalle las técnicas de fraccionamiento utilizadas para la

purificación de orgánulos, así como para la caracterización de sus proteomas (Figura 15).

Este procedimiento ha resultado de enorme utilidad en estudios dirigidos a procesos que pueden ser abordados de forma razonable mediante la caracterización de compartimentos concretos tales como la mitocondria<sup>197</sup>, el núcleo<sup>198</sup>, los lisosomas<sup>199</sup>, la membrana plasmática<sup>200</sup> o la matriz extracelular<sup>165</sup>. El rango dinámico de estos subproteomas es amplio, pero asumible desde el punto de vista técnico<sup>194</sup>. Además, se elimina la contaminación procedente de proteínas muy abundantes que no aportan información al objeto de estudio específico (proteínas del citoesqueleto, citocromo, proteínas contráctiles, etc.) y se simplifica enormemente la muestra a nivel de variedad de analitos.



**Figura 15. Simplificación y análisis de las muestras en proteómica.** El análisis individual de los componentes de las células o tejidos para su posterior integración, contribuye a la comprensión del funcionamiento de todos los componentes en conjunto

#### **4. Proteómica mitocondrial**

Con el uso de datos genómicos, se estima que el proteoma mitocondrial contiene aproximadamente 1500 proteínas distintas, algunas de las cuales pueden ser isoformas que resultan de diversas modificaciones postraduccionales<sup>201 202</sup>. Empleando un conjunto enfoques que incluían la espectrometría de masas, microscopia, y un algoritmo de aprendizaje, se ha establecido un compendio que consta de 1098 genes y sus proteínas asociadas<sup>203</sup>. El compendio, titulado MitoCarta, es la caracterización proteómica mitocondrial más completa hasta hoy en día.

Hasta la fecha, muchos de los procesos patológicos en los que las mitocondrias han sido involucradas fueron estudiados utilizando métodos bioquímicos clásicos<sup>204</sup>. Sin embargo, estos estudios se centran generalmente en una sola proteína particular, pero no en el conjunto proteoma mitocondrial. Los recientes adelantos técnicos en proteómica han permitido realizar estudios más en profundidad de las proteínas. El proteoma se utiliza a menudo para investigar la patogénesis, patrones celulares, y las correlaciones funcionales a nivel de proteínas de una forma no sesgada. Este enfoque proteómico también permite la posibilidad para el desarrollo de nuevos biomarcadores candidatos para el diagnóstico, la estadificación y el seguimiento de la enfermedad. La proteómica comparativa es una parte de la misma cuyo propósito principal gira en torno a los siguientes campos: la investigación de la patogénesis o el mecanismo de un medicamento, el descubrimiento de nuevas dianas para el diagnóstico y tratamiento. Por lo tanto, la expresión diferencial de muchas proteínas se ha determinado a partir del estudio de muestras en distintas condiciones. Debido a las importantes funciones y las funciones de la célula, las mitocondrias se han convertido en un "punto caliente" de investigación en proteómica subcelular. Con la mejora de las técnicas proteómicas, una investigación comparativa mitocondrial exhaustiva factible es cada vez más posible. Así, se han generado los perfiles proteómicos mitocondriales se han generado a partir de múltiples órganos, incluyendo el cerebro, el corazón, el hígado y el riñón<sup>205,206,207</sup>.

Los procesos que tienen lugar en la mitocondria contribuyen al desarrollo de los diferentes estados de la enfermedad. Es por ello que el número de herramientas proteómicas que permiten identificar proteínas y sus modificaciones postraduccionales es cada vez mayor,

#### **4.1. Proteómica mitocondrial y enfermedades cardiovasculares**

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo occidental, y por lo tanto, el diagnóstico precoz y su tratamiento es imprescindible. Las mitocondrias constituyen aproximadamente el 35% y el 40% del volumen de los cardiomiocitos<sup>208</sup>. Por ello no es sorprendente que el proteoma mitocondrial cardíaco sea muy dinámico durante estímulos patológicos. El estrés oxidativo juega un papel clave en las enfermedades cardíacas, las mitocondrias son el lugar principal de la oxidación de sustratos en los cardiomiocitos considerándose tanto fuente como objetivo de ERO<sup>209</sup>. Se han realizado varios estudios a gran escala del proteoma mitocondrial cardiovascular aportando importante información biológica del papel de la mitocondria en el sistema cardiovascular<sup>89</sup>.

Diferentes modelos animales de infarto de miocardio se han empleado para determinar los mecanismos de progresión de la enfermedad. Entre los modelos animales más empleados de infarto de miocardio está el modelo de presión-sobrecarga, que incluye la hipertensión inducida por la hipertrofia que conduce a la insuficiencia. En un modelo en ratas se observó que tras la constricción aórtica transversal disminuían los niveles de las enzimas de oxidación de ácidos grasos, mientras que las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos estaban sobreexpresadas. Al mismo tiempo, las proteínas de los complejos I, III, IV, y V se encontraban infraexpresadas mientras que 10 proteínas de los complejos I, II y V estaban sobreexpresadas. Los autores sugieren que la disminución general de las proteínas de las enzimas de oxidación de ácidos grasos en la mitocondria puede contribuir a una reducción de las tasas de los ácidos grasos oxidados durante la enfermedad. Por otra parte, la regulación diferencial de las proteínas CTM sólo puede explicar parcialmente enfermedades respiratorias observadas en la insuficiencia cardíaca<sup>210</sup>.

Para conocer las alteraciones mitocondriales asociadas con el infarto de miocardio en humanos, también se estudiaron las biopsias extraídas antes y después de la revascularización coronaria en pacientes sometidos a cirugía<sup>211</sup>. Se clasificaron estos pacientes en función del movimiento de la pared miocárdica como infarto reversible o irreversible de miocardio. La electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE), seguido de la identificación de proteínas tras cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) reveló respuestas diferentes entre ambos fenotipos cardíacos. Entre las proteínas identificadas como las reguladas durante fallo cardíaco en fase terminal se encontraban 6 enzimas mitocondriales



implicadas en el metabolismo del sustrato y la generación de energía. Además, las proteínas VDAC1 (del inglés *voltage-dependent anion-selective protein 1*) y MnSOD (superóxido dismutasa 2) también disminuyeron, lo que sugiere que el potencial de reducción de superóxido puede estar asociada con el infarto de miocardio en fase terminal. De manera similar, se observó en esta fase terminal la reducción de la expresión de proteínas de la CTE subunidades de complejos (proteínas de complejo I), los componentes de la piruvato deshidrogenasa, y enzimas involucradas en el ciclo de los ácido tricarbóxicos. Sin embargo, cuando la disfunción del miocárdio era reversible los niveles de enzimas mitocondrial se conservaron, lo que sugiere un posible papel de las proteínas mitocondriales con la recuperación de la función después de la revascularización.

En la mayor parte de los resultados de comparativa mitocondrial en CI empleando estudios proteómicos, se observó una expresión diferencial de proteínas de la cadena respiratoria y de metabolismo energético. Por ejemplo, Kim et al detectaron, usando geles 2D, algunos potenciales biomarcadores mitocondriales en corazones de conejo sometidos a I/R<sup>207</sup>. Además, Essop y sus colaboradores encontraron que la cadena D de la ATP sintasa, la proteína ubiquinol citocromo C reductasa y la subunidad alfa flavoproteína de transferencia de electrones estaban alteradas en ratones con fenotipo obeso. Al mismo tiempo, se observó en los corazones con dicho fenotipo la disminución de la expresión de proteínas contráctiles<sup>212</sup>. Otro estudio proteómico llevado a cabo por Hunzinger se empleó con el objetivo de investigar el papel de las ERO en el corazón bovino y identificando dos modificaciones específicas de la N-formylkynurenina de la aconitasa-2, enzima que juega un papel importante en el envejecimiento mitocondrial<sup>213</sup>.

En resumen, la mayoría de los estudios de proteómica mitocondriales en las enfermedades cardiovasculares se asocian con la respuesta del tejido ante las ERO. Es bien sabido que la isquemia y la edad son las causas principales de las enfermedades cardiovasculares, que pueden resultar en la liberación de ERO. Por lo tanto, las ERO siguen siendo un objetivo principal para los investigadores que estudian este tipo de enfermedades.

Así, en el momento actual, existen varios retos importantes en el estudio del proteoma mitocondrial. En primer lugar, las moléculas de señalización, que están probablemente implicadas en la muerte celular y la protección, están presentes a niveles bajos y son difíciles de identificar empleando enfoques proteómicos amplios. Segundo, las modificaciones postraduccionales son importantes para la función de



una proteína, pero también pueden ser difíciles de detectar debido a que son lábiles y a limitaciones metodológicas. Tercero, muchas rutas de protección cardiaca y de muerte celular sugieren que las proteínas citosólicas sufren translocación a la mitocondria para producir la muerte celular o protección. La determinación de si estas proteínas están realmente asociadas con el proteoma mitocondrial o son sólo un contaminante es un área de controversia.



## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La cardiopatía isquémica (CI) es considerada una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Lejos de reducirse, la cifra de casos no hace más que aumentar debido a la longevidad creciente de la población y al cambio en sus modos de vida. Así, es necesario el conocimiento de los procesos biológicos asociados a esta patología para poder ofrecer soluciones efectivas a nivel diagnóstico y de tratamiento.

Uno de los puntos clave para el inicio y desarrollo de la CI reside en los eventos que tienen lugar en la mitocondria. En los últimos años se ha incrementado el número de evidencias que asocian esta enfermedad con numerosos procesos mitocondriales relacionados con la producción de energía, metabolismo, homeostasis del calcio y estrés oxidativo. Pese a los esfuerzos por conocer los procesos mitocondriales que subsiguen a un evento de isquemia miocárdica, la mitocondria sigue siendo todavía un objetivo a explorar para el descubrimiento de nuevas terapias. Teniendo esto en cuenta, resulta fundamental profundizar a diferentes niveles en los acontecimientos implicados en el desarrollo de la CI que ocurren en este compartimento celular.

A nivel genético, se ha demostrado algunos de los polimorfismos del ADNmt que constituyen los haplogrupos mitocondriales afectan a la eficiencia energética. Esto se traduce en diferencias de morbilidad y longevidad entre individuos que portan polimorfismos distintos. En el campo cardiovascular, se ha asociado el hecho de portar determinados haplogrupos con el riesgo de sufrir episodios isquémicos. Sin embargo, las diferencias genéticas existentes entre poblaciones hacen necesario el análisis de dichos polimorfismos en distintas áreas geográficas para poder alcanzar resultados más concluyentes.

A nivel fenotípico, el estudio temporal del proteoma de tejido cardíaco contribuye de forma definitiva a la comprensión de los procesos responsables de la transición del corazón sano hacia el estado patológico. Es por ello que la proteómica es una herramienta muy útil para determinar aquellas proteínas diferencialmente expresadas, señalando las rutas que podrían estar afectadas en las distintas cardiopatías. Esto permite refinar tanto las terapias como su momento de aplicación. Desafortunadamente, debido a la complejidad proteica inherente a las muestras de tejido cardíaco y a las limitaciones técnicas existentes hasta la fecha, es necesario el fraccionamiento celular de la muestra para la obtención de resultados más precisos. Teniendo en cuenta la importancia de la mitocondria en el desarrollo de la CI, su

aislamiento y el análisis de su proteoma podrían señalar procesos clave que están afectados en situaciones patológicas.

Aun salvando las limitaciones en cuanto a la técnica, las muestras de tejidos humanos resultan escasas y heterogéneas, lo que hace recomendable recurrir al uso de animales de experimentación adecuados para así poder elaborar conclusiones más robustas. En este sentido, el cerdo, un mamífero de tamaño y fisiología semejantes a los humanos, ha sido verificado como un modelo valioso para establecer conclusiones aplicables a las situaciones clínicas más comunes para esta patología.

Por todo ello, para este trabajo se han propuesto los siguientes **objetivos** :

1. Investigar la posible asociación de los haplogrupos mitocondriales y los polimorfismos que los determinan con el riesgo de desarrollar CI en una población española utilizando una colección de muestras de individuos sanos y pacientes.
2. Establecer un modelo experimental porcino *in vivo* de isquemia y reperfusión adecuado para el estudio de procesos mitocondriales asociados a la isquemia.
3. Determinar, utilizando una combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem, un perfil temporal de los cambios en el proteoma mitocondrial cardíaco tras isquemia y reperfusión.
4. Realizar la validación de algunas de las proteínas encontradas diferencialmente expresadas en los análisis del proteoma:
  - 4.1. Mediante PCR a tiempo real, análisis de western blot e inmunohistoquímica.
  - 4.2. Comprobando su expresión en muestras clínicas procedentes de pacientes con CI.
  - 4.3. Analizando su expresión mediante inmunofluorescencia en un modelo de I/R de cardiomiocitos en cultivo.

## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**





### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### ASOCIACIÓN DE HAPLOGRUPOS CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

##### A. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para la realización de este estudio se siguieron las directrices STREGA (del inglés *STrengthening the REporting of Genetic Association Studies*)<sup>214</sup>. Estas recomendaciones tratan de aumentar la transparencia de los informes genéticos, independientemente de las elecciones realizadas durante el diseño, la realización, o análisis. Esto es crucial para dar sentido a la cantidad de información relativa a asociaciones genéticas y de este modo lograr verdaderos avances en genómica humana y la eventual integración de esta información en el ejercicio de la medicina y la salud pública.

Se analizaron muestras de ADN de 781 individuos españoles no emparentados (358 pacientes con CI y 423 controles sanos) . El grupo de CI incluyó 225 muestras de pacientes del servicio de Cardiología del CHU A Coruña y 133 muestras cedidas por el Banco Nacional de ADN (Universidad de Salamanca, España). El grupo control consistió en un grupo de individuos procedente del Banco de Sangre del CHU A Coruña, con una de media de edad y frecuencia en cuanto al género similar al grupo patológico.

La CI se definió de acuerdo a los estándares clínicos propuestos por el *American College of Cardiology* y la *American Heart Association*<sup>215</sup>. Además, se recogió información sobre otros factores de riesgo asociados con esta patología. La hipercolesterolemia se consideró factor de riesgo si los niveles de colesterol total eran mayores de 220 mg / dl. La hipertensión fue definida por valores de presión arterial sistólica superiores a 140 mm Hg y presión arterial diastólica superior a 90 mm Hg, o bien por el uso de medicación antihipertensiva. Los individuos que padecían diabetes mellitus se determinaron bien porque lo indicaron cuando se les preguntó por el uso de fármacos antidiabéticos, o bien porque en el análisis clínico presentaban una glucemia plasmática superior a 11 Mmol / l. Los individuos indicados como fumadores son aquellos que fumaban en el momento que se les realizó la analítica.

## B. DETERMINACIÓN DE HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES

### 1. Extracción y cuantificación del ADN genómico

Se extrajo el ADN de 648 muestras sanguíneas (coágulos) procedentes de pacientes en lista de trasplante cardiaco diagnosticados con CI y del banco de sangre de Banco de Sangre del C.H.U A Coruña. Para la obtención de los coágulos, los tubos de sangre completa se centrifugaban a 3000 rpm (960 g) durante 5 minutos. Para la obtención del ADN se empleó un kit comercial de extracción (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen Alemania) con algunas modificaciones en su protocolo para mejorar la calidad y cantidad de ADN extraído. El lisado se incubó durante 4 horas con proteinasa K a 56°C para que los contaminantes proteicos pudieran ser eliminados más fácilmente con los sucesivos lavados obteniéndose así un ADN de mejor calidad (ratio de absorbancia 260/280 entre 1,80-2,00). Para comprobar su concentración y los diferentes ratios de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop® 1000.

### 2. PCR Multiplex

Se realizó una PCR multiplex utilizando 12 cebadores específicos para amplificar los fragmentos de ADNmt que contienen los SNPs necesarios para caracterizar los 6 principales grupos europeos (Tabla 3). Los sitios polimórficos analizados en este estudio (7025, 14766, 10394, 4577, 12308 y 4216) habían sido registrados anteriormente (Tabla 4).

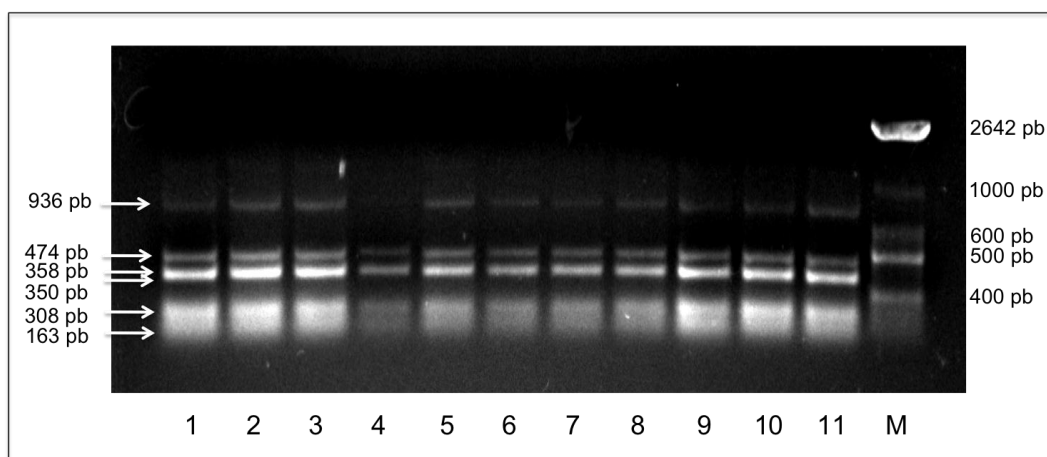
**Tabla 3.** Secuencias de cebadores utilizadas para la PCR Multiplex<sup>42</sup>.

Sitio polimórfico	Cebador PCR	Posición	SNP
7025	5'-CTGACTGGCATTGTATTAGCA-3'	6960F	C7028T
	5'-GTATACGGGTTCTTCGAATG-3'	7433R	
14766	5'-GAGAAGGCTTAGAAGAAAACCCAC-3'	14601F	T14766C
	5'-GTGGGCGATTGATGAAAAGGC-3'	14950R	
10394	5'-GGCCTATGAGTGAACACAAA-3'	10364F	A10398G
	5'-TATTCCTAGAAGTGAGATGGT-3'	10526R	
4577	5'-CCTACCACTCACCCCTAGCATTAC-3'	4185F	G4580A
	5'-TAGGAATGCGGTAGTAGTTAG-3'	5120R	
12308	5'-CAACCCCGACATCATTACCGGGT-3'	12106F	A12308G
	5'-GGGTTAACGAGGGTGGTAAGG-3'	12413R	
4216	5'-CCTACCACTCACCCCTAGCATTAC-3'	4185F	T4216C
	5'-GCGAGCTTAGCGCTGTGATGAG-3'	4542R	

**Tabla 4. Sitios polimórficos del ADNmt usados para asignar los 6 haplogrupos europeos más frecuentes**<sup>216</sup>

Haplogrupo	Sitios polimórficos					
	7028	14766	10398	4580	12308	4216
H	C	C	A	G	A	T
V	T	C	A	A	A	T
K	T	T	G	G	G	T
U	T	T	A	G	G	T
T	T	T	A	G	A	C
J	T	T	G	G	A	C

La mezcla de la PCR multiplex contenía una concentración final de 1X tampón de reacción (Bioline, Reino Unido), 0.2 mM de cada deoxinucleotido (dNTP) (Bioline, Reino Unido), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.025 U/μl de BioTaq ADN-polimerasa (Bioline, Reino Unido) y 0.3μM de cada cebador en un volumen final de 25μl. El ADN genómico (100ng) añadido a la mezcla se amplifica de la siguiente forma: 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 60 segundos y una extensión final de 72°C durante 10 minutos. A continuación, para comprobar que la reacción tuvo lugar y se amplificaron los fragmentos esperados, se realizó una electroforesis con el producto de PCR obtenido cuyo resultado se visualizó con luz UV tras el tratamiento con Syber®DNA Gel Stain (Invitrogen, Reino Unido) (Figura 16).



**Figura 16. Ejemplo representativo de 11 productos de PCR Multiplex en gel de agarosa al 1,5%. Se observan los 6 fragmentos de ADNmt que contienen los sitios polimórficos necesarios para caracterizar los 6 principales haplogrupos europeos. M. Marcador.**

### 3. Purificación del producto de PCR con ExoSAP-IT

Los productos de la PCR fueron tratados con ExoSap-IT (Amersham, Reino Unido) con el objetivo de eliminar los cebadores y los dNTPs no incorporados. Se siguieron recomendaciones de la casa comercial: añadiendo 0.6  $\mu$ l de ExoSap-IT a 1.5  $\mu$ l de producto de PCR (o un ratio proporcional) con una posterior activación de la enzima a 37°C durante 15 minutos e inactivación de la misma incubándola a 80°C durante 15 minutos. A continuación, las muestras se conservaron a 4 °C.

### 4. Ensayo de SBE (*Single Base Extension*)

El ensayo de SBE consiste en el alineamiento de un cebador con la secuencia de ADNmt que contiene el SNP que se quiere interrogar, siendo el extremo 3' de este primer una base más corto que el sitio del SNP. Como se emplean solo dideoxinucleótidos (ddNTPs) en la reacción, cuando la base complementaria es incorporada por la Taq polimerasa, la elongación se detiene y, dependiendo de la fluorescencia emitida, el sitio del SNP es identificado. No obstante, si el resultado indica que alguna de las muestras que no pertenece a los haplogrupos europeos más comunes, éstas son analizadas posteriormente por PCR-RFLP.

La reacción se llevó a cabo con 6 cebadores específicos SBE (Tabla 5) para interrogar cada sitio de SNP. Los cebadores empleados reúnen las siguientes características: (i) la longitud mínima de cada cebador es de 20 nt, (ii) cada cebador tiene una  $T_m$  de aproximadamente 60 °C y (iii) la diferencia de la longitud entre los cebadores es de 6 nt, evitándose así el solapamiento.

Las reacciones de la Multiplex SBE se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de Applied Biosystems con algunas modificaciones. Así, en el volumen final de reacción de 10 $\mu$ l, se añadieron 1.5  $\mu$ l de SNaPshot® kit Multiplex, 2.5  $\mu$ l del producto purificado de PCR y una concentración final de 0.2 $\mu$ M de la mezcla de cebadores para SBE. Para alcanzar el volumen final de 10  $\mu$ l se añadió H<sub>2</sub>O. Las temperaturas de los ciclos para el ensayo SBE fueron: 96°C durante 60 segundos y 25 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 60°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos.

**Tabla 5. Secuencia de cebadores empleados para el ensayo de SBE<sup>217</sup>.**

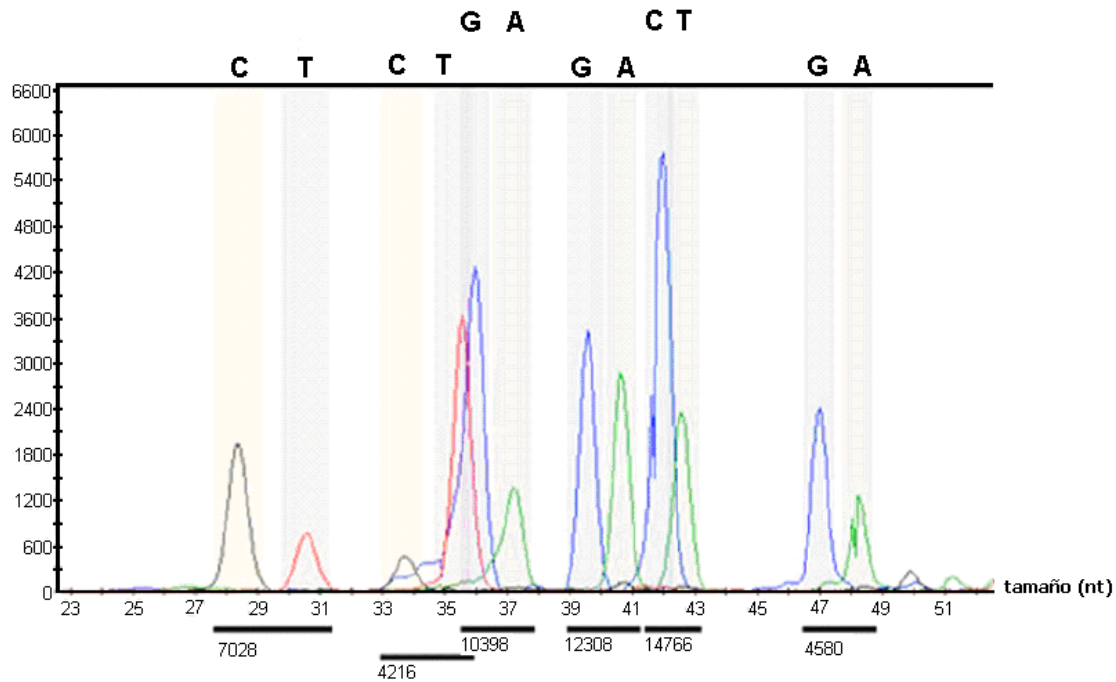
SNP	Cebador SBE	Posición
C7028T	5'-ACACGACACGTAACACTACGTTGTAGC-3'	7004F
T14766C	5'-cgatcATGAGTGGTTAATTAATTTTATTAGGGGGTTA-3'	14798R
A10398G	5'-ataTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGA-3'	10368F
G4580A	5'-(at) <sub>7</sub> TTTTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACAT-3'	4548F
A12308G	5'-(tacg) <sub>5</sub> aCCATTGGTCTTAGGCCCAA-3'	12288F
T4216C	5'-cgCCTCACCCTAGCATTACTTATATGA-3'	4189F

## 5. Purificación de los productos de la reacción SBE

Para eliminar los ddNTPs no incorporados, los productos de la reacción de SBE fueron tratados con Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Amserham, Reino Unido) añadiéndose a la mezcla 1 µl de enzima, 2 µl de tampón de reacción SAP y 7 µl de H<sub>2</sub>Odd. Posteriormente se realiza una activación de la enzima a 37°C durante 1 hora, seguida de una inactivación de la misma incubándola a 75°C durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras se conservaron en frío para su posterior secuenciación.

## 6. Reacción de secuenciación

Antes de introducir las muestras en el analizador genético ABI 3100 fue necesario desnaturalizarlas a 95°C para ello se mezcló 9µl de Hi-DiTM Formamida (Applied Biosystems, Reino Unido), 0,5µl de un estándar interno (120 Liz Size Standard de Applied Biosystems, Reino Unido) y 0,5 µl de los productos de SBE purificados. La configuración del sistema está basada en un capilar de 36 cm de longitud relleno de un polímero (Performance Polymer 4 (POP4)) que contiene urea (Applied Biosystems, Reino Unido). El módulo de ejecución del SBE consiste en 22 segundos de tiempo de inyección y 16 minutos de tiempo de ejecución a 15 KVolts. Una vez terminada la carrera los datos obtenidos se analizaron en el software GeneMapper v3.5 el cual permite diferenciar distintos alelos (SNPs) en cada locus (Figura 17).



**Figura 17. Secuencia de referencia en la que se representan las variantes alélicas para cada sitio polimórfico**

## 7. PCR-RFLP

Las muestras pertenecientes a los haplogrupos X, W e I no fueron asignadas con la técnica de SBE ya que el ADNmt perteneciente a estos haplogrupos posee diferentes SNPs que los analizados en nuestro ensayo de SBE para los haplogrupos europeos más comunes. Por ello, los haplogrupos menos frecuentes X, W e I fueron identificados mediante la técnica PCR-RFLP. Cuando los nucleótidos incorporados en los 6 sitios polimórficos interrogados no seguían el patrón de los 6 haplogrupos europeos más comunes, se observaba qué nucleótido era incorporado en la posición 10398 y, en función de ello, se realizaba el ensayo de restricción correspondiente. Si el nucleótido incorporado era una adenina, se interrogaba el fragmento de ADN donde estuviera situado el sitio polimórfico 14465 y si era una guanina el fragmento interrogado era el que contenía el SNP 10032.

Así, para llegar a determinar los haplogrupos X o W era necesario saber el nucleótido presente en la posición 14465 y para determinar el I, el nucleótido en la posición 10032. Por ello, se amplificaba por PCR el fragmento de ADN que contenía dichos sitios polimórficos. Como la identificación del haplogrupo, en este caso, dependía del patrón de restricción observado tras la digestión con la endonucleasa de restricción correspondiente, se realizó una electroforesis con el producto de PCR

digerido y se visualizó con luz UV tras el tratamiento con Syber®DNA Gel Stain (Invitrogen, Reino Unido).

La secuencia de cebadores empleados para amplificar los fragmentos que contienen los sitios polimórficos se recogen en la Tabla 6. Las enzimas de restricción empleadas fueron: Nla III, Accl, HaeIII y AluI. Éstas cortan en función de la ganancia (+) o pérdida (-) del sitio de restricción con respecto a la secuencia original de Anderson.

**Tabla 6. Secuencia de cebadores empleados para la técnica de PCR-RFLP.**

Sitio polimórfico	Cebador PCR	Posición	SNP
4577	5'-CCTACCACTCACCTAGCATTAC-3'	4185F	G4580A
	5'-TAGGAATGCGGTAGTAGTTAG-3'	5120R	
10032	5'-CTTTGGCTTCGAAGCCGCCGCC-3'	9902F	A10029G
	5'-TATTCCTAGAAGTGAGATGGT-3'	10526R	
14465	5'-ATGCCTCAGGATACTCCTCAATAGCCATC-3'	14430F	T14470C
	5'-CCGTGCGAGAATAATGATGTATGC-3'	14686R	
8994	5'-TAGCCCACTTCTTACCACAAGGC-3'	8900F	G8994A
	5'-GTGTGAAAACGTAGGCTG-3'	9172R	

### C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

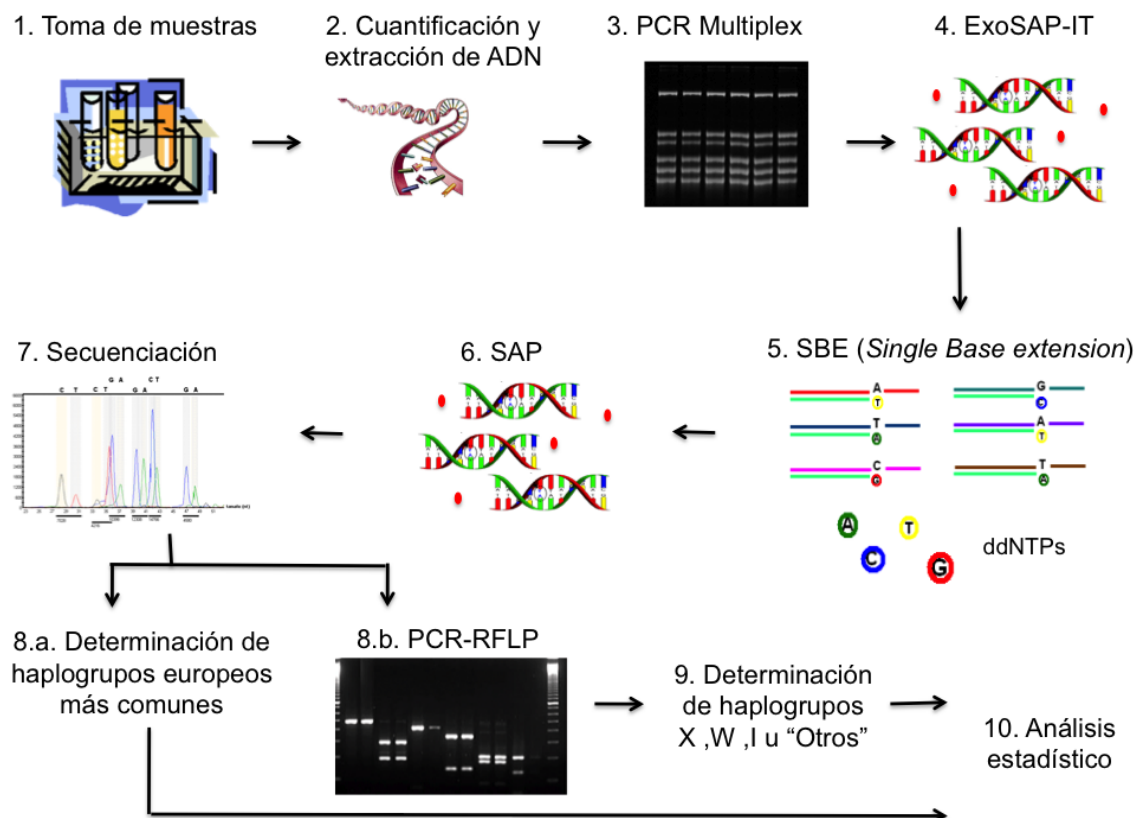
Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS 17.0 (IBM, EE.UU). La frecuencia de los haplogrupos y de los alelos en pacientes y controles se compararon realizando tablas de contingencia mediante la prueba de Chi-cuadrado. El odds-ratio (OR) y los intervalos de confianza (IC) al 95% se calcularon para cada haplogrupo. Para ello, cada haplogrupo se comparó con todos los otros haplogrupos agrupados en un solo grupo. Los haplogrupos menos frecuentes I, W y X, que estaban representados por menos del 10 controles / pacientes, se reagruparon en base un criterio evolutivo de "antepasado común". El haplogrupo HV se reagrupó en "otros".

El ajuste binario de regresión logística se utilizó para evaluar la influencia de la hipercolesterolemia, la hipertensión, diabetes mellitus y el hábito de fumar. Las diferencias se consideraron significativas cuando el p-valor era menor de 0,05 (prueba de 2 colas). Con el objetivo de no aumentar la probabilidad global de hallar resultados sólo por el mero hecho de efectuar muchos análisis en diferentes variables obtenidas

en nuestra muestra se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Por lo tanto, los valores del p-valor fueron multiplicados por el número de resultados ( $k = 8$  para la comparación en haplogrupos y  $k = 4$  para los clústeres de haplogrupos) a prueba.

La prevalencia haplogrupos varía extremadamente, con frecuencias de entre 40% a 5%, en la población general. Asumiendo una prevalencia del 40% en un determinado haplogrupo en el grupo control, el tamaño muestral de este estudio proporciona el 80% de potencia estadística para detectar OR iguales o mayores a 1,50, en un test de 2 colas y con un nivel de significación menor o igual que 0,05. Para el mismo porcentaje de potencia estadística, un haplogrupo con frecuencia en torno al 20%, permite detectar OR significativos iguales o mayores a 1,64 y para haplogrupos más raros (prevalencia alrededor del 5%) sólo OR iguales o mayores a 2,27 serán detectados como estadísticamente significativos.

En la Figura 18 se muestra y resume de forma esquemática los pasos seguidos para la determinación de los haplogrupos mitocondriales europeos en este estudio.



**Figura 18. Esquema de trabajo para la determinación de haplogrupos mitocondriales.** Se recogieron muestras de sangre de individuos sanos y pacientes con CI (1) para la extracción y cuantificación del ADN (2). A continuación, se amplificaron los 6 fragmentos que contenían los SNPs que permitían identificar los 6 haplogrupos más frecuentes (3) y se purificó el producto



con ExoSAP-it (4). Una vez digeridos los cebadores no incorporados en la reacción de PCR y eliminado el fosfato del extremo 5' de los dNTP, se realizó el ensayo de SBE mediante el cual cada SNP quedaba marcado con un ddNTP fluorescente (5). Posteriormente, se purificó el producto con SAP (6) y se detectó la fluorescencia emitida por cada nucleótido incorporado realizando la secuenciación de las muestras (7). Con este método se determinaron los haplogrupos europeos más comunes (8.a). Los haplogrupos no determinados en la reacción de secuenciación se identificaban empleando el ensayo de PCR-RFLP (8.b). Una vez determinados los haplogrupos menos frecuentes X,W,I u "Otros" (9) se hizo el análisis estadístico de los datos recogidos (10).

## **ANÁLISIS DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL CARDÍACO EN CORAZONES SOMETIDOS A ISQUEMIA/REPERFUSIÓN**

### **A. MODELO EXPERIMENTAL PORCINO DE I/R *IN VIVO***

#### **1. Población de estudio**

Para el desarrollo del modelo animal se utilizaron cerdos (*Sus scrofa*) de la variedad *Large White* procedentes Coren SL (Ourense, España). Tras su traslado a la Unidad de Cirugía Experimental del CHU A Coruña (15002AE), los animales tuvieron un periodo de cuarentena y adaptación antes del inicio de los experimentos. Todos los animales fueron identificados y alojados en zonas apropiadas para su estancia en el animalario a una temperatura de entre 18 y 24°C, una humedad relativa del 45-70% y 15 renovaciones de aire por hora. Cada habitáculo constaba de un sistema de bebida automático revisado diariamente. Todos los animales fueron alimentados siguiendo una dieta estándar.

Los animales tenían alrededor de 3 meses de edad y un peso de entre 15 y 20 kilos. De forma rutinaria se realizaban exploraciones generales del animal así como análisis hematológicos y bioquímicos. Una vez verificado el óptimo estado de salud del animal, eran trasladados a la sala de cirugía en donde se llevaba a cabo todo el procedimiento quirúrgico. El personal veterinario y técnico de la Unidad de Cirugía Experimental del CHU A Coruña se encargó del correcto cuidado y manipulación de los animales antes y después de cada procedimiento.

Para la realización del modelo experimental animal se emplearon 17 cerdos. Se asignó aleatoriamente la pertenencia a cada grupo de tratamiento de I/R. Uno de los grupos estaba formado por 5 cerdos sometidos a IR mediante oclusión de la arteria coronaria descendente anterior y sacrificados 3 días después del procedimiento (3 I/R). Otro grupo lo formaron 6 cerdos sometidos a I/R y sacrificados 15 días más tarde (15 I/R). Finalmente, se incluyó como grupo control (ctrl.) a un grupo de 6 cerdos sanos, sacrificados sin ningún procedimiento adicional.

## 2. Inducción experimental de isquemia/Reperusión (I/R)

Los animales sometidos al proceso de I/R fueron anestesiados de forma general según el protocolo habitual de la Unidad de Cirugía Experimental del CHU A Coruña inyectando intramuscularmente ketamina (15 mg/Kg) y azaperona (2 mg/Kg). Una vez dormido, el animal fue pesado, lavado, rasurado y transportado al quirófano donde se le cateterizó una vía venosa en la oreja. Antes de realizar la operación se le administró sevoforane (5%) en oxígeno (Fi O<sub>2</sub> al 100%) al animal hasta dormirlo profundamente. Llegados a este estado, se le inyectó por vía intravenosa atracurio (1 mg/Kg) para ser intubado y ventilado mecánicamente. La anestesia se mantuvo durante toda la operación (sevoforane (3%) y oxígeno (Fi 30%)) y la analgesia consistió en remifentanilo intravenoso (0.15 µgr/k/min).

Antes de iniciar la inducción de la isquemia se realizó un electrocardiograma (ECG) basal (AR2100, Cardiette, Italia) , y un ECG 2D basal calculándose la fracción de eyección (FE) estimada mediante el método Simpson monoplano<sup>218</sup>. Para la realización de las ecografías se empleó un ecógrafo modelo My Lab 30 cv.7300 (Esaote, EE.UU.). Se protegió el corazón con amiodalona (5mg/Kg) intravenosa y se inició la canulación por punción mediante la arteria femoral derecha.

En primer lugar, se avanzó un catéter “pigtail” 6F y se realizó una ventriculografía izquierda basal. A continuación, se alcanzó la aorta descendente anterior mediante un catéter Guía JR 6F sobre una guía en J 0,038” y se realizó el sondeo de la arteria coronaria izquierda. Para proceder a la inducción de la isquemia, se condujo una guía IC 0,014” hasta la arteria descendente anterior distal y sobre ella se avanzó hasta la arteria descendente anterior media un catéter de balón de un diámetro que permitía la oclusión completa del vaso donde se mantuvo inflado durante 120 minutos. Una vez concluidos el tiempo de oclusión se desinfló el balón y se estabilizó al animal para poder retirar el introductor arterial. Durante la cirugía El procedimiento de catetrización se monitorizó utilizando un equipo de rayos-X modelo OEC 9800 (GE Medical Systems, EE.UU.). Se recogieron los datos de ecocardiograma 2D y la FE del ventrículo izquierdo (Video suplementario), y el ECG tras el proceso de I/R .

Para despertar al animal se administró buprenorfina (0,3 mg IV) y una dosis única de penicilina intramusclar (6.000.000 UI), tromalyt (300 mg/día) y NTG td (10 mg/24h. Al final de la operación se sustituyo el analgésico remifentanilo por buprenorfina (0.02 mg/k) subcutánea que era inyectada cada 12 horas durante 3 días

mientras el animal permaneció vigilado en el estabularlo. Los animales se mantenían vigilados en una jaula de aislamiento en el estabulario hasta el tiempo de supervivencia determinado en cada grupo.

### **3. Sacrificio de los animales**

Al finalizar el tiempo tras el proceso de I/R para cada uno de los grupos (3 y 15 días) se realizó el sacrificio de los animales. Antes del sacrificio, se monitorizaron nuevamente las características clínicas analizadas tras la realización de la cirugía, así se recogieron datos de Ecos, FE y ecocardiogramas. La eutanasia de estos animales y los del grupo control se realizó mediante exanguinación al realizar la extracción del corazón tras inducir anestesia y analgesia profunda en el animal.

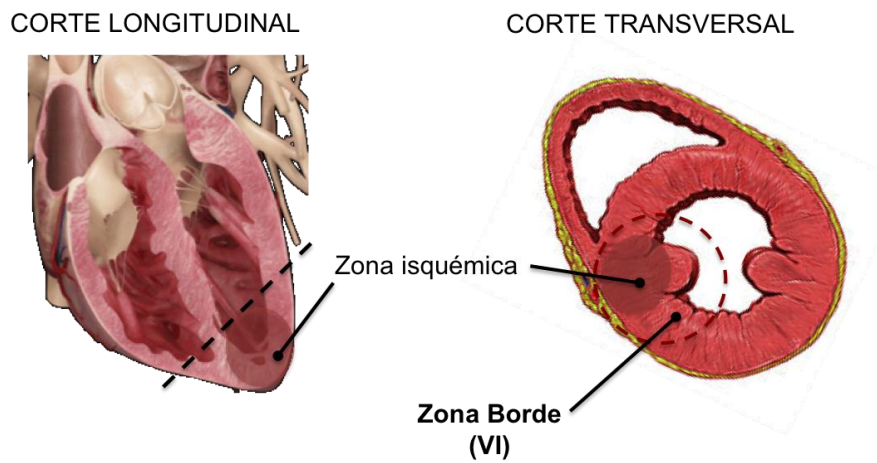
Todos los procedimientos quirúrgicos así como el posterior sacrificio, fueron llevados a cabo por personal facultativo del Servicio de Hemodinámica del CHU A Coruña, con la ayuda del personal de la Unidad de Cirugía Experimental del CHU A Coruña.

### **4. Disección de los corazones y recogida de muestras**

Una vez extraído el corazón de cada animal, los restos de sangre y coágulos presentes se lavaron introduciéndolo en un bote con suero fisiológico. Antes de proceder a su disección se tomaron fotografías del corazón completo y se completó un informe dónde se indicaba su peso, tamaño aproximado y situación del infarto. Este proceso fue repetido de forma similar en el caso de los animales que formaban el grupo control.

Se realizó una sección transversal del corazón de 15 mm de grosor situada a 20 mm del ápex de la que se tomaron datos de extensión de infarto y grosor de la pared del ventrículo. De la sección transversal, se recogió una muestra de tejido que contenía endocardio, miocardio y epicardio y situada en la zona situada a 1cm del área de infarto en el ventrículo izquierdo y del área infartada (Figura 19). Dicha muestra se dividió en tres replicas orientándose espacialmente para su fijación o bien formol neutro tamponado al 10% para su posterior inclusión en parafina, o bien en *O.C.T.<sup>TM</sup> Compound* (Sakura Tissue-Tek, USA) y congeladas inmediatamente en isopentano a -40°C y almacenadas a -80°C. La toma de muestras se llevo

inmediatamente tras su extracción en una sala contigua al quirófano experimental, para evitar cualquier tipo de daño adicional en el tejido cardíaco.



**Figura 19. Esquema de la toma de muestras.** Tras realizar un corte longitudinal a 20 Mm del ápex, se tomaron muestras representativas de la zona situada a 1 cm del área de infarto en el ventrículo izquierdo (VI). Los corazones con localizaciones de infarto diferentes a la del esquema fueron descartados.

## B. MUESTRAS DE TEJIDO CARDÍACO HUMANO

Se obtuvieron muestras de tejido cardíaco procedentes de pacientes sometidos a trasplante cardíaco en el C.H.U de A Coruña tras la obtención de los correspondientes consentimientos informados. Las muestras de tejido cardíaco empleadas como controles sanos procedían de donantes de órganos para trasplante que no pudieron emplearse para este fin debido a que no cumplían los requisitos que exige el protocolo. Todos los procedimientos de utilización de muestras humanas en este trabajo fueron reliazados tras su aprobación por el Comité Ético de Galicia. Se siguieron las directrices del los Reales Decretos 2070/1999 y 1301/2006, que regulan la obtención de tejidos humanos con fines clínicos y para la investigación.

La recogida de muestras se realizó de manera similar al protocolo descrito en el apartado anterior para el modelo animal, aunque siempre se tuvo en cuenta la situación del infarto y las características individuales de cada paciente.

## C. MODELO EXPERIMENTAL DE I/R *IN VITRO*

### 1. Extracción de cardiomiocitos ventriculares adultos de rata

Cardiomiocitos ventriculares fueron aislados de corazones de rata Wistar 7B (peso corporal, 200-250 g, B & K Universal Ltd.) empleándose el método Lagendorff de perfusión mediante el cual se digería el corazón aislado con una solución enzimática con colagenasa. Los corazones fueron extirpados cuando los animales estaban anestesiados terminalmente y heparinizados (60 mg / kg de pentobarbital sódico y 100 unidades de heparina sódica por vía intraperitoneal). El primer paso de la perfusión se realizó introduciendo una cánula en la aorta ascendente y perfundiendo una solución que permitió mantener la función cardíaca ( solución de Krebs: 0,75 mM  $Ca^{+2}$ , 0,13 M NaCl, 1,4  $\mu$ M MgCl, 5 mM HEPES, 0,38 mM  $Na_2HPO_4$ , 5.3 mM KCl, 0,2 M taurina y 10 mM creatina). Posteriormente, para interrumpir la adhesión celular se inhibió el flujo de calcio empleando la misma solución que en el paso anterior pero sin Ca y con 0,1 M EGTA. A continuación, se perfundió el corazón con solución de Krebs con concentraciones crecientes de calcio hasta llegar a la perfusión de la solución final que contenía 1mM  $Ca^{+2}$  y 1 mg / ml de colagenasa tipo II (Worthington). Todas las soluciones se gasificaron con  $O_2$  al 100% y mantuvieron a 37 °C. Posteriormente, los corazones se retiraron del aparato de perfusión y los ventrículos se cortaron en trozos pequeños incubando los fragmentos en 30 ml de la solución con colagenasa con  $O_2$  al 100% durante 7 min a 37 °C. Los cardiomiocitos aislados fueron separados de tejido ventricular no digerido mediante filtración a través de una gasa de nylon. En cada fracción, los miocitos se dejaron sedimentar durante 30 min y se resuspendieron en Medio 199 (Invitrogen, Reino Unido) modificado (2 Mmol/litro de creatina, 2 Mmol/litro carnitina, y 5 Mmol/litro, taurina 100 UI/ml penicilina/estreptomicina). Finalmente, se sembraron en placas de 6 pocillos preincubadas 2 horas con 200  $\mu$ g / ml de laminina (Invitrogen, Reino Unido). Dos horas después del cultivo inicial se cambio el medio con el objetivo de eliminar las células muertas no adheridas.

### 2. Simulación de Isquemia/Reperusión en cardiomiocitos

Para la simulación del proceso de I/R en células se adoptó un protocolo descrito por Punn et al (2000) <sup>219</sup>. Al día siguiente de su extracción y cultivo, se retiró el medio de los cardiomiocitos ventriculares adultos de rata y se procedió a su

tratamiento durante 10 minutos con 1 ml de tampón de simulación de I/R. Dicho tampón consistía en una solución de 13,7 mM NaCl, 0,358 KCl, 49  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 180  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM HEPES, 10 mM 2-deoxiglucosa, 20 mM Na lactato. En el momento de añadirla al medio de cultivo se introducía 1 mM de ditionito de sodio y el pH de la solución caía de 6,8 a 6.3. Tras los 10 minutos de tratamiento se retiraba el tampón y se añadía 2 ml de medio de cultivo dejándose los cardiomiocitos en la estufa de cultivo 12 horas. Finalmente, se proseguía con la técnica de inmunofluorescencia indirecta descrita en la siguiente sección de Técnicas Histológicas.

## D. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

### 1. Tinciones histoquímicas

Las técnicas de análisis histoquímico se realizaron a partir de una de las réplicas de cada muestra conservadas en parafina. Se cortaron las muestras con 4 $\mu$ m de grosor de forma seriada en el microtomo y se tiñeron con las técnicas histoquímicas estándar: hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

**Hematoxilina-eosina.** Se empleó esta tinción para evaluar el estado general del tejido muscular así como la presencia o ausencia de infarto, infiltrados (eosinófilos, neutrófilos y macrófagos) o áreas edematosas. Las muestras fueron desparafinadas en una estufa (30 minutos a 60°C), seguido de un tratamiento con xilol (10 minutos) e hidratadas introduciéndolas en soluciones con una gradación de etanol decreciente (100°, 96°, 70°, 50°) y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, (10 minutos cada uno). Posteriormente, se embebió el tejido en hematoxilina de Harris (5 minutos) y se lavaron con un flujo de agua corriente hasta obtener el viraje crómico. Finalmente, se realizó una contratinción con eosina (5 minutos) y deshidratación en etanol de gradación creciente (50°, 96°, 100°) y xilol (10 minutos cada uno). El montaje de la preparación se hizo con DePeX (Sigma-Aldrich, EE.UU).

**Tricrómico de Masson.** Esta tinción permite distinguir las fibras de colágeno tipo I, que constituyen el principal componente fibrilar en los espacios extracelulares, o indican una necrosis asociada a fibrosis en la pared de los vasos. Las muestras fueron desparafinadas en una estufa (30 minutos a 60°C) y tratadas con xilol (10 minutos). Posteriormente, se hidrataron las muestras en soluciones de etanol de gradación decreciente (100°, 96°, 70°, 50° y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 10 minutos cada uno). A continuación, el tejido se sumergió en alumbre férrico (30 minutos) y hematoxilina férrica de Weigert (10

minutos), lavándose entre cada paso con un flujo de agua corriente. Una vez aclarados, se introdujo la muestra en una solución con etanol-ácido pícrico (6 minutos) seguida de otro lavado con agua corriente (5 minutos) y pases consecutivos de fucsina de Fonceau (8 minutos), ácido fosfomolibdico I (5 minutos), ácido fosfomolibdico II (5 minutos) y azul de anilina (12 minutos). Finalmente, el último aclarado se realizó con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y para la deshidratación del tejido se embebió la muestra en soluciones de etanol creciente (50°, 96°, 100°) y xilol (10 minutos cada uno), y se montaron en DePeX (Sigma-Aldrich, EE.UU).

Las fotos de las tinciones histoquímicas se realizaron en un microscopio BX61 (Olympus, Japón).

## 2. Tinciones inmunológicas

### 2.1 Inmunohistoquímica indirecta en tejido cardiaco

Se utilizaron cortes de tejido cardíaco de 4µm de grosor conservadas en las replicas de parafina. Las secciones se sometieron a un desparafinado descrito anteriormente para las tinciones histoquímicas. Cuando las muestras estaban desparafinadas, se comenzó la tinción de proteínas específicas empleando anticuerpos. En primer lugar, se realizó un lavado con PBS (10 minutos, 0,1% Tween 20, pH 7,4) y un pretratamiento con proteinasa K (Dako, Dinamarca) durante 10 minutos para permeabilizar el tejido. La actividad peroxidasa endógena se inhibió utilizando metanol 3% (10 minutos) seguida de un lavado con tampón PBS pH 7,4 durante 10 minutos. Se realizó la incubación con anticuerpos primarios que reconocen las proteínas : BRP44L (Lifespam Biosciences, Reino Unido), VDAC1 (Cell Signaling, Reino Unido) y HSP60 (Abcam, Reino Unido). Los 2 primeros fueron obtenidos en conejo y el último en ratón. Los anticuerpos se diluyeron en un tampón Tris pH 7,4 con BSA 1% y se incubaron con el tejido durante 1 hora a temperatura ambiente. Las diluciones empleadas se indican en la Tabla suplementaria I (Anexo). Posteriormente, se lavaron las muestras con PBS pH 7,4 (3 veces, 10 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente o bien, anti-conejo (Dako, Dinamarca) o anti-ratón (Dako, Dinamarca) marcados con HRP (*horseradish peroxidase*), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras de tejido tres veces durante 10 minutos con PBS y se aplicó sobre ellas el cromógeno DAB (solución de cromógeno 3,3'-diaminobenzidina) (DAKO, Dinamarca) durante 4 minutos y se retiró su exceso lavando con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. A continuación, se realizó una contratinción (5 minutos)



con hematoxilina de Gill III (MERK, Alemania). Por último, se aclararon las preparaciones, se deshidrataron y montaron según el protocolo descrito anteriormente para las tinciones histoquímicas.

Las fotos de las técnicas de inmunohistoquímica se realizaron en un microscopio BX61 (Olympus, Japón).

## **2.2. Inmunofluorescencia indirecta para cardiomiocitos en cultivo**

Tras cultivar las células se lavaron con PBS 7,4 durante 5 minutos, se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído 4% y se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS. Para permeabilizar la membrana celular se trató a las células con una solución con 0,05% digitonina (Sigma Aldrich, Alemania) y Tris 100mM pH 7,4 durante 5 min y se las lavó con PBS (3 veces, 5 minutos). A continuación, se añadió 100 µl de suero de cabra no específico al 5% diluído en BSA/gold Buffer (20 mM Tris Base, 155 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.5) e incubó durante 20 minutos. Los anticuerpos primarios BRP44L (Lifespam Biosciences, Reino Unido), VDAC1 (Cell Signaling, Reino Unido), LONP1 (Abcam, Reino Unido), HSP60 (Abcam, Reino Unido), ATP5A (Abcam, Reino Unido) y CYTB (Santa Cruz, EE.UU.) se diluyeron en Gold buffer/BSA e se incubaron toda la noche en cámara húmeda agitando (Tabla suplementaria I, Anexo). Al día siguiente, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente, se realizó una doble inmunofluorescencia incubando los cardiomiocitos durante 3 horas con una combinación de secundarios Cy3-anti-ratón (Jackson Immuno Research, Reino Unido), Cy5 anti-conejo (Jackson Immuno Research, Reino Unido) y DAPI (Dylight 549- conjugated, Jackson Immuno Research, Reino Unido) en Gold buffer/BSA (Tabla suplementaria I, Anexo). Finalmente, el montaje se hizo con medio Lisbeth (30mM tris pH 9,5, 70% glicerol y 5% n-propylgallato).

Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal en un microscopio invertido (Leica SP5 sistema, Mannheim, Alemania) equipado con un diodo azul y argón y láseres de helio neón utilizando un objetivo X63 con 1,4 de apertura numérica empleando aceite de inmersión.

## E. TÉCNICAS DE ANÁLISIS PROTEÓMICO

Se recogieron muestras de VI de animales sometidos a IR tras esperar 3 (n=5) o 15 días (n=6) posteriores al procedimiento. También se recogieron muestras de animales sanos (n=6). Una vez recogidos todos los grupos experimentales, la extracción de mitocondrias se realizó en la réplica conservada en *HOCTN Compound* (Sakura Tissue-Tek, USA). En la figura 20 se muestra de forma esquemática los pasos seguidos para recoger el perfil proteómico para cada uno de los grupos.

### 1. Aislamiento de las mitocondrias y cuantificación proteica

Para realizar el aislamiento de mitocondrias se extrajeron 100 mg de tejido procedente de VI. A continuación, se lavaron con PBS frío para eliminar posibles restos de sangre u OCT. Las mitocondrias fueron extraídas empleando un kit comercial (Mitochondria Isolation Kit for Tissue, Pierce, EEUU) con algunas modificaciones. Una vez lavadas con PBS frío, se cortó cada pieza de tejido en porciones más pequeñas con un bisturí y se procedió al lavado de las mismas con el tampón de extracción (10 mM HEPES, 200 mM manitol, 70 mM sacarosa, 1mM EGTA pH 7,4). Para digerir la matriz extracelular y desprender las células del tejido se añadió e incubó la muestra en hielo durante 5 minutos en 1 ml del tampón de extracción anteriormente descrito con tripsina 0,25 mg/ml. Transcurridos los 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se volvió a incubar el tejido durante 20 minutos en el mismo tampón con 0,25 mg/ml de tripsina que en el paso anterior. Se extrajo el sobrenadante y se lavo la muestra dos veces con 1 ml de tampón de extracción. El tejido se rompió finalmente mediante 20 pulsos en homogenizador (Homogenizer System Ika\* Ultra-Turrax\* T25, Fisher Scientific, Alemania) a 200 rpm. Este número de pulsos permitió obtener un lisado homogéneo, sin una gran rotura celular del tejido. A continuación, se centrifugó el lisado a 1000 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante que contenía células rotas producidas durante el proceso de homogenizado y se resuspendió el pellet en 0,8 ml de tampón de extracción con 0,05% de digitonina. Se incubó en hielo durante 5 minutos mezclando la solución cada minuto a velocidad media. Posteriormente, se centrifugó la solución a 700 g durante 10 minutos, se descartó el pellet y se transfirió el sobrenadante que contenía las mitocondrias a un tubo nuevo. La solución con las mitocondrias se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos y el pellet mitocondrial se resuspendió en tampón de lisis (SDS 1%, 50 mM Tris pH 7,4). Todo el procedimiento de extracción de mitocondrias se realizó a 4 °C o

bien con las muestras en hielo y todas los tampones contenían cóctel de inhibidores (Sigma, Reino Unido).

La cuantificación de todos los extractos proteicos se calculó mediante la absorbancia a 280nm utilizando un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop, EE.UU.).

Antes de proceder a la extracción mitocondrial en los diferentes grupos experimentales se realizaron diferentes pruebas de optimización del protocolo de forma que se pudiese extraer la fracción mitocondrial más enriquecida con un mayor rendimiento. Para ello se comprobó la eficacia del método empleando diferentes anticuerpos que reconocen proteínas consideradas como marcadores de enriquecimiento mitocondrial: ATP5A (Abraham, Reino Unido) y TRAP1 (Santa Cruz, EE.UU.), miogenina (Abcam, Reino Unido) como marcador nuclear y GAPDH (Abcam, Reino Unido) como marcador citoplasmático. Las diluciones empleadas se indican en la Tabla suplementaria I (Anexo).

## **2. Separación electroforética**

Para el análisis proteómico mitocondrial los extractos fueron reducidos en tampón de carga (100 mM Tris, pH 6,8, 40% glicerol, 0,2% SDS, 2% beta-mercaptoetanol y 0.02% azul de bromofenol) y hervidos a 96°C durante 5 minutos. Se cargaron 30 µg de proteína en geles bis-tris de gradiente discontinuo 4%-12% NuPAGE (Life Technologies, EE.UU). La electroforesis se llevó a cabo en un tanque de 1L para geles de 8 cm (Life Technologies, EE.UU) en buffer Laemmli (Life Technologies, EE.UU), aplicando 75V durante 15 minutos y a continuación 130V hasta que el frente alcanzó el límite inferior del gel.

## **3. Tinción con azul Coomassie y corte de las bandas**

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron utilizando tinción azul de Coomassie. Para ello, cada gel se lavó con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> mQ y se embebió en la solución con azul de Coomassie (0,1% azul brillante Coomassie G-250, 50% metanol, 10% ácido acético) durante 1 hora. Para desteñirlo y eliminar el tinte no adherido se lavó el gel con una solución con 40% metanol, remplazándolo 1 vez cada 15 minutos durante 1 hora. El último lavado se realizó solo con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> mQ durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, una vez el gel estuvo rehidratado, se cortaron 7 bandas del gel en posiciones idénticas y paralelas para cada carril sin dejar porciones vacías. Cada banda a su vez se cortó en porciones más pequeñas para facilitar su digestión.

#### **4. Digestión en gel de las proteínas**

Las bandas cortadas de los geles de acrilamida fueron lavadas secuencialmente con bicarbonato amónico  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (50 mM) y acetonitrilo (ACN). Posteriormente, las proteínas se redujeron y se alquilaron respectivamente, empleando un tratamiento con solución de DTT ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ) 10 mM en 50 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  durante 30 minutos a  $56^\circ\text{C}$ , seguido de tratamiento con una solución de yodoacetamida ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ ) 55 mM en 50 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  durante 15 min. A continuación, se realizaron lavados secuenciales con tampón y acetonitrilo y las proteínas se digirieron hasta péptidos durante la noche a  $37^\circ\text{C}$  con 200 ng de tripsina (grado de secuenciación modificado, Promega). Los péptidos trípticos se extrajeron de la matriz de gel con 10% de ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) y acetonitrilo. Finalmente, los extractos se secaron en una centrifuga de vacío.

#### **5. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y espectrometría de masas en tandem (MS/MS)**

La espectrometría de masas se realizó en un nanoACQUITY HPLC (Waters, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masa Orbitrap Velos (Thermo Scientific, EE.UU.). Las muestras se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de solución de ácido fórmico al 1% y se inyectaron o bien 6.5  $\mu\text{L}$  (muestras correspondientes a las bandas 1 y 2, proteínas peso molecular inferior a 28 KDa), o bien, 4  $\mu\text{L}$  (muestras correspondientes a las bandas de 3 a 7, proteínas con peso molecular superior a 28 Ada) en una columna de fase inversa C18 (longitud 10 cm, 75  $\mu\text{m}$  diámetro interno, tamaño de partícula 1.7  $\mu\text{m}$ , columna ñaño Acquity BEH, Waters, EE.UU.). Los péptidos unidos se eluyeron y separaron de la columna con el siguiente gradiente: 1 a 4% de 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo en 5 minutos, seguido de un gradiente de 4 a 35% de 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo en 120 min, 35 a 45% de 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo en 25 minutos, 45 a 80% de 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo en 3 min. El flujo fue de 250 nl / min. La elución de los péptidos de la columna estaba

acoplada a una fuente de ionización nanospray Picoview (PicoTip™, New Objective). El vaporizador de voltaje aplicado fue de alrededor de 2000V.

El análisis de los péptidos se recogió en un espectrómetro de masas de tipo trampa iónica LTQ Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Scientific, EE.UU.) con una resolución de 60000 a m/z de 400. Hasta los 20 péptidos más abundantes (intensidad mínima de 500 cuentas) fueron seleccionados de cada escaneado y fragmentados utilizando el 38% energía de colisión normalizada en la trampa de iones lineal con helio como gas de colisión.

Los datos primarios se recogieron con Thermo Xcalibur (v.2.1.0.1140) y se analizaron con Thermo Discoverer Proteome (v.1.2.0.208).

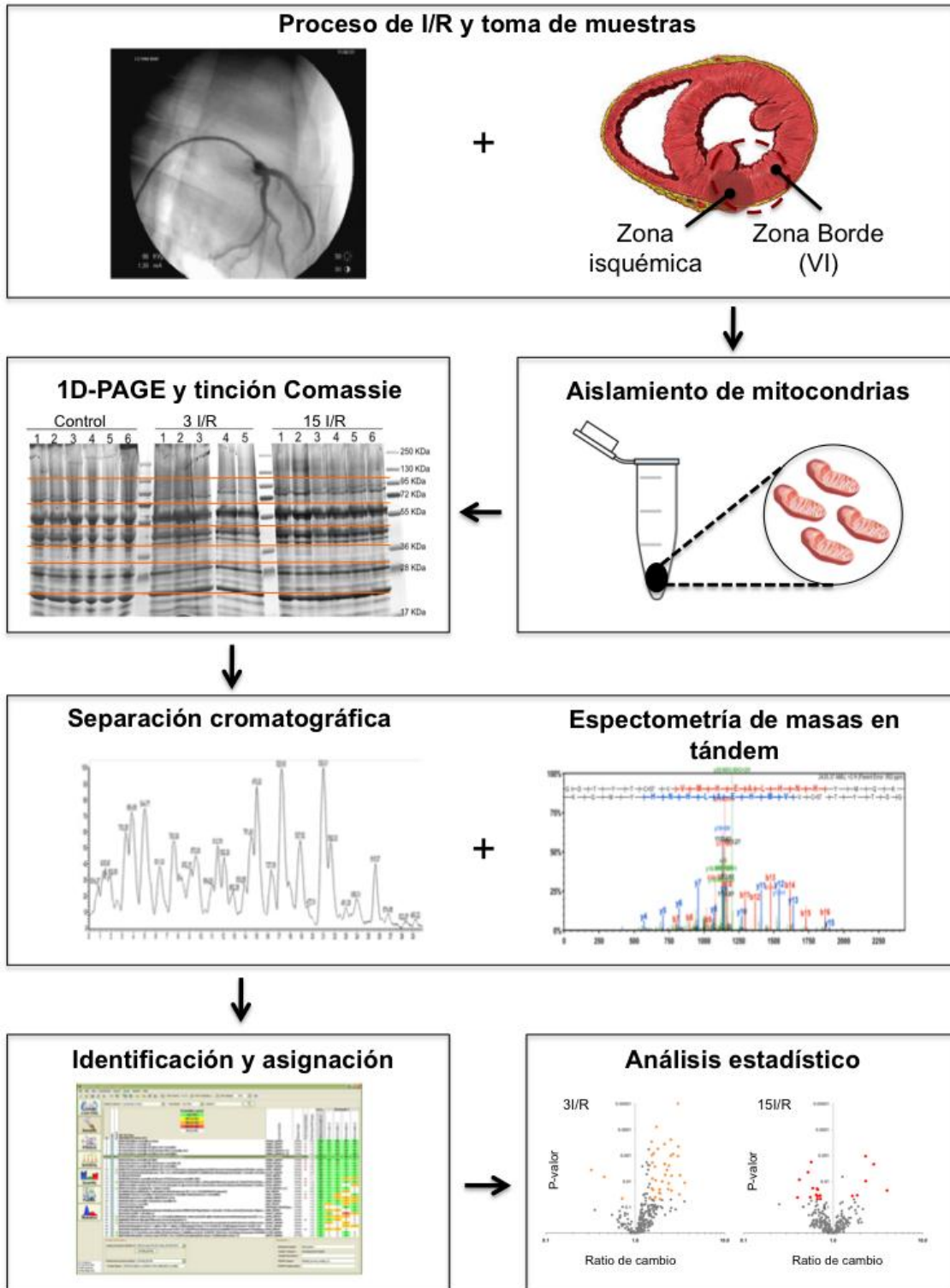
## **6. Identificación y bases de datos**

Los archivos de datos crudos fueron analizados en el software Proteome Discoverer (v.1.2.0.208) utilizando el algoritmo de búsqueda Mascot. Los archivos FASTA se generaron para una base de datos híbrida *Sus scrofa*/ *Homo sapiens* a partir del repositorio UniProtKB/Swiss-Prot (versión 14.6, 21.669 entradas). Los parámetros de búsqueda incluyeron como modificaciones fijas la carbamidometilación de la cisteína y como modificación variable la oxidación de la metionina y la piro Glu- (N-término glutamina).

La tolerancia de masa para los precursores (MS) fue de 10 ppm y de 1,0 para los iones fragmentados (MS/MS). Se permitió un máximo de dos cortes trípticos perdidos. Las asignaciones de péptidos se aceptaron para todas aquellas identificaciones con una probabilidad  $\geq 95\%$  de acuerdo con el algoritmo Peptide Prophet<sup>220</sup>. Los datos de identificación de espectros obtenidos se cargaron para su análisis mediante conteo de espectros en el software Scaffold (versión 2.0.6, Proteome Software, EE.UU.). Las identificaciones de proteínas se aceptaron solo para probabilidades superiores al 99%<sup>221</sup> con al menos dos péptidos independientes.

## **7. Análisis de la distribución de proteínas de acuerdo con su función celular**

El análisis de la ontología genética o *Gene Ontology* es una de las principales herramientas bioinformáticas que unifica los atributos de los productos de los genes teniendo en cuenta todas las especies. Se realizó la búsqueda de las ontologías para los procesos biológicos de cada una de las proteínas diferencialmente expresadas a los 3 y 15 días tras I/R. Para ello se convirtieron las entradas de UniProt obtenidas al realizar la identificación de los péptidos a entradas EntrezGene empleando el CNIO ID Converter (<http://idconverter.bioinfo.cnio.es/>). A continuación, se empleó la herramienta Term Enrichment empleando el software AmiGO (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>) para encontrar los procesos biológicos significativamente alterados en cada condición experimental.



**Figura 20. Esquema de trabajo para el análisis proteómico.** Tras la extracción mitocondrial en la zona borde a la isquemia en el VI, los extractos proteicos mitocondriales fueron separados en geles de acrilamida dividiéndose cada carril en 7 bandas. Las bandas se digirieron enzimáticamente y se separaron mediante cromatografía líquida para su análisis por espectrometría de masas en tándem. Una vez asignadas las identidades proteicas, los datos se sometieron a análisis estadístico.



## F. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

### 1. Western blot

Con la técnica de western blot se analizó la eficacia del aislamiento de mitocondrias (Apartado E.1 de material y métodos) y se validaron las proteínas diferencialmente expresadas en los tres grupos experimentales. Para el análisis de la eficacia del método se emplearon 15 µg de proteína procedente del extracto crudo (lisado total de tejido de VI), 15 µg de la fracción correspondiente al pellet tras el tratamiento con digitonina y 15 µg de extracto mitocondrial. Por otra parte, para la validación de las proteínas diferencialmente expresadas se utilizaron 15 µg de proteínas procedentes de cada una de las replicas de tejido conservado en *O.C.T.<sup>TM</sup> Compound* (Sakura Tissue-Tek, USA). Todas las muestras se resuspendieron en tampón de carga (100 mM Tris, pH 6,8, 40% glicerol, 0,2% SDS, 2% beta-mercaptoetanol y 0.02% azul de bromofenol).

Para el análisis de la eficacia de la extracción las proteínas se corrieron en un gel NuPAGE de acrilamida en gradiente 4-12% (Life Technologies, EE.UU.) mientras que para la validación de las proteínas diferencialmente expresadas tras el análisis proteómico se utilizó un gel de acrilamida al 10%. La electroforesis en ambos casos se llevó a cabo en un tanque de 1L para geles de 8cm (Life Technologies, EE.UU.) en buffer Laemmli (Life Technologies, EE.UU.) o bien en tanques de 1L para 4 geles (Biorad, EE.UU.), aplicando 75V durante 15 minutos y a continuación 130V hasta que el frente alcanzó el límite inferior del gel. Se utilizó una membrana de PVDF previamente activada con metanol 100% y posteriormente lavada con tampón de transferencia. Se realizó una transferencia semiseca a 12V durante 40 minutos. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con PBS (0,1% Tween 20) y se bloqueó con leche 5% (en PBS y 0,1% Tween 20) durante 1 hora. La incubación con los siguientes anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4°C (diluidos en seroalbúmina bovina 5% en PBS y 0,1% Tween 20). A la mañana siguiente, la membrana se lavó 3 veces en PBS (0,1% Tween 20) durante 15 minutos. A continuación, se añadió el Ac secundario correspondiente (diluido en leche 5% en PBS y 0,1% Tween 20), conjugado con HRP en todos los casos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, se añadió reactivo de revelado ECL (GE Healthcare, EE.UU.) durante 1 minuto y la visualización de las bandas detectadas se obtuvo utilizando láminas autoradiográficas (Healthcare, Alemania) expuestas durante los tiempos apropiados. Los Ac empleados se describen en la Tabla suplementaria I (Anexo).



## **G. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **1. Análisis de expresión génica**

#### **1.1. Extracción de ARNm de tejido cardíaco**

Se recogieron 50 mg de tejido cardíaco conservado en OCT empleando un sacabocados y se extrajo ARN empleando el reactivo TRIzol® (Life Technologies, Reino Unido). En un primer paso se lavo el tejido con PBS frío para eliminar restos sanguíneos. Una vez retirado el PBS, se introdujeron en cada tubo 2 microesferas de circonio ZIRBLAST® tipo B30 (425/600  $\mu\text{m}$ ) y cada tubo se colocó en un casete previamente sumergido en nitrógeno líquido. A continuación, se procedió a la disgregación mecánica del tejido, para ello la muestra junto con las microesferas se agitaron en el mezclador Mill MM 200 (Restsch, Alemania) durante 5 minutos con una frecuencia de vibración de 25 Hz. Una vez disgregado el tejido, se añadió 1 ml de TRIzol® (Life Technologies, Reino Unido) a cada tubo, se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se traspasó la solución de tejido y trizol a un nuevo tubo (sin microesferas) donde se añadió 0,2 ml de cloroformo, se agitó por inmersión durante 15 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se centrifugó a 4 °C la muestra durante 15 minutos a 12000 g. Tras la centrifugación se obtienen 2 fases: una fase acuosa en donde está presente el ARN y una fase orgánica, que a su vez se divide en una interfase blanquecina donde está el ADN y una fase rosácea donde están presentes los restos celulares. Para la precipitación del ARN se traspasó la fase acuosa a un nuevo tubo en el que se añadió 0,5 ml de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugaron a 4 °C los tubos a 12000 g durante 10 minutos, de esta forma se obtuvo un pellet de ARN que fue lavado con 1 ml de etanol 75% frío y centrifugado a 7500 g durante 5 min. Una vez retirado el etanol y seco el pellet, se resuspendió el ARN en 20  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O y cuantificó midiendo la absorbancia de la muestra a 260nm utilizando un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop, EE.UU.).

#### **1.2. Retrotranscripción**

Se eliminaron restos de ADN en 2  $\mu\text{g}$  de ARN utilizando ADNasa I (Life Technologies, EE.UU.) (1 unidad/ $\mu\text{g}$  en 200mM Tris-HCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl,

pH 8,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo EDTA 2mM. Para realizar la retrotranscripción se utilizó el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con cebadores oligo-dT mediante un ciclo de 30 minutos a 65° C y 5 minutos a 85° C.

### 1.3. Diseño de cebadores de ADN

El diseño de los cebadores se llevo a cabo en base las correspondientes secuencias de mRNA porcinas, empleando un software online de libre acceso: Primer-3'-plus<sup>222</sup>. Para ello se incluyeron como criterios para el diseño:

- Longitud en nucleótidos de los cebadores: 19-21
- Temperatura de anillamiento: 60±0,5° C
- Contenido máximo de G/C: 80%
- Longitud de los amplicones en nucleótidos: 75-100

Las parejas de cebadores utilizadas para el análisis de la expresión génica de VDAC1, HSP60, BRP44L y LONP1 se describen en la tabla suplementaria II (Anexo). Las secuencias fueron identificadas mediante BLASTtn (proteína humana vs ESTs/mRNAs porcinos) para evitar problemas derivados de la carencia de bases de datos completas de proteínas porcinas. Debido a que los cebadores presentaban características similares, todos los transcritos de interés se amplificaron bajo el mismo programa de PCR. Todos los oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Alemania) y diluido en agua-DEPC hasta una concentración de 20 µM.

### 1.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Los niveles de expresión génica se cuantificaron en base a la fluorescencia emitida por el compuesto *SybrGreen*. Una vez que éste se une al ácido nucleico formado en la reacción, este emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real. Por lo tanto, un aumento del producto de la PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR; esto permite que las concentraciones de ADN o ADNc puedan ser cuantificadas. Para ello se midieron en las diferentes muestras utilizando un termociclador con detección a tiempo real *Light Cycler 480* (Roche, Alemania). Para realizar la amplificación se usó el kit *SybrGreen*

*Master Mix* (Roche, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía Taq-polimerasa, dNTPs y  $Mg^{+2}$ , además del fluoróforo que se une inespecíficamente a DNA de doble hebra. A esta mezcla se le añadió 2  $\mu$ L de cDNA y los correspondientes cebadores directos y reversos adecuados para cada caso a una concentración final de 3  $\mu$ M. Cada muestra se amplificó por triplicado para cada gen.

El programa de PCR empleado siguió las siguientes especificaciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación en tres etapas: 1) desnaturalización de 10 segundos a 95°C, 2) hibridación durante 10 segundos a 60°C y 3) polimerización de 10 segundos a 72°C.

Finalmente, es posible identificar productos específicos de la PCR mediante el análisis de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) que se expresa en una curva cuya forma se relaciona con el contenido de GC, tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos. El análisis de la curva de fusión se realizó en el mismo termocilador a tiempo real, *Light Cycler 480* (Roche, Alemania), al final de la reacción de amplificación. El programa empleado para el cálculo de la  $T_m$  consistió en un primer paso de desnaturalización de 5 segundos a 95°C, un segundo paso de hibridación de 15 segundos a 65°C y un último paso de adquisición de datos durante un gradiente continuo de temperatura hasta alcanzar los 95 °C a 0,06°C/s, con diez adquisiciones de intensidad de fluorescencia por segundo. La  $T_m$  en °C es el valor de temperatura en el punto de inflexión de la curva de fusión obtenida al enfrentar la derivada de la intensidad de fluorescencia en el tiempo frente a la temperatura. Para todos los amplicones analizados en este estudio la curva de fusión mostró un pico único y constante entre muestras.

### 1.5. Cálculo de la expresión relativa de los genes de estudio

La cantidad de fluorescencia emitida por la incorporación de *SybrGreen* en la reacción de síntesis del amplicón es registrada por la plataforma de PCR a tiempo real. Cuando el valor de fluorescencia supera en 10 veces la desviación estándar se obtiene el valor del umbral de ciclo (CT por sus siglas en inglés).

Para realizar el cálculo de la expresión relativa de los diferentes genes de estudio se realizó una comparación con dos genes de referencia: *Bact* y *GAPDH*.

Ambos están descritos por Nygard et al (2007) como genes porcinos susceptibles de poder actuar como genes de referencia<sup>223</sup>.

El método de cuantificación de la expresión relativa empleando GAPDH y Bact como genes de referencia fue una adaptación del protocolo de KJ Livak y TD Schmittgen<sup>224</sup>. Este modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) de reacción en la PCR en tiempo real tanto del gen en estudio como del gen de referencia. Para ello, en primer lugar se calcularon las diferencias de expresión para GAPDH y Bact como  $\Delta Ct$ . El mismo procedimiento fue realizado para calcular la diferencia de expresión entre el gen de referencia y el gen interrogado en cada una de las muestras de los diferentes grupos experimentales (controles, 3 I/R y 15 I/R). Asumiendo una eficiencia del 100%, el valor de  $\Delta Ct$  obtenido, usado como exponente de una potencia con base 2, dio como resultado la variación, en número de veces, de la presencia de GAPDH o Bact entre la muestra control y la tratada. Finalmente, el cociente entre los ratios obtenidos (gen interrogado/GAPDH o gen interrogado/Bact), es equivalente a la diferencia de expresión, en número de veces y referida a cada calibrador constitutivo, del gen interrogado entre la muestra tratada y una de las muestras control. Cada muestra tratada se compara por este procedimiento frente todos los controles sanos ( $n=6$ ) hasta obtener los 5 (3 I/R) o 6 (15 I/R) valores, que se promedian resultando así el valor de expresión normalizado definitivo para un transcrito de una muestra de uno de los cerdos tratados. Los valores de expresión para las muestras de cerdos sanos (controles), se calcularon del mismo modo, haciéndose la comparación frente a los animales de su propio grupo, para no afectar a la variabilidad total (Figura 21).

	Gen de Referencia (GR)	Gen Interrogado (GI)
Control (C)	Ct (GR) <sub>C</sub>	Ct (GI) <sub>C</sub>
Muestra tratada (T)	Ct (GR) <sub>T</sub>	Ct (GI) <sub>T</sub>

$$\Delta Ct (C) n = Ct (GR)_C - Ct (GI)_C$$

$$\Delta Ct (T) n = Ct (GR)_T - Ct (GI)_T$$

$$\left. \begin{array}{l} \text{Ratio de cambio de T1 respecto C1} = 2^{\Delta Ct (T) 1 - \Delta Ct (C) 1} \\ \text{Ratio de cambio de T1 respecto C2} = 2^{\Delta Ct (T) 1 - \Delta Ct (C) 2} \\ \vdots \\ \text{Ratio de cambio de T1 respecto C6} = 2^{\Delta Ct (T) 1 - \Delta Ct (C) 6} \end{array} \right\} \bar{X} = \text{Ratio para T1}$$

**Figura 21. Cálculo de la expresión relativa de los genes de estudio empleando el método 2 delta delta Ct.** Ejemplo del cálculo de ratio de cambio de expresión génica con respecto a un

gen de referencia en una muestra tratada. El cálculo descrito en la figura fue realizado para todas las muestras, incluyendo los controles.

## H. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 1. Análisis estadístico de las diferencias a nivel proteómico, genómico y de la validación por western blot

Todos los datos obtenidos del análisis proteómico fueron revisados con el objetivo de seleccionar solo las proteínas mitocondriales detectadas. La comparación del proteoma mitocondrial se realizó entre muestras control y aquellas recogidas 3 o 15 días tras el proceso de I/R. La significación de los cambios observados se calculó utilizando el test de Dunnet en el paquete estadístico SPSS 17.0 (IBM, EE.UU.), donde el grupo de 3 I/R y 15 I/R se compararon contra el grupo control. La proporción de falsos positivos (FDR) se asignó utilizando el software Q-Value (J.D. Storey, Princeton, EE.UU. ).

El test de Dunnet también se empleó para evaluar las diferencias de expresión genómica entre el grupo control y los grupos de 3 I/R y 15 I/R. Del mismo modo, se utilizó este test para determinar diferencias entre los valores obtenidos por densitometría tras normalizar frente la expresión de GAPDH de los westerns blot en los que se analizaba la expresión de VDAC1, LONP1, HPS60 y BRP44L.

### 2. Análisis de componentes principales

Para estudiar las relaciones que se presentaron entre las diferentes muestras se transformó el conjunto original de conteo de espectros para cada una en otro conjunto de nuevas variables incorreladas entre sí. Para ello se realizó un análisis de componentes principales con el paquete estadístico SPSS 17.0 (IBM, EE.UU.). Las nuevas variables representaron combinaciones lineales que se iban construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen de la muestra. Para realizar la representación gráfica se escogieron los tres primeros componentes principales, es decir, aquellos que recogían un mayor porcentaje de variabilidad de las muestras estudiadas.

### **3. Mapas térmicos**

Para la construcción de mapas térmicos de expresión proteica se utilizó el software MeV-TM4 (version 4.6, Dana-Farber Cancer Institute, EE.UU). Los grupos de proteínas diferencialmente expresadas obtenidos previamente tras el análisis mediante Gene Ontology fueron analizados por separado. En primer lugar se tipificaron los datos de conteo de espectros para las diferentes proteínas y así se obtuvieron valores de expresión proteica que eran mesurables dentro de la misma escala para cada grupo. Para obtener clusters de expresión en forma de dendrogramas, se utilizó la distancia de correlación de Pearson ( $r$ ) derivada de cada par proteína-proteína para cada una de las muestras que formaron parte del estudio.

## **IV. RESULTADOS**



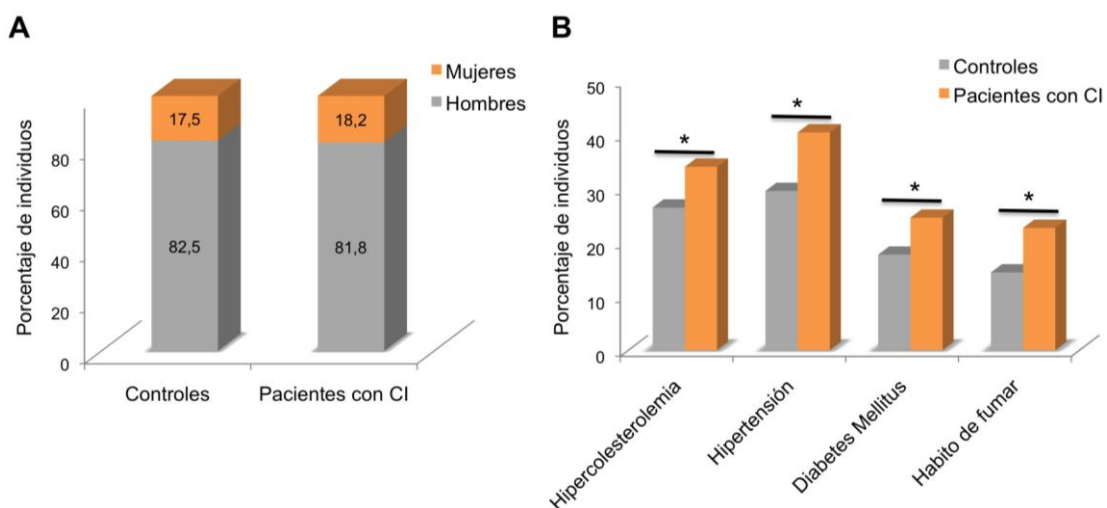


## IV. RESULTADOS

### ASOCIACIÓN DE HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

#### A. POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este estudio epidemiológico retrospectivo se incluyeron 781 individuos españoles, de los cuales 358 habían sido diagnosticados previamente con CI (grupo patológico) y 423 individuos no padecían ni tenían un historial clínico con esta enfermedad (grupo control). A la hora de establecer el grupo control, se tuvo en cuenta que la CI es una enfermedad prevalente en edades avanzadas, por ello ambos grupos se constituyeron con los datos de individuos con edades similares ( $66,36 \pm 11,8$  años para el grupo patológico y  $66,56 \pm 11,9$  años para el grupo control). De esta forma se evitó la inclusión en el grupo control individuos jóvenes que pudieran desarrollar CI en el futuro. Otro factor considerado a la hora de establecer el grupo control fue la baja proporción de mujeres que desarrollan CI (18,2% de mujeres versus 81,8% de hombres) en el grupo patológico. Así, en el grupo control se incluyó un porcentaje de mujeres similar al grupo patológico (17,5% de mujeres frente a un 82,5% de hombres) (Figura 22.A). Por otra parte, la frecuencia para los factores de riesgo clásicos de desarrollo de un evento cardiovascular isquémico, como son la hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes mellitus y el hábito de fumar, se encontró significativamente ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) más elevada en el grupo patológico (Figura 22.B).



**Figura 22. Características clínicas de los grupos de estudio.** A. Distribución de los individuos en función del sexo en el grupo control y en pacientes con cardiopatía isquémica (CI). B. Distribución de los individuos en función de los factores de riesgo clásicos para el desarrollo de la CI.\*  $p$ -valor $<0,05$ .

## B. ASIGNACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES

### 1. Eficacia de la técnica de la PCR múltiplex y SBE (Single Base Extension)

La técnica de la PCR múltiplex en la cual se amplificaban en una sola reacción 6 fragmentos de ADNmt que contenían los SNPs, y la posterior detección de los nucleótidos incorporados en cada sitio polimórfico mediante el ensayo de SBE permitió asignar el 89,88% de las muestras. Este porcentaje correspondió a los haplogrupos europeos más frecuentes: H, U, J, T y V. Los haplogrupos menos frecuentes (X, I, W) fueron asignados mediante la técnica clásica de PCR-RFLP y representaron un 6,02% de las muestras analizadas. Sólo el 4,10% de las muestras no consiguieron ser asignadas a los haplogrupos europeos más comunes y fueron clasificadas como “otros”.

### 2. Distribución de haplogrupos en la población de estudio

Los pacientes y controles incluidos en este estudio fueron genotipados para los haplogrupos europeos más comunes. En la tabla 7 se resumen las frecuencias resultantes para cada uno de ellos. En resumen, la distribución de los haplogrupos varió desde un 50% para el haplogrupo H, el haplogrupo europeo más común, hasta un 0,8% para el haplogrupo menos frecuente I.

La frecuencia de dos haplogrupos mitocondriales en el grupo patológico fue significativamente diferente a la encontrada en el grupo control. El haplogrupo H se encontró significativamente más representado en el grupo patológico (OR=1,50, IC=1,13-2,00],  $p$ -valor<0,05) cuando se comparó con el resto de haplogrupos en conjunto (Tabla 7). Por otra parte, la frecuencia del haplogrupo J en el grupo de pacientes con CI fue significativamente más baja que en la población control (OR=0,47, IC=[0,28-0,82],  $p$ -valor<0,05). Por tanto, los resultados observados mostraron al haplogrupo H como factor de riesgo y al haplogrupo J como factor de protección para el desarrollo de CI.

Debido a que los haplogrupos analizados comparten un ancestro evolutivo común, muchos SNPs han sido conservados durante la evolución. Por este motivo también se analizaron las frecuencias los *clusters* de haplogrupos HV, JT, KU y IWX. Cabe destacar que aunque la frecuencia del haplogrupo J fue significativamente más

baja en pacientes con CI que en controles, no se encontraron diferencias para la distribución del cluster JT. Sin embargo, los resultados obtenidos apuntan al cluster HV como un factor de riesgo para el desarrollo de CI (OR=1,47, IC=[1,11-1,96], p-valor<0,05) (Tabla 7).

**Tabla 7. Frecuencias y OR de los haplogrupos mitocondriales y clusters en el grupo control y en el grupo de pacientes con CI.**

	Nº de individuos (%)		Total	OR [IC95%]	p-valor	
	Controles (n=423)	Pacientes con CI (n=358)				
<b>Haplogrupos</b>	H	169 (40,0)	179 (50,0)	348 (44,6)	1,50 [1,13-2,00]	<b>0,039*</b>
	U	73 (17,3)	58 (16,2)	131 (16,8)	0,92 [0,64-1,35]	0,694
	J	47 (11,1)	20 (5,6)	67 (8,6)	0,47 [0,28-0,82]	<b>0,048*</b>
	T	47 (11,1)	39 (10,9)	86 (11,0)	0,98 [0,62-1,53]	0,923
	K	28 (6,6)	19 (5,3)	47 (6,0)	0,79 [0,43-1,44]	0,442
	V	13 (3,1)	10 (2,8)	23 (2,9)	0,82 [0,39-2,09]	0,818
	IWX	27 (6,4)	20 (5,6)	47 (6,0)	1,13 [0,60-2,12]	0,698
	OTROS	19 (4,5)	13 (3,6)	32 (4,1)	0,80 [0,39-1,65]	0,551
<b>Clusters</b>	HV	188 (44,4)	194 (54,2)	382 (48,9)	1,47 [1,11-1,96]	<b>0,027*</b>
	JT	94 (22,2)	59 (16,5)	153 (19,6)	0,69 [0,48-0,99]	0,044
	KU	101 (23,9)	77 (21,5)	178 (22,8)	0,88 [0,63-1,23]	0,444
	IWX	27 (6,4)	20 (5,6)	41 (6,0)	1,13 [0,60-2,12]	0,698

OR. Odds Ratio. 95%. IC. Intervalo de confianza al 95%. CI. Cardiomiopatía isquémica.

\*Corrección de Bonferroni: p-valor<0,05/8 para los haplogrupos y p-valor<0,05/4 para los clusters.

Las diferencias significativas (p-valor<0,05) se indican en negrita.

### 3. Comparación de la frecuencia de haplogrupos en este estudio y otras poblaciones europeas

Para comprobar que nuestra población de estudio no difería del resto de poblaciones a nivel europeo, se comparó la distribución de haplogrupos en el grupo control con respecto a aquellas reportadas en otros estudios realizados en Europa (Tabla 8)<sup>225-228</sup>. La frecuencia de los haplogrupos analizados en este estudio fue similar a la población control empleada en otro estudio en España, así como en un estudio finlandés y otro austríaco. Sin embargo, la representación del grupo “otros” en un

estudio italiano difería de la frecuencia observada para el mismo grupo en nuestra población control.

**Tabla 8. Frecuencias (%) de poblaciones control en este estudio y en otros estudios europeos.**

Haplogrupos	Este estudio N=423	España <sup>228</sup> N=206	Finlandia y Suecia <sup>227</sup> N=134	Italia <sup>226</sup> N=686	Austria <sup>225</sup> N=1527
H	40,0	40,3	41,0	41,0	43,6
U	17,3	19,9	14,2	12,4	15,5
J	11,1	10,2	11,2	9,5	11,4
T	11,1	7,8	11,9	9,1	8,3
K	6,6	...	7,5	5,6	5,2
W	1,4	...	2,2	0,8	2,1
V	3,1	...	3,0	1,0	1,8
I	1,4	...	2,2	2,7	1,0
X	3,5	...	4,5	6,2	1,3
SuperHV	1,4	12,6	...	...	...
OTROS	3,1	9,2	2,2	11,3	9,8

#### 4. Distribución de haplogrupos en función de los factores de riesgo clásicos para el desarrollo de CI

Se estudió la distribución de los haplogrupos mitocondriales en función de los factores de riesgo con el objetivo de observar si alguno de ellos presentaba diferencias en cuanto a su frecuencia en ambos grupos estudiados. Aunque, como se muestra en la Figura 22, la frecuencia de los factores de riesgo fue significativamente más elevada en el grupo patológico, la distribución de haplogrupos estratificada según los factores de riesgo analizados no mostró diferencias entre pacientes y controles (Tabla 9).

El análisis de regresión logístico multivariante incluyendo las variables hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes y hábito de fumar, mostró que todos estos factores de riesgo se encontraban independientemente asociados con la CI (Tabla 10). Así nuestros resultados apoyan estudios previos señalando que el desarrollo de la CI está asociado con la hipercolesterolemia (OR=1,58, IC=[1,13-2,20], p-valor<0,05), hipertensión (OR=2,01, IC=[1,46-2,76], p-valor<0,001), diabetes (OR=1,58, IC=[1,09-2,28], p-valor<0,05) y con el hábito de fumar (OR=2,37, IC=[1,63-3,45], p-valor<0,001). Tras realizar este tipo de análisis estadístico el haplogrupo H continuó siendo un factor de riesgo comparado con el haplogrupo J (OR=0,28, IC=[0,15-0,52], p-valor<0,001) y con el grupo “otros” (OR=0,59, IC=[0,37-0,95], p-valor<0,05) (Tabla 9). Estos

resultados apoyan la observación de que, comparados con el grupo control e independientemente a los factores de riesgo analizados para el desarrollo de CI, el haplogrupo H se presenta con una mayor frecuencia en el grupo patológico que el haplogrupo J y el grupo “otros”.

**Tabla 9. Frecuencias de haplogrupos mitocondriales (%) clasificados según los diferentes factores de riesgo para el desarrollo de la CI.**

	Hipercolesterolemia		Hipertensión		Diabetes		Hábito de fumar	
	C	CI	C	CI	C	CI	C	CI
H	46 (41,1)	63 (43,8)	51 (40,8)	75 (43,9)	29 (38,7)	47 (45,6)	28 (45,9)	42 (43,8)
U	19 (17,0)	21(14,6)	19 (15,2)	25 (14,6)	12 (16,0)	15 (14,6)	12 (19,7)	17 (17,7)
J	14 (12,5)	15 (10,4)	17 (13,6)	17 (9,9)	10 (13,3)	11 (10,7)	6 (9,8)	10 (10,4)
T	12 (10,7)	16 (11,1)	16 (12,8)	21 (12,3)	9 (12,0)	11 (10,7)	5 (8,2)	9 (9,4)
K	2 (1,8)	4 (2,8)	2 (1,6)	6 (3,5)	5 (6,7)	5 (4,9)	4 (6,6)	7 (7,3)
W	1 (0,9)	4 (2,8)	1 (0,8)	4 (2,3)	1 (1,3)	1 (1,0)	1 (1,6)	3 (3,1)
V	2 (1,8)	5 (3,5)	3 (2,4)	7 (4,1)	2 (2,7)	2 (1,9)	2 (3,3)	2 (2,1)
I	3 (2,7)	3 (2,1)	3 (2,4)	4 (2,3)	0 (0,0)	3 (2,9)	0 (0,0)	1 (1,0)
X	5 (4,5)	6 (4,2)	4 (3,2)	6 (3,5)	2 (2,7)	3 (2,9)	1 (1,6)	1 (1,0)
HV	3 (2,7)	1 (0,7)	4 (3,2)	2 (1,2)	4 (5,3)	2 (1,9)	0 (0,0)	2 (2,1)
Otros	5 (4,5)	6 (4,2)	5 (4,0)	4 (2,3)	1 (1,3)	4 (3,9)	2 (3,3)	2 (2,1)
<b>Total</b>	112	144	125	171	75	104	61	96

C. Controles. CI. Pacientes con cardiopatía isquémica. No se encontraron diferencias significativas entre la distribución de los diferentes haplogrupos en ninguno de los factores de riesgo clásicos para el desarrollo de la CI analizados en este estudio.

**Tabla 10. Análisis multivariante de los grupos de estudio.**

	B	EEM	OR [95% IC]	p-valor
Hipercolesterolemia	0,458	0,170	1,58 [1,13-2,20]	<b>0,023</b>
Hipertensión	0,696	0,163	2,01 [1,46-2,76]	<b>0,000</b>
Diabetes	0,456	0,187	1,58 [1,09-2,28]	<b>0,011</b>
Hábito de fumar	0,864	0,191	2,37 [1,63-3,45]	<b>0,000</b>
Haplogrupo H	-	-	1	-
Haplogrupo U	-0,305	0,214	0,74 [0,48-1,12]	0,155
Haplogrupo J	-1,259	0,310	0,28 [0,15-0,52]	<b>0,000</b>
Haplogrupo T	-0,298	0,253	0,74 [0,45-1,22]	0,239
Haplogrupo K	-0,292	0,330	0,75 [0,39-1,42]	0,376
OTROS	-0,519	0,241	0,59 [0,37-0,95]	<b>0,031</b>

B. Coeficiente de regresión. EEM. Error estándar de la media. OR. Odds Ratio. 95% IC. Intervalos de confianza. Diferencias significativas (p-valor< 0,05) se indican en negrita.

## 5. Análisis de la frecuencia de SNPs

En la Tabla 11 se muestra el análisis de la población en estudio para los SNPs que definen a los haplogrupos mitocondriales europeos. La frecuencia del alelo C en las posiciones 7028 y 14766 fue significativamente más elevada en pacientes con CI (OR=1,50, IC=[1,13-2,00], p-valor<0,05 y OR=1,57, IC=[1,13-2,08], p-valor<0,05, respectivamente). El cambio nucleotídico en el locus 7028 provoca un cambio aminoacídico sinónimo, es decir, el ARNm se sigue traduciendo en el mismo aminoácido. Sin embargo, el cambio nucleotídico en el locus 14766 provoca un cambio aminoacídico no sinónimo en el citocromo b, el aminoácido treonina es sustituido por isoleucina en la posición 7 de la proteína (p.Thr7Ile). Por otra parte, los alelos m.10398G y m.4216C se detectaron como factores de protección frente a la CI (OR=0,61, IC=[0,41-0,91], p-valor<0,05 y OR=0,69, IC=[0,48-0,99], p-valor<0,05, respectivamente). El SNP m. 10398A>G causa un cambio aminoacídico no sinónimo en la subunidad 3 de la NADH deshidrogenasa, el aminoácido treonina es sustituido por isoleucina en la posición 114 de la proteína. Esta sustitución se observa en los haplogrupos K, J e I. El SNP m.4216T>C es específico del cluster JT, y produce un cambio aminoacídico no sinónimo en la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa, en este caso el aminoácido tirosina es sustituido por una histidina en la posición 304 de esta proteína (P.Tyr304His).

**Tabla 11. Polimorfismos analizados en cada posición nucleotídica siguiendo la secuencia de referencia de Cambridge.**

Posición nt	Locus	Cambio nt	Cambio aa	Nº de individuos (%)		OR [95% CI]	p-valor
				C	CI		
7028	Citocromo c oxidasa subunidad 1	C>T	Sinónimo	169 (40,0)	179 (50,0)	1,50 [1,13-2,00]	<b>0,005</b>
14766	Citocromo b	C>T	p.Thr7Ile	182 (43,0)	194 (54,2)	1,57 [1,18-2,08]	<b>0,002</b>
10398	NADH deshidrogenasa subunidad 3	A>G	p.Thr114Ala	81 (19,8)	46 (13,1)	0,61 [0,41-0,91]	<b>0,015</b>
4580	NADH deshidrogenasa subunidad 2	G>A	Sinónimo	13 (3,1)	10 (2,8)	0,91 [0,39-2,10]	0,818
12308	ARNt leucina 2	A>G	Sinónimo	101 (23,9)	77 (21,5)	0,88 [0,63-1,23]	0,432
4216	NADH deshidrogenasa subunidad 1	T>C	p.Tyr304His	94 (22,2)	59 (16,5)	0,69 [0,48-0,99]	<b>0,044</b>
10029	ARNt glicina	A>G	Sinónimo	12 (2,9)	6 (1,7)	0,58 [0,22-1,56]	0,273
14470	NADH deshidrogenasa subunidad 6	T>C	Sinónimo	15 (3,7)	8 (2,3)	0,62 [0,26-1,48]	0,271
8994	ATP sintasa F0 subunidad 6	G>A	Sinónimo	6 (1,5)	6 (1,7)	1,18 [0,38-3,68]	0,778

OR. Odds Ratio. 95%IC. Intervalo de confianza al 95%. Posición nt. Posición nucleotídica. Cambio nt. Cambio nucleotídico. Cambio aa. Cambio aminoacídico. C. Controles. CI. Pacientes con cardiomiopatía isquémica. Las diferencias significativas (p-valor<0,05) se indican en negrita.

## **ANÁLISIS DEL PROTEOMA MITOCONDRIAL DE CORAZONES CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA**

### **A. PUESTA A PUNTO DEL MODELO ANIMAL**

La puesta a punto del modelo quirúrgico de I/R en un modelo porcino había sido realizada previamente a la realización de este estudio. En dicho estudio se comprobó la viabilidad del modelo utilizando 56 cerdos sometidos a I/R para un proyecto previo<sup>168</sup>. La mortalidad asociada al procedimiento quirúrgico o tras las 24 horas de post-operatorio fue del 23,2%. Sin embargo, la mortalidad de los animales solo se elevó un 7,1% 30 días tras la operación. Por tanto, en la etapa operatoria y post-operatoria se produjo la mayor tasa de mortalidad y, una vez superada, el animal consiguió estabilizarse y sobrevivir hasta formar un tejido crónico de cicatrización. Estas observaciones apoyan la equiparación de este modelo con la situación que se produce en pacientes sometidos a reperfusión tras dos horas de isquemia<sup>229</sup> puesto que un mes más tarde se diagnosticó a los animales infarto de miocardio con presencia de tejido de cicatrización y afectación de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

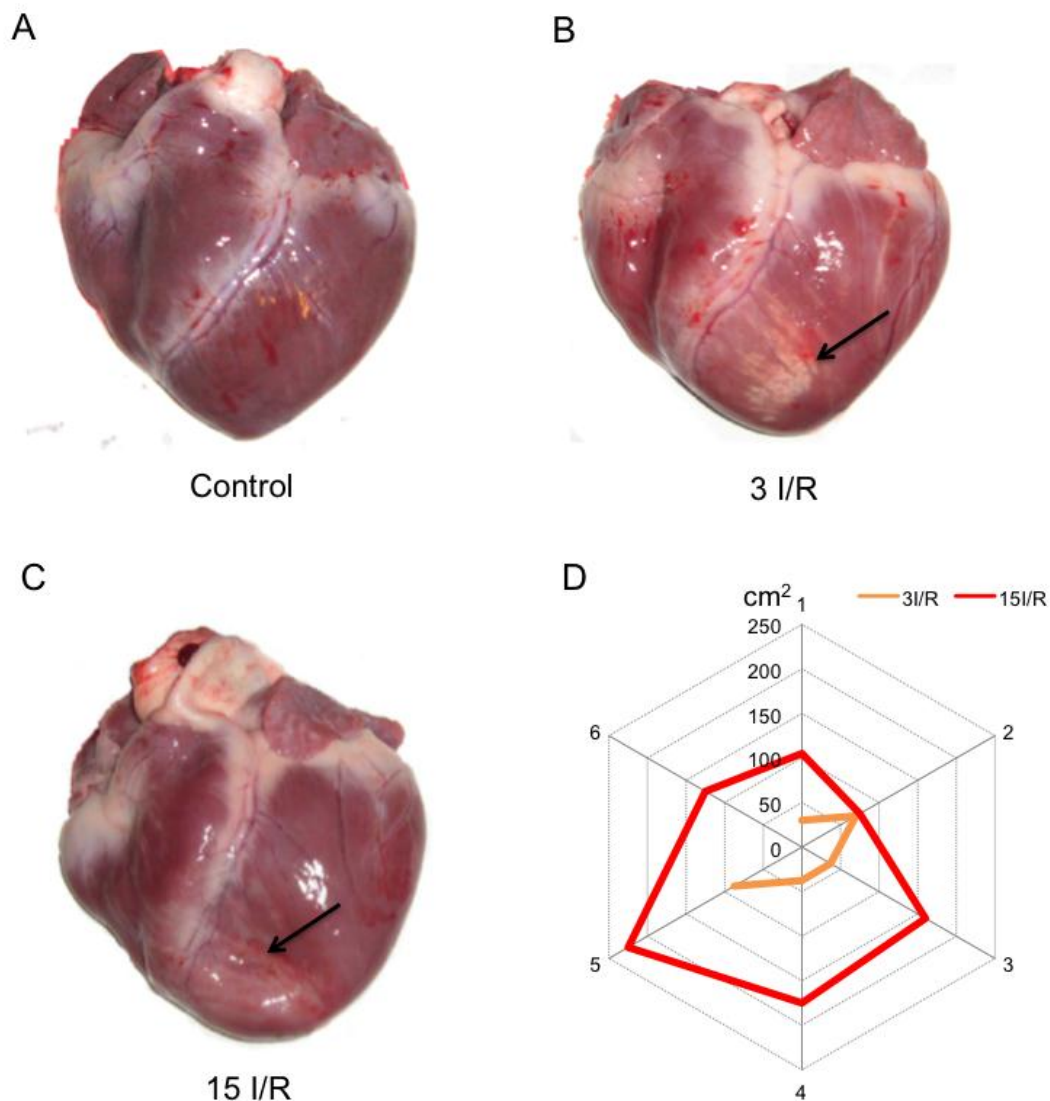
### **B. EVALUACIÓN DEL MODELO ANIMAL**

Se emplearon en total diecisiete cerdos divididos en 3 grupos experimentales, dos de los grupos estaban formados por cerdos sometidos a I/R mediante oclusión de la arteria coronaria descendente anterior y sacrificados 3 días (3 I/R, n=5) o 15 días (15 I/R, n=6) después del procedimiento. Además, un grupo de cerdos sanos, sacrificado sin ningún procedimiento adicional, se utilizó como grupo control (n=6). Todos los animales presentaban características similares en cuanto a peso total, tamaño y peso del corazón tras el sacrificio. Todas las características acerca de los animales que formaron parte del estudio se recogen en la Tabla suplementaria III (Anexo). Para realizar el análisis proteómico se tomó tejido cardíaco del VI próximo a la zona de infarto donde se realizó la oclusión de la arteria coronaria. De los animales del grupo control se tomaron muestras de regiones anatómicamente equivalentes.



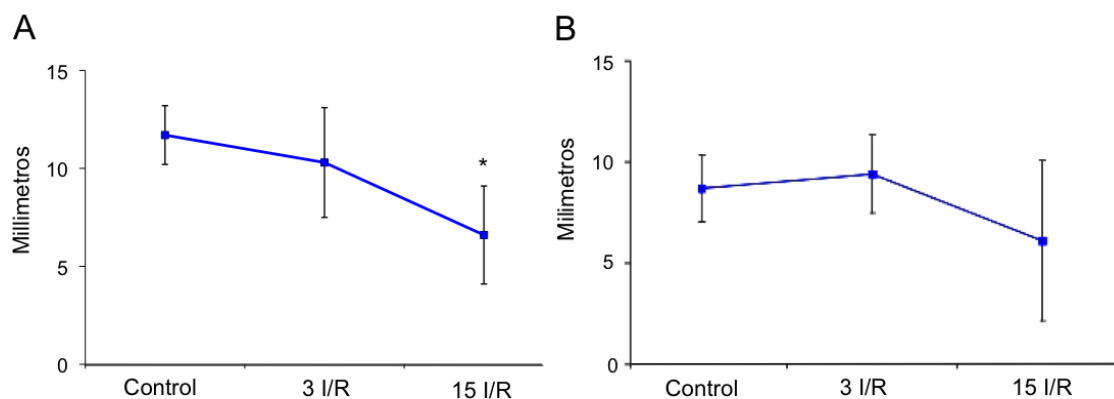
### 1. Análisis morfométrico

Cuando se realizó el análisis *de visu* de los corazones extraídos una vez sacrificados los animales, la región infartada se observó incluso 3 días tras el proceso de I/R. La región afectada, se situó en el VI cerca de la arteria coronaria descendente anterior, inmediatamente superior al ápex (Figuras 23.A, 23.B, 23.C). En la Figura 23.D se representan el área de infarto de cada uno de los corazones en los 3 grupos de estudio. En resumen, el área media de extensión del infarto 3 días tras la I/R fue de  $525,0 \pm 249,4 \text{ mm}^2$  y de  $1068,9 \pm 706,5 \text{ mm}^2$  15 días más tarde.



**Figura 23. Imagen representativa de corazones porcinos en diferentes etapas post-isquémicas. A)** Corazón sano. **B)** Tras 3 días, la región de infarto aparece como un tejido indicativo de procesos de necrosis celular. **C)** Tras 15 días, la zona afectada pierde su grosor y su robustez, apareciendo como una porción hundida del miocardio. **D)** Grafico radial en el que se representa el área infartada para cada una de las muestras. La región infartada se indica con una flecha.

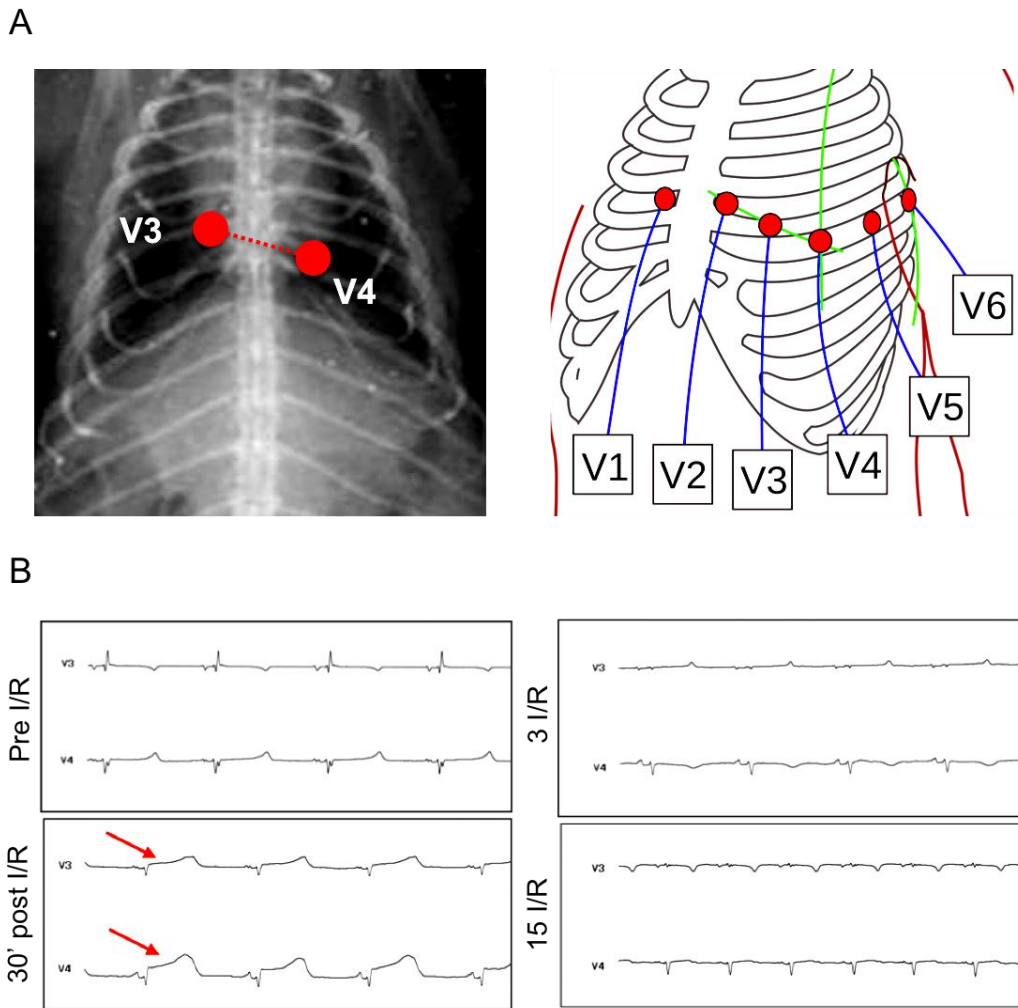
El grosor medio de la pared del VI no disminuyó significativamente 3 días tras el proceso de I/R. Sin embargo, la pared del ventrículo adelgazó significativamente 15 días tras la I/R cuando se la comparaba con los sujetos control o con el grupo de 3 días (Figura 24.A). Al mismo tiempo, se observó una ligera inflamación e incremento del tamaño del septo intraventricular 3 días tras la I/R. La inflamación del septo interventricular fue seguida de una disminución del grosor del mismo (Figura 24.B).



**Figura 24. Grosor medio del tejido cardíaco afectado.** Se midió el grosor de la pared ventricular afectada 3 (n=5) o 15 (n=6) días tras la I/R. **A.** Grosor medio de la pared ventricular izquierda. El adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo frente a los animales control (n=6) fue significativo a partir de los 15 días. **B.** Grosor medio del septo intraventricular. No existen diferencias significativas entre el grosor medio del septo intraventricular. Sin embargo se observó una ligera inflamación 3 días tras la isquemia seguida de un posterior adelgazamiento de la misma a los 15 días. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística ( $p < 0,05$ ) frente al control sano basada en un test-t.

## 2. Electrocardiogramas

Una vez anestesiado, a cada animal se le realizaron dos electrocardiogramas, uno antes de someterlo al proceso de I/R y otro 30 minutos tras la reperusión. Además, se le realizó un electrocardiograma en el momento previo al sacrificio (Figura 25.A). Los ECG obtenidos 30 minutos tras la inducción del infarto mostraron en todos los casos el perfil típico de corriente de lesión miocárdica, con elevación del segmento ST en las derivaciones que monitorizan la zona afectada, en este caso aquella situada alrededor de la arteria descendente anterior (derivaciones V3 y V4). Asimismo, transcurrida la fase aguda, tanto a los 3 como a los 15 días tras la I/R, los ECGs evidenciaron una pérdida de transmisión de voltaje establecida en la zona anterior del ventrículo izquierdo. En este caso se observó la pérdida de voltaje como un aumento en las ondas R en las derivaciones precordiales que monitorizan la cara anterior (Figura 25.B), hallazgo consistente con un infarto establecido en dicha región.

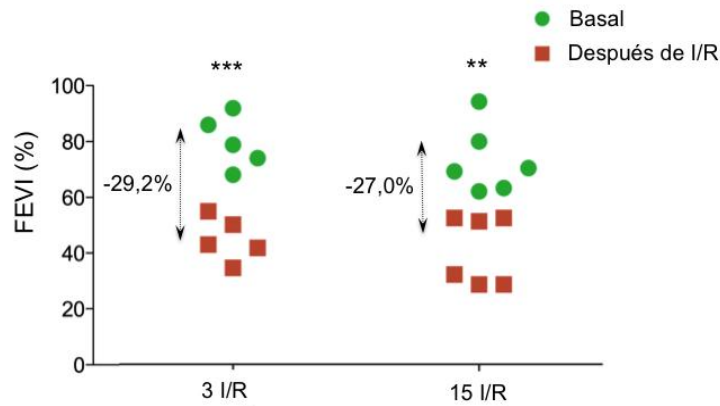


**Figura 25. Electrocardiogramas.** **A.** Figura representativa de la colocación de los electrodos para monitorizar las desviaciones V3 y V4 sobre una ecografía del torso del cerdo. **B.** Electrocardiogramas representativos de las fases de desarrollo del infarto: Pre I/R (ECG tomado previo a la inducción de isquemia), 30' post I/R (ECG tomado 30 minutos tras la reperusión), 3 I/R (ECG tras 3 días de progresión de infarto) y 15 I/R (ECG tras 15 días de progresión de infarto).

### 3. Diferencias en la fracción de eyección media a 0, 3 y 15 días post I/R

La función cardíaca se comprobó previamente a la cirugía y en el momento del sacrificio del animal mediante técnicas ecocardiográficas (CD suplementario). Antes del procedimiento, a nivel basal, la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) fue superior al 60% en todos animales. Sin embargo, la fracción de eyección se redujo significativamente en un 29,2% y un 27,0%, 3 y 15 días tras el procedimiento de I/R, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en el descenso de la fracción de eyección de los 3 a los 15 días tras la isquemia (Figura 26). Por tanto, la fracción de eyección es una variable que se encuentra afectada en los primeros días

tras la isquemia, y que pese al incremento de la región fibrosa de tejido, mantiene el mismo valor en un período más prolongado en el tiempo.



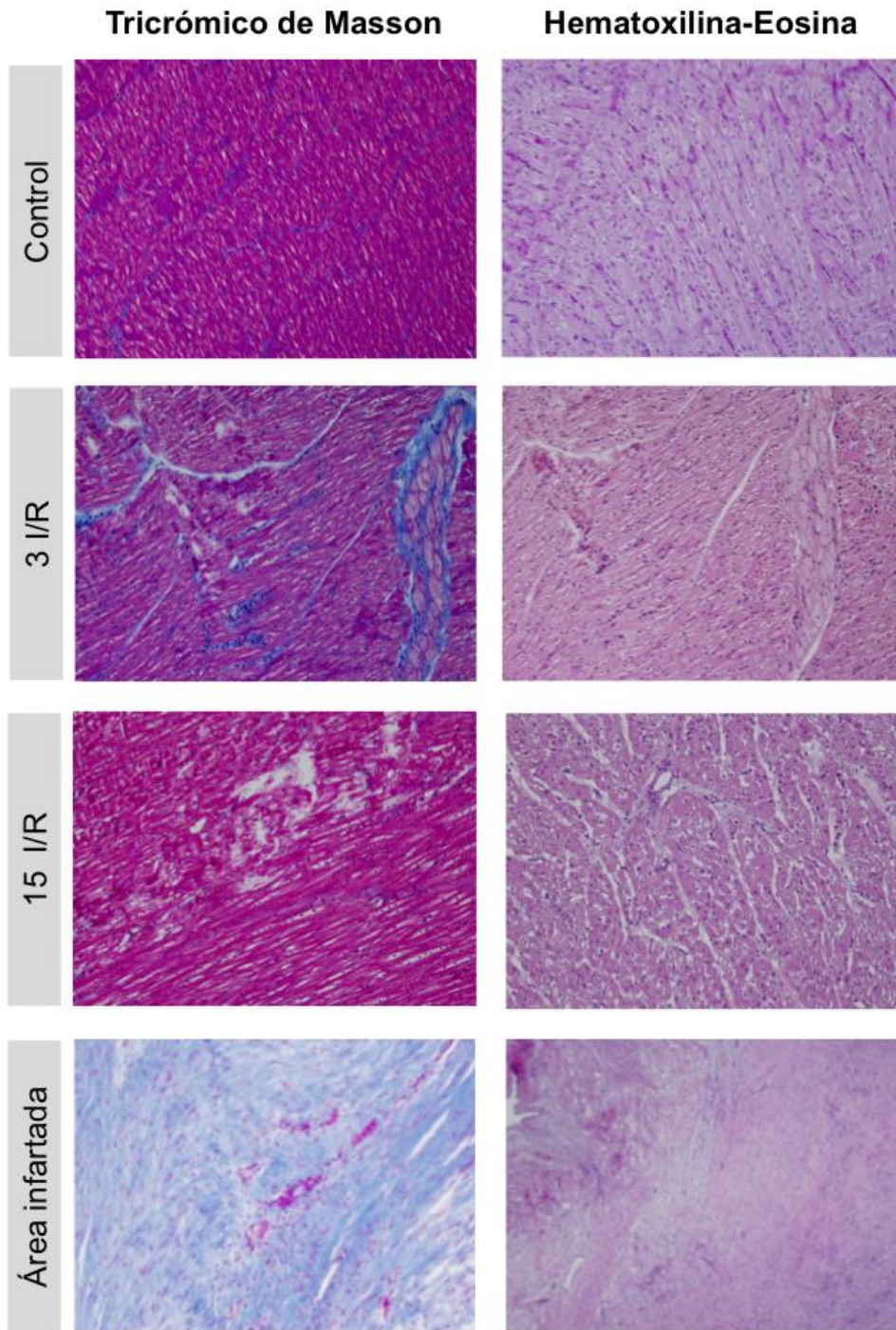
**Figura 26. Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.** Tras la inducción de I/R, la FEVI se redujo significativamente a los 3 y 15 días cuando se compararon con sus niveles basales respectivos (\*\*denota  $p$ -valor $<0,005$  y \*\*\* denota  $p$ -valor $<0,001$ , para un test-t pareado).

#### 4. Análisis histomorfológico del tejido miocárdico

Se realizó el análisis histomorfológico del tejido miocárdico basándose en las tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson sobre las secciones del tejido conservado en parafina. Ambas tinciones permitieron visualizar la presencia de fibrosis y de infiltrados en las muestras conservadas en parafina de los diferentes grupos experimentales. Las secciones de tejido analizadas correspondieron a la región correspondiente a la zona infartada y a la región del VI situada aproximadamente a 1 cm de la zona infartada. La visualización previa del tejido sometido a estas tinciones fue importante para efectuar con eficiencia el aislamiento de mitocondrias de la zona próxima al infarto, puesto que si el tejido estuviera necrótico, carente de células viables, no sería posible su extracción a partir de él. Además, nos permitió visualizar que existía una homogeneidad entre todas las muestras analizadas de un mismo grupo.

La zona infartada presentó una fibrosis clara del tejido, sin presencia de células musculares ni infiltrados, con un aspecto blanquecino propio de tejidos conectivos. Sin embargo, en la muestra de tejido próxima a la zona de infarto no se observó presencia de tejido de cicatrización tanto a los 3 como a los 15 días tras la I/R. El estado de tejido a 1 cm del área de infarto no presentó infiltrados sanguíneos y fueron muy escasos 15 días tras la I/R (Figura 2).



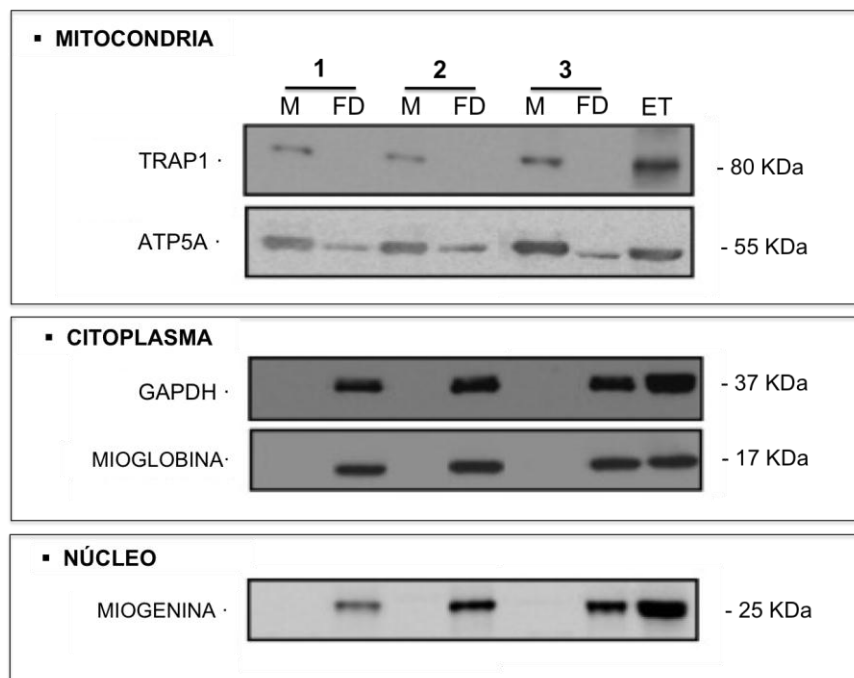


**Figura 27. Análisis histomorfológico de los diferentes grupos experimentales.** No se observaron infiltrados sanguíneos 3 y 15 días post I/R en la zona situada a 1 cm de la infartada. Sin embargo, el área infartada presentó fibrosis de tejido y ausencia de cardiomiocitos 15 días tras la I/R.

### C. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS Y ANÁLISIS LC-MS/MS

#### 1. Eficacia del aislamiento de mitocondrias a partir de tejido cardíaco

Se realizaron diferentes ensayos del método de extracción de mitocondrias a partir de tejido cardíaco hasta optimizar el protocolo. En la Figura 28 se observa la extracción realizada sobre 3 muestras procedentes de VI de tejido cardíaco sano. Para comprobar la eficacia del método de extracción, además de la fracción mitocondrial (M), se recogió el lisado tisular inicial (extracto total, ET) y la fracción descartada (FD) para cada una de las muestras y se analizaron mediante western blot utilizando una misma membrana. Los resultados indicaron diferencias en la detección de las proteínas empleadas como marcadores mitocondriales, citoplasmáticos y nucleares. En la fracción mitocondrial se detectó una mayor presencia de TRAP1 y ATP5A, así como la ausencia de marcadores citoplasmáticos (GAPDH o mioglobina) o nucleares (miogenina). Por el contrario, en la fracción descartada durante el proceso de aislamiento mitocondrial, que incluiría el resto de proteínas citoplasmáticas y procedentes de otros orgánulos, se detectaron GAPDH, mioglobina y miogenina. Estos resultados sugieren una escasa rotura mitocondrial y por tanto, una buena eficiencia de extracción.



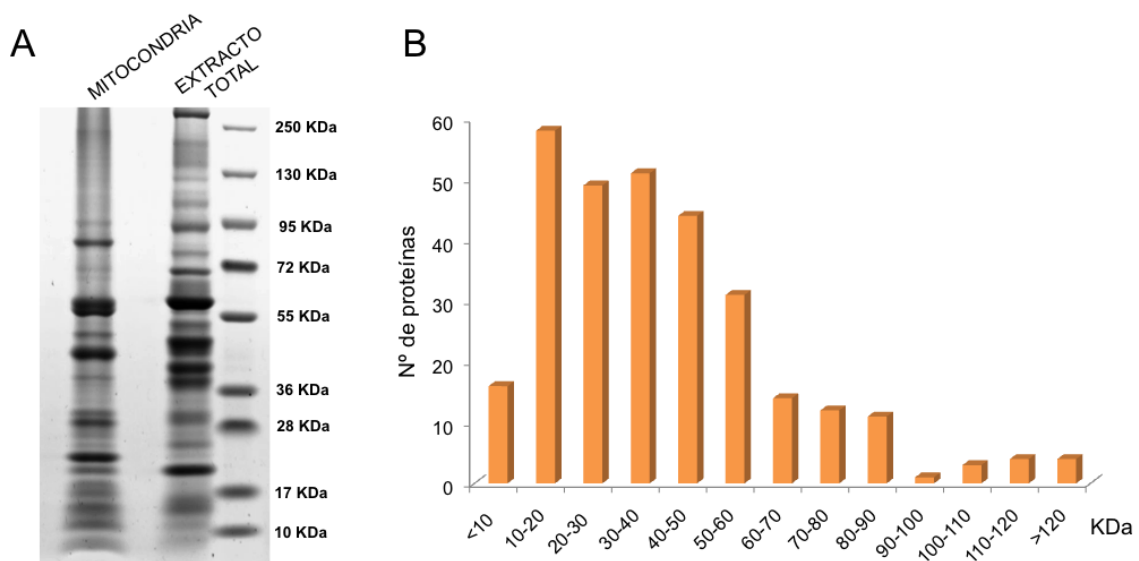
**Figura 28. Western blot de los diferentes extractos proteicos obtenidos durante el aislamiento mitocondrial.** Los números denotan las tres muestras de tejido miocárdico porcino sano empleadas para verificar la eficacia de la extracción. M. Fracción mitocondrial

obtenida. FD. Fracción descartada durante el proceso de extracción. ET. Extracto total de lisado celular.

## 2. Identificación de proteínas mitocondriales

Una vez optimizado el protocolo de aislamiento mitocondrial, se procedió a extraer las mitocondrias de la zona de VI próxima al área infartada. Tras obtener las mitocondrias procedentes de los diferentes grupos experimentales (Control, 3 I/R y 15 I/R) estas se lisaron y los extractos proteicos mitocondriales se redujeron y separaron mediante electroforesis en geles Tris-Bis. Tras teñir los geles y escindir las bandas, estas fueron digeridas y analizadas mediante HPLC y espectrometría de masas en tándem.

Se identificaron un total de 298 proteínas mitocondriales con una probabilidad superior al 99% con al menos dos péptidos independientes. De acuerdo con el patrón de bandas observado visualmente cuando se comparaba el extracto mitocondrial y el total (Figura 29.A), el 83,6% de las proteínas identificadas tenían un peso molecular inferior a 60 KDa (Figura 29.B).



**Figura 29. Distribución de las proteínas por peso molecular. A.** Gel en gradiente Nu-PAGE en el que se corrieron 35µg de extracto total, correspondiente al lisado total del tejido, y 35 µg de proteínas mitocondriales. **B.** Distribución de las proteínas mitocondriales identificadas según el peso molecular empleando incrementos de 10 KDa.

Todas las identificaciones de péptidos asignados a proteínas mitocondriales aparecen detalladas en el Archivo suplementario I (CD adjunto). De las proteínas identificadas, 70 estaban diferencialmente expresadas al menos en uno de los grupos cuando se comparaba el conteo de espectros normalizado empleando un test ANOVA

con la corrección de Dunnet. Las proteínas encontradas diferencialmente expresadas se resumen en la Tabla 12.



**Tabla 12. Proteínas mitocondriales diferencialmente expresadas tras el proceso de isquemia y reperfusión.**

Nombre de la proteína	Código Uniprot	Valor cuantitativo			3 I/R vs Controles		15 I/R vs Controles	
		Controles	3 I/R	15 I/R	Ratio de cambio	Dunnet ANOVA	Ratio de cambio	Dunnet ANOVA
10 kDa heat shock protein	CH10_HUMAN	18,8±3,5	28,9±4,9	20,0±7,6	1,5	0,0193	1,1	0,9115
28S ribosomal protein S23	RT23_HUMAN	2,4±0,4	4,3±0,9	1,8±0,7	1,8	0,0006	0,8	0,2518
28S ribosomal protein S28	RT28_HUMAN	4,0±2,2	2,9±1,7	1,6±0,7	0,7	0,4958	0,4	0,0427
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3HIDH_HUMAN	6,2±1,3	9,1±2,1	5,1±2,1	1,5	0,0426	0,8	0,5294
39S ribosomal protein L11	RM11_HUMAN	1,0±0,0	3,0±1,4	1,0±0,0	3,0	0,0011	1,0	0,9997
39S ribosomal protein L16	RM16_HUMAN	1,4±0,4	1,0±0,0	1,0±0,0	0,7	0,0468	0,7	0,0354
39S ribosomal protein L22	RM22_HUMAN	1,4±0,4	1,0±0,0	1,0±0,0	0,7	0,0463	0,7	0,0367
39S ribosomal protein L49	RM49_HUMAN	1,5±0,7	3,5±1,7	2,2±1,0	2,3	0,0203	1,5	0,5316
60 kDa heat shock protein	CH60_HUMAN	91,1±15,5	138,9±7,5	94,8±19,5	1,5	0,0003	1,0	0,8884
Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like	ACS2L_HUMAN	1,2±0,3	2,6±1,0	1,2±0,4	2,2	0,0057	1,0	0,9830
Acyl carrier protein	ACPM_HUMAN	3,6±1,4	3,5±0,9	5,9±1,9	1,0	0,9885	1,6	0,0368
ADP/ATP translocase 3	ADT3_HUMAN	78,0±9,5	96,3±13,3	76,3±11,6	1,2	0,0344	1,0	0,9528
Aspartate aminotransferase	AATM_PIG	113,1±19,2	157,9±25,8	127,5±12,4	1,4	0,0036	1,1	0,3580
ATP synthase subunit a	ATP6_PIG	5,3±3,3	10,6±2,8	12,2±1,7	2,0	0,0102	2,3	0,0011
ATP synthase subunit alpha	ATPA_HUMAN	911,3±231,8	1187,1±114,7	1001,6±161,3	1,3	0,0433	1,1	0,6030
ATP synthase subunit e	ATP5I_PIG	66,1±30,3	157,0±35,7	116,1±44,9	2,4	0,0025	1,8	0,0665
BAG family molecular chaperone regulator 2	BAG2_HUMAN	1,3±0,7	1,9±0,9	3,7±1,4	1,5	0,5405	2,8	0,0022
Brain protein 44	BR44_HUMAN	13,0±2,9	21,8±6,5	19,6±7,1	1,7	0,0419	1,5	0,1145
Brain protein 44-like protein	BR44L_HUMAN	11,7±4,2	19,7±4,4	15,1±3,2	1,7	0,0093	1,3	0,2686
Carnitine O-acetyltransferase	CACP_HUMAN	21,2±5,2	28,5±5,1	18,1±2,6	1,3	0,0301	0,9	0,4022
CDGSH iron sulfur domain-containing protein 3	CISD3_HUMAN	12,2±3,0	8,8±2,3	6,4±2,7	0,7	0,0985	0,5	0,0045
Chloride intracellular channel protein 4	CLIC4_HUMAN	1,4±0,4	5,0±2,5	2,7±2,1	3,6	0,0116	1,9	0,4041
Citrate synthase	CISY_PIG	58,6±12,1	78,9±8,0	70,7±6,7	1,3	0,0054	1,2	0,0732
Cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	MMAB_HUMAN	3,1±1,5	1,0±0,0	1,3±0,5	0,3	0,0037	0,4	0,0088
Cytochrome b-c1 complex subunit 2	QCR2_HUMAN	46,2±2,7	53,0±9,3	58,8±5,7	1,1	0,1665	1,3	0,0067
Cytochrome c oxidase subunit 2	COX2_PIG	22,4±5,3	35,5±7,3	28,1±9,1	1,6	0,0217	1,3	0,3473
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	COX41_PIG	36,6±9,4	52,9±8,3	36,0±13,3	1,4	0,0454	1,0	0,9930

Cytochrome c oxidase subunit 6C	COX6C_HUMAN	12,2±1,7	10,1±1,5	8,2±3,3	0,8	0,2886	0,7	0,0212
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	BDH_HUMAN	23,7±6,8	21,5±2,4	15,7±3,3	0,9	0,6645	0,7	0,0194
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	AL4A1_HUMAN	6,3±5,9	14,9±3,2	6,3±3,5	2,4	0,0121	1,0	1,0000
Dihydrodipicolinate synthase-like	DAPAL_HUMAN	1,1±0,2	3,3±0,8	1,2±0,5	3,0	0,0000	1,1	0,8799
Dynammin-1-like protein	DNM1L_HUMAN	1,5±0,5	2,5±0,9	1,3±0,4	1,7	0,0418	0,9	0,8091
Electron transfer flavoprotein subunit alpha	ETFA_HUMAN	34,8±4,4	49,2±6,6	33,1±4,0	1,4	0,0006	1,0	0,7832
Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB_PIG	57,1±8,4	76,6±8,2	50,3±6,6	1,3	0,0019	0,9	0,2518
Fumarate hydratase	FUMH_PIG	48,5±10,2	83,8±11,4	61,8±8,2	1,7	0,0001	1,3	0,0641
Fumarate hydratase	FUMH_HUMAN	24,7±26,2	75,0±9,3	57,1±7,1	3,0	0,0005	2,3	0,0099
Glutaredoxin-related protein 5	GLRX5_HUMAN	1,3±0,7	4,1±1,6	2,8±1,5	3,2	0,0059	2,2	0,1191
GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial	KAD3_HUMAN	3,6±1,0	9,0±2,7	6,7±2,1	2,5	0,0010	1,9	0,0349
HCLS1-associated protein X-1	HAX1_HUMAN	1,0±0,0	2,5±0,6	1,4±0,6	2,5	0,0003	1,4	0,3707
Heat shock protein 75 kDa	TRAP1_HUMAN	2,9±0,5	5,5±2,3	4,2±2,1	1,9	0,0490	1,4	0,3331
Hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase	COQ3_HUMAN	8,8±2,9	12,7±1,7	5,7±0,9	1,4	0,0128	0,6	0,0338
Histidine triad nucleotide-binding protein 2	HINT2_HUMAN	2,7±1,6	8,4±5,4	3,5±2,8	3,1	0,0323	1,3	0,9024
Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase	HOT_HUMAN	2,7±1,5	5,0±2,0	1,6±0,5	1,9	0,0277	0,6	0,3906
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	IDH3A_HUMAN	47,3±7,8	65,7±6,3	46,8±8,3	1,4	0,0024	1,0	0,9935
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma	IDH3G_HUMAN	4,5±2,6	10,2±3,0	2,9±1,7	2,3	0,0037	0,6	0,4498
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADL_PIG	67,6±16,5	97,2±10,7	67,8±7,1	1,4	0,0024	1,0	0,9994
Lon protease homolog	LONM_HUMAN	12,0±3,4	15,1±5,0	8,9±2,3	1,3	0,4951	0,7	0,1244
Methylglutaconyl-CoA hydratase	AUHM_HUMAN	2,3±1,0	6,1±1,2	2,9±1,8	2,7	0,0009	1,3	0,7014
Mitochondrial chaperone BCS1	BCS1_HUMAN	2,2±2,1	5,6±2,8	1,7±0,8	2,5	0,0229	0,8	0,8832
Mitochondrial fission 1 protein	FIS1_HUMAN	12,5±3,2	19,4±4,1	13,4±2,6	1,6	0,0079	1,1	0,8723
Mitochondrial import receptor subunit TOM70	TOM70_HUMAN	3,6±1,7	7,7±2,2	3,7±1,0	2,1	0,0022	1,0	0,9875
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	NDUA2_HUMAN	20,6±2,8	26,3±4,6	16,6±2,9	1,3	0,0310	0,8	0,1191
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	NDUA5_HUMAN	9,8±2,5	4,4±0,8	8,1±3,4	0,4	0,0068	0,8	0,4488
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7	NDUS7_HUMAN	23,4±5,8	20,6±2,3	13,3±3,3	0,9	0,4640	0,6	0,0018
NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog	NFU1_HUMAN	1,0±0,0	1,9±1,0	1,0±0,0	1,9	0,0295	1,0	1,0000
Ornithine aminotransferase	OAT_HUMAN	1,1±0,3	2,8±1,2	2,1±0,7	2,5	0,0061	1,9	0,0936
Putative transferase C1orf69	CA069_HUMAN	1,8±0,8	1,2±0,4	1,0±0,0	0,7	0,1409	0,6	0,0416

Pyruvate dehydrogenase protein X component	ODPX_HUMAN	12,1±5,1	25,7±3,8	14,9±4,3	2,1	0,0004	1,2	0,4859
Single-stranded DNA-binding protein	SSB_HUMAN	1,1±0,2	3,9±1,3	4,4±3,1	3,5	0,0602	4,0	0,0228
Stress-70 protein	GRP75_HUMAN	41,2±6,4	57,6±9,9	46,4±10,2	1,4	0,0172	1,1	0,5246
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	SUCB1_PIG	31,1±7,5	29,8±1,8	22,1±6,2	1,0	0,9061	0,7	0,0360
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha	SUCA_PIG	21,6±5,7	29,2±5,7	19,3±1,2	1,4	0,0304	0,9	0,6200
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta	SUCB2_PIG	26,6±6,3	42,8±7,8	17,8±2,6	1,6	0,0008	0,7	0,0373
Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1	SCOT_PIG	39,0±12,2	64,7±13,2	43,1±5,8	1,7	0,0027	1,1	0,7372
Superoxide dismutase [Mn]	SODM_HUMAN	23,3±5,2	36,2±7,0	25,8±2,8	1,6	0,0019	1,1	0,6118
Superoxide dismutase [Mn] (Fragment)	SODM_PIG	27,5±7,9	31,8±6,7	18,3±4,2	1,2	0,4593	0,7	0,0483
Trifunctional enzyme subunit beta	ECHB_HUMAN	55,9±5,7	67,2±5,2	54,0±2,7	1,2	0,0027	1,0	0,7107
Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	COQ6_HUMAN	12,5±4,0	13,5±2,8	7,4±1,6	1,1	0,8190	0,6	0,0186
Ubiquinone biosynthesis protein COQ7 homolog	COQ7_HUMAN	3,1±1,3	6,6±1,7	2,3±1,2	2,1	0,0021	0,7	0,5245
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9	COQ9_HUMAN	17,5±3,1	26,9±3,5	12,6±3,7	1,5	0,0010	0,7	0,0484
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1_PIG	81,1±15,2	152,0±68,0	129,5±24,0	1,9	0,0208	1,6	0,0990

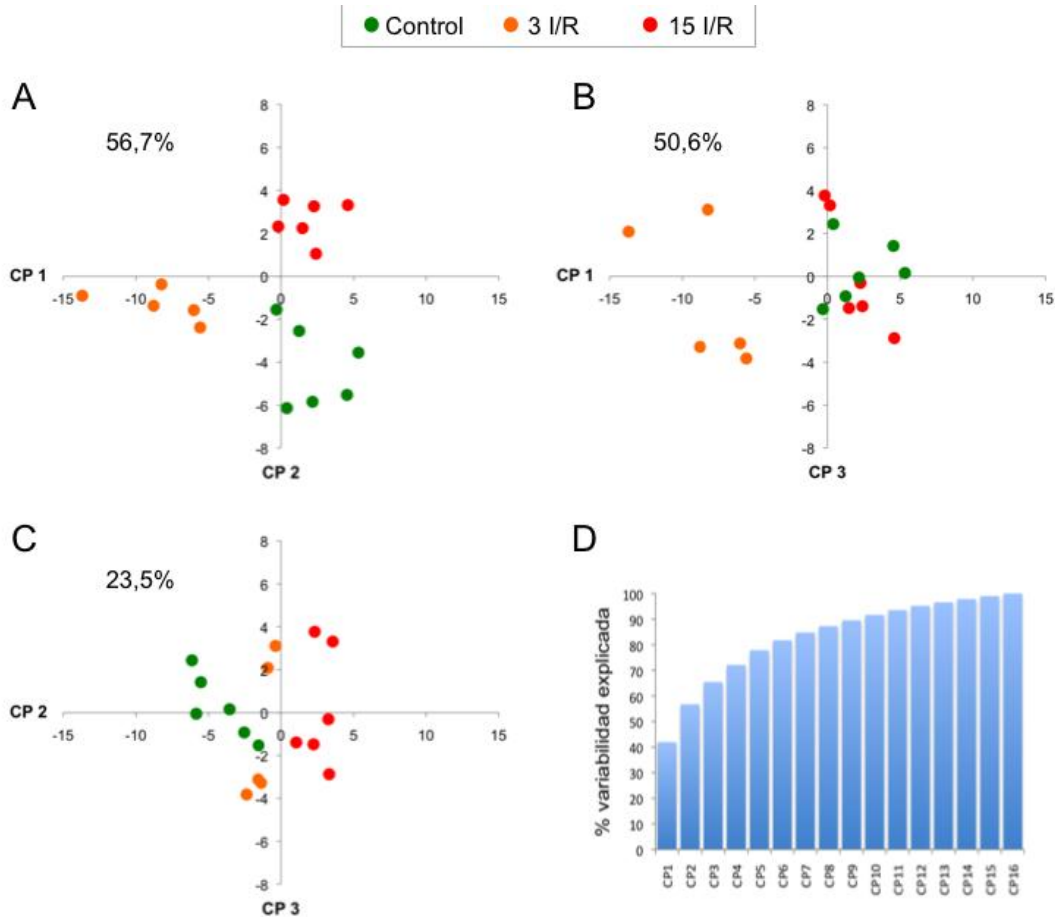
Los valores cuantitativos fueron derivados del número de espectros asignados y ajustados al número total de espectros en cada muestra. Los valores denotan la media ± la desviación estándar.

Los p-valores fueron calculados empleando el test ANOVA de una vía. Se aplicó la corrección de Dunnet para comparar los grupos sometidos a isquemia contra el mismo grupo control.

### 3. Análisis de componentes principales

Con el objetivo de reducir la dimensionalidad del conjunto de datos y ordenar las muestras según la variabilidad existente entre ellas, se realizó el análisis de componentes principales con los valores del contaje de espectros de las proteínas significativamente alteradas en alguno de los grupos de estudio.

Se representaron los valores de cada muestra para el primer componente principal (CP1, eje de abcisas), que explica la mayor parte de la variabilidad inter-muestra, frente a los valores para el segundo componente principal (CP2, eje de ordenadas). Como era de esperar, los dos primeros componentes principales respondían sobre todo a diferencias entre grupos experimentales, produciendo una clara separación entre los tres grupos de estudio (Figura 30.A). Resultó notable la mayor similitud entre los grupos control e 15 I/R, puesto que la separación entre ambos se basó sobre todo en el CP2, que explicó el 14,8% de la variabilidad del modelo (Figura 30.D). La separación del grupo 3 I/R ocurrió en base al CP1 que explicaba un 41,9% de la variabilidad. Así, cuando se representó gráficamente el porcentaje de variabilidad del tercer componente principal (CP3, 8,7%) frente a CP1, los grupos control y 15 I/R aparecieron mezclados (Figura 30.B), indicando que CP3 no explicaba la variabilidad inter-grupal, sino diferencias residuales entre muestras no achacables al tratamiento principal (control, 3 I/R3, 15 I/R). Esto mismo se pudo observar en el gráfico para CP2 y CP3, en donde los grupos experimentales aparecieron nuevamente clasificados solo en base a CP2 (Figura 30.C).

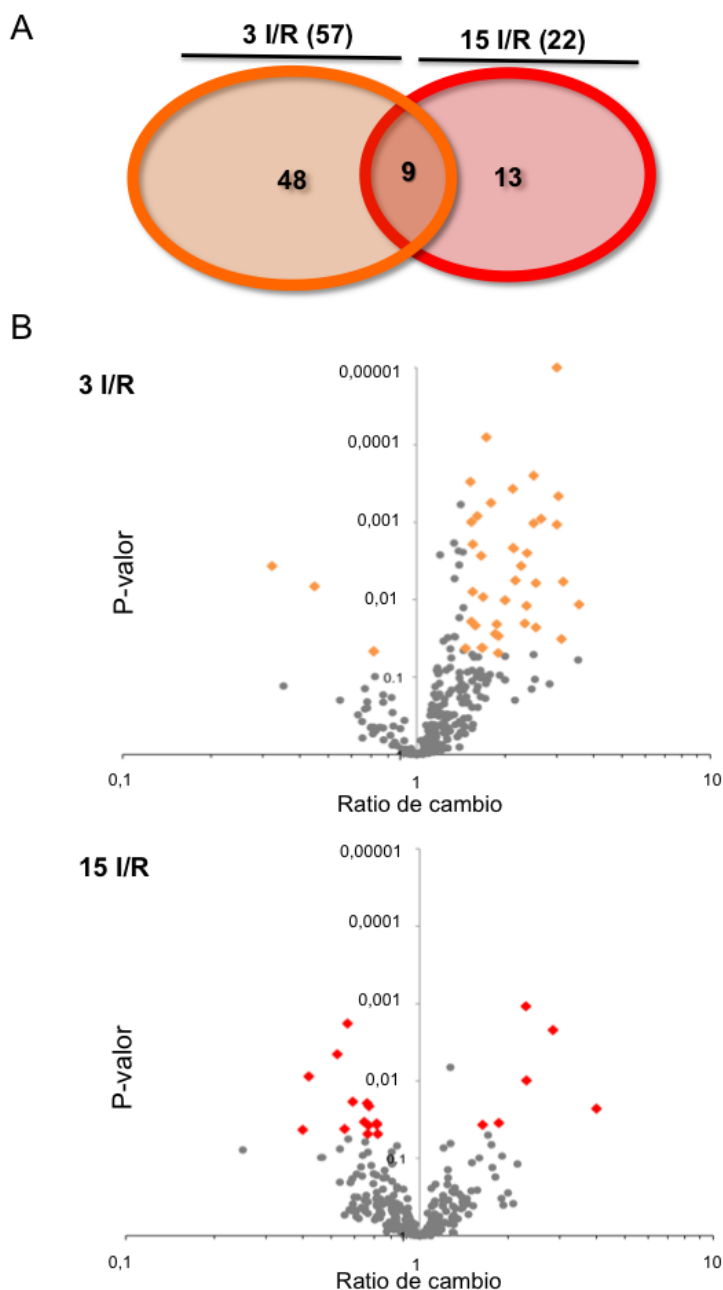


**Figura 30. Análisis de componentes principales.** **A.** Gráfico en el que se representa el porcentaje de variabilidad explicada por el primer componente principal (CP1) frente al segundo (CP2). Se observó una clara separación entre los tres grupos experimentales. **B.** Gráfico en el que se representa el porcentaje de variabilidad explicada por el CP1 frente al tercer componente principal (CP3). Los grupos experimentales 15 I/R y control son más próximos entre sí comparados con el grupo 3 I/R. **C.** Gráfico en el que se representa el porcentaje de variabilidad explicada por el CP2 frente CP3. El 23,5% de la varianza explicada por el CP2 y CP3 no es suficiente para clasificar los 3 grupos experimentales. **D.** Gráfico acumulativo de la variabilidad explicada por cada uno de los componentes principales.

#### 4. Análisis de expresión proteica tras Isquemia/Reperfusión

De las 298 proteínas mitocondriales identificadas, 70 estaban alteradas en alguno de los grupos experimentales. Entre las proteínas diferencialmente expresadas, 57 lo estaban en el grupo 3 I/R y 22 en el grupo de 15 I/R, con 9 proteínas alteradas en ambos grupos (Figura 31.A). Se utilizaron gráficos de dispersión de tipo volcán para visualizar las diferencias en ratio de expresión frente a los p-valores de estas diferencias en los grupos 3 I/R y 15 I/R frente al grupo control (Figura 31.B). Interesantemente, 3 días tras la inducción de I/R se observó una mayor expresión (ratio de cambio  $\geq 1,5$ ) de 36 proteínas mitocondriales. Sin embargo, 15 días tras la I/R la frecuencia de proteínas que incrementaban y disminuían su expresión fue

similar. No sólo las diferencias existentes en las proteínas identificadas diferencialmente expresadas, sino que también su patrón de expresión apuntan hacia la regulación de distintos procesos mitocondriales a 3 y 15 días tras la I/R. Así, al tercer día tras la reperfusión el tejido respondió a la mayor demanda energético del tejido sometido a estrés incrementando el número de proteínas mitocondriales.



**Figura 31. Análisis de proteínas significativas 3 y 15 días tras I/R.** **A.** Diagrama de Venn para la distribución de las proteínas mitocondriales diferencialmente expresadas en cada uno de los grupos. **B.** Gráficos volcán de expresión diferencial de proteínas mitocondriales. Se comparó la expresión individual de las proteínas de las muestras del grupo 3 I/R y 15 I/R contra las del grupo control. Cada punto representa una proteína individual. Las diferencias más importantes ( $P < 0,05$  y ratio de cambio  $\geq 1,5$  o  $0,5 \leq$ ) aparecen marcadas en naranja para el grupo 3 I/R y en rojo para el grupo 15 I/R.

### 5. Procesos mitocondriales implicados 3 y 15 días tras I/R. Mapas térmicos

Las proteínas mitocondriales diferencialmente expresadas se clasificaron de acuerdo al proceso celular en el que se encuentran involucradas. Se observó que las proteínas involucradas en la respuesta a estrés oxidativo presentaban una mayor frecuencia en el grupo de 3 I/R frente al 15 I/R (10,0% versus 5,0%). De modo similar, las proteínas encargadas del transporte de moléculas sólo aparecieron más expresadas 3 días tras la I/R y representaron el 15,0% del total de las proteínas diferencialmente expresadas en este grupo. Por otra parte, las proteínas que forman parte de la CTE constituyeron un 35,0% del total en el grupo 15 I/R frente a un 16,7% en el grupo 3 I/R (Figura 32).

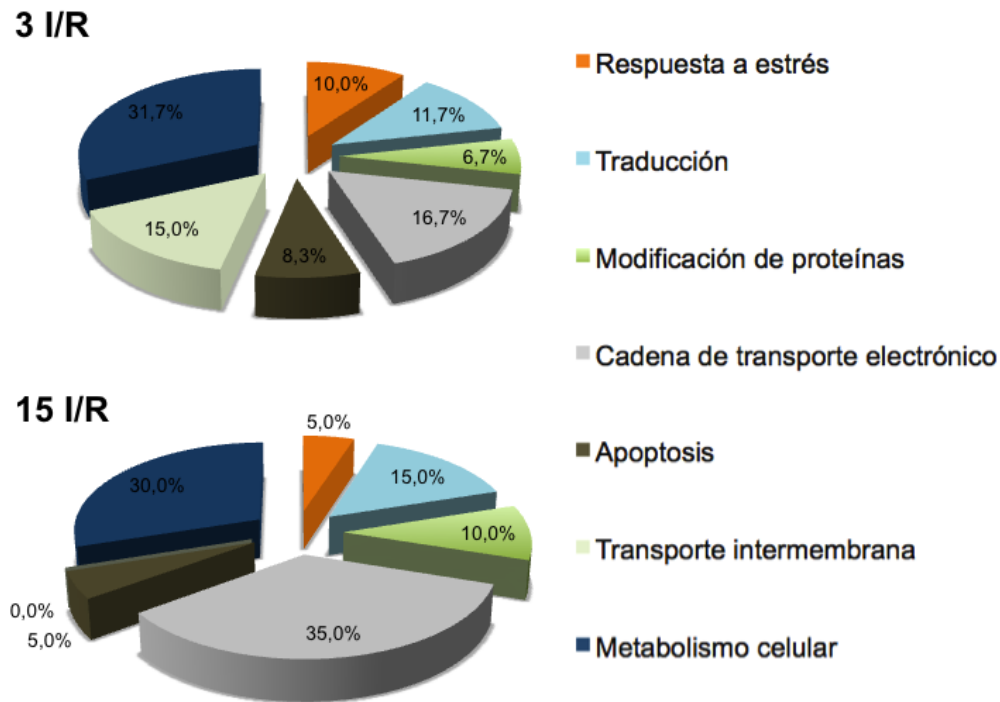


Figura 32. Frecuencia (%) de las funciones mitocondriales de las proteínas identificadas como diferencialmente expresadas 3 y 15 días tras la I/R.

Una vez determinados los procesos en los que estaban involucradas las proteínas que mostraron expresión diferencial entre los diferentes grupos analizados, se construyeron los mapas térmicos para cada proceso celular en base al contaje de espectros normalizado para cada una de las muestras. Los resultados obtenidos (Figura 33) señalan diferencias en la función mitocondrial a diferentes tiempos tras la

isquemia. Así, se observó un incremento en la expresión de proteínas de estrés oxidativo en el grupo 3 I/R (Figura 33.A). Entre ellas se incluyeron proteínas de choque térmico como CH60 (HSP60), GRP75 y TRAP1. A los 3 días tras I/R se observó aumento en la expresión de la superóxido dismutasa mitocondrial o SOD2 y GLRX5. Estas enzimas son responsables de mantener la homeostasis redox en la célula. La SOD2 en particular, cataliza el paso de radical superóxido a peróxido de hidrógeno en la mitocondria siendo clave para la actividad antioxidante de la célula.

La expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis celular también fue elevada 3 días tras la I/R (Figura 33.B). Se observó incremento de proteínas involucradas en la liberación de productos mitocondriales al citosol y consecuente activación de la cascada apóptica. Proteínas implicadas en la fisión mitocondrial como la DNM1L y FIS1 aumentaron su expresión. Del mismo modo, proteínas que participan en la formación del poro de permeabilidad mitocondrial como la ADT3 o VDAC1 se encontraron incrementadas en el grupo 3 I/R. VDAC1 es una proteína de membrana clave en la regulación del volumen mitocondrial y bajo condiciones de estrés oxidativo forma parte del poro de permeabilidad mitocondrial que libera hacia el citosol las moléculas necesarias para iniciar el proceso apoptótico. Interesantemente, la proteína BAG2, inhibidora de la actividad chaperona estaba más ampliamente representada en las muestras de 15 I/R. Esto sugiere que tras un aumento de la expresión de proteínas de choque térmico a los 3 días tras I/R pueda existir un posible mecanismo de regulación más tardío que inhiba la actividad de estas chaperonas.

La expresión de proteínas encargadas del transporte de moléculas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos disminuyó en ambos grupos de I/R, mientras que aquella relacionada con el transporte de piruvato procedente de la glucólisis aumentó (Figura 33.C). Así, proteínas como la carnitina O-acetiltransferasa (CACP) o la aspartato aminotransferasa (AATM), involucradas de forma directa o indirecta respectivamente en la beta oxidación de los ácidos grasos, se expresaron mayoritariamente en tejido cardíaco sano. Del mismo modo se hallaron sobreexpresadas proteínas como las subunidades alfa (ETF $\alpha$ ) y beta (ETF $\beta$ ) de la flavoproteína transportadora de electrones, encargadas de captar electrones de diferentes acyl-CoA deshidrogenasas. Por el contrario, la presencia de BRP44L o BRP44 fue mayor en los grupos de I/R. Ambas proteínas se encargan de transportar el piruvato, producto final de la glucólisis en el citosol, hacia la matriz mitocondrial. La glucólisis presenta un consumo de oxígeno más eficiente que el metabolismo de ácidos grasos, es por ello que en una situación de demanda energética como es



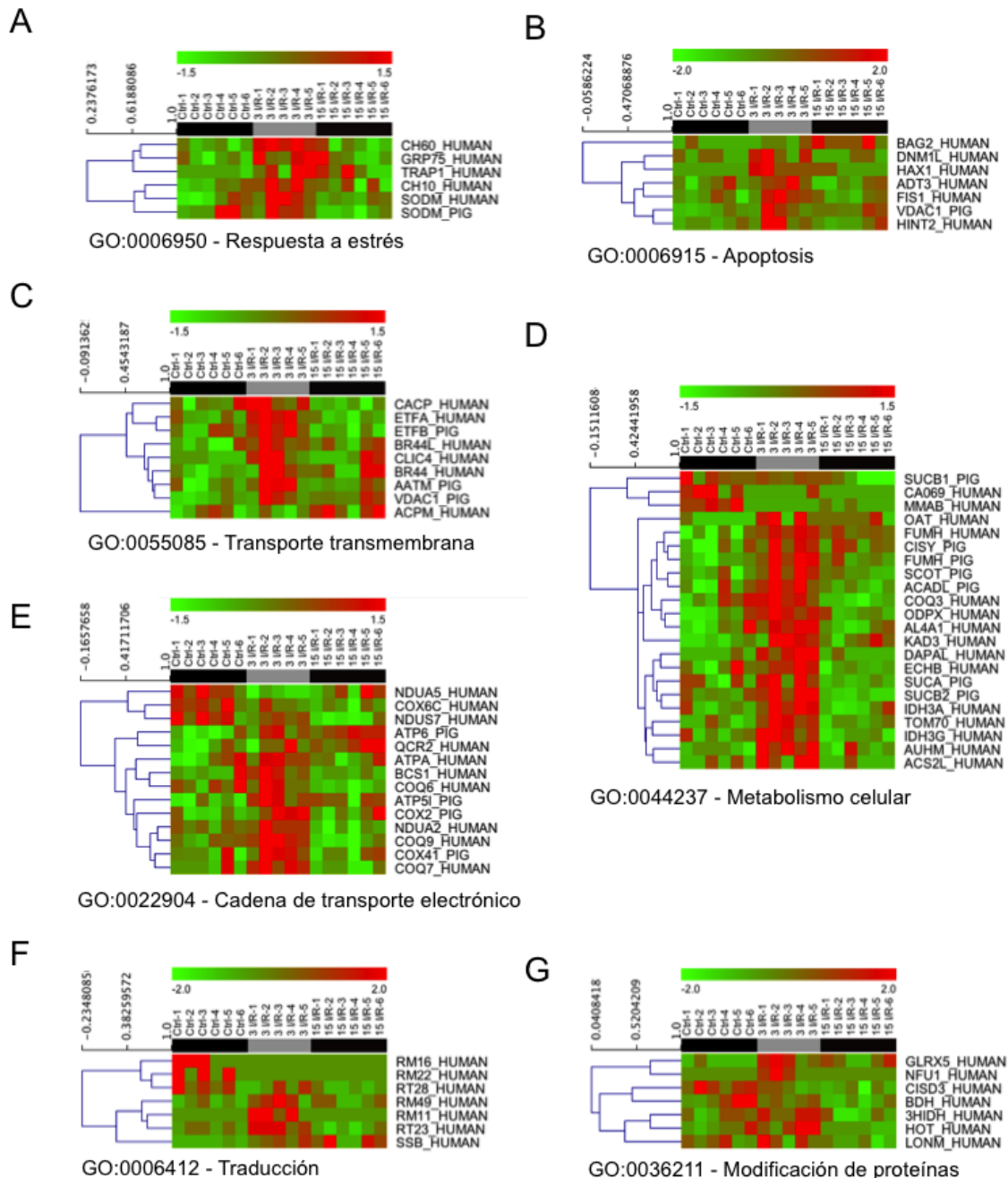
aquella presente en el tejido tras la I/R, la obtención de energía a partir de glucosa aumenta, haciéndolo también la producción de piruvato. Por tanto, estas observaciones indicaron que la expresión de proteínas de transporte en la mitocondria está sujeta a los cambios en las rutas metabólicas que sufre la célula durante el proceso de I/R.

Paralelamente al aumento de las proteínas transportadoras de piruvato 3 días tras I/R, se observó un incremento de proteínas que forman parte ciclo de Krebs (Figura 33.D). Esta ruta metabólica es necesaria para la generación de poder reductor en forma de NADH, empleado en la CTM. Así, del mismo modo que se incrementó la expresión del transportador de piruvato BRP44L en el grupo 3 I/R, también lo hizo una de las subunidades de la piruvato deshidrogenasa (ODPX). Esta enzima es responsable de la conversión de piruvato a acetyl-CoA, principal precursor del ciclo de Krebs. Además, numerosas enzimas implicadas en esta ruta estaban sobreexpresadas en el grupo 3 I/R. Entre ellas se incluyeron diferentes subunidades de la succinil-CoA ligasa (SUCA, SUCB1, SUCB2), CoA-transferasa (SCOT), fumarato hidratasa (FUMH), citrato sintasa (CYSI), isocitrato deshidrogenasa (IDH3A, IDH3G) y acetyl-CoA sintetasa (ACSL2).

De modo paralelo a la sobreexpresión de las enzimas del ciclo de Krebs, gran parte de las proteínas que forman parte de la CTM aumentaron 3 días tras I/R del tejido (Figura 33.E). Así por ejemplo, se observó un incremento en la expresión de diferentes subunidades que forman las ATP-asas mitocondriales necesarias para producción de ATP (ATP5I y ATPAE), distintos tipos de citocromos oxidasa (COX2, COX41, QCR2) y proteínas responsables de la síntesis de ubiquinona (COQ7, COQ9). Sin embargo, la proteína COX6C, una de las subunidades de la citocromo oxidasa y la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (NDUA5) disminuyeron tras el proceso de I/R.

Proteínas relacionadas con la traducción de proteínas (Figura 33.F) y modificación proteica (Figura 33.G) siguieron el mismo patrón general de aumento de expresión 3 días tras la isquemia. Esta observación concuerda con los perfiles de expresión anteriormente descritos que mostraron un incremento general en la abundancia de proteínas significativamente alteradas en el grupo 3 I/R. Así, se observó una mayor representación de las subunidades ribosómicas (RT28, RM49, RM11) en el grupo 3 I/R. El mismo patrón se observó para proteínas encargadas de la modificación de proteínas (LONM, HOT, 3HIDH). Es de destacar el posible papel de la

proteína LONM o LONP1 (del inglés *Lon protease homolog mitochondrial*) 3 días tras la I/R, puesto que es una proteasa que no solo actúa regulando la degradación de proteínas dañadas sino que también podría tener un papel regulando la expresión de genes y manteniendo la integridad del genoma mitocondrial.



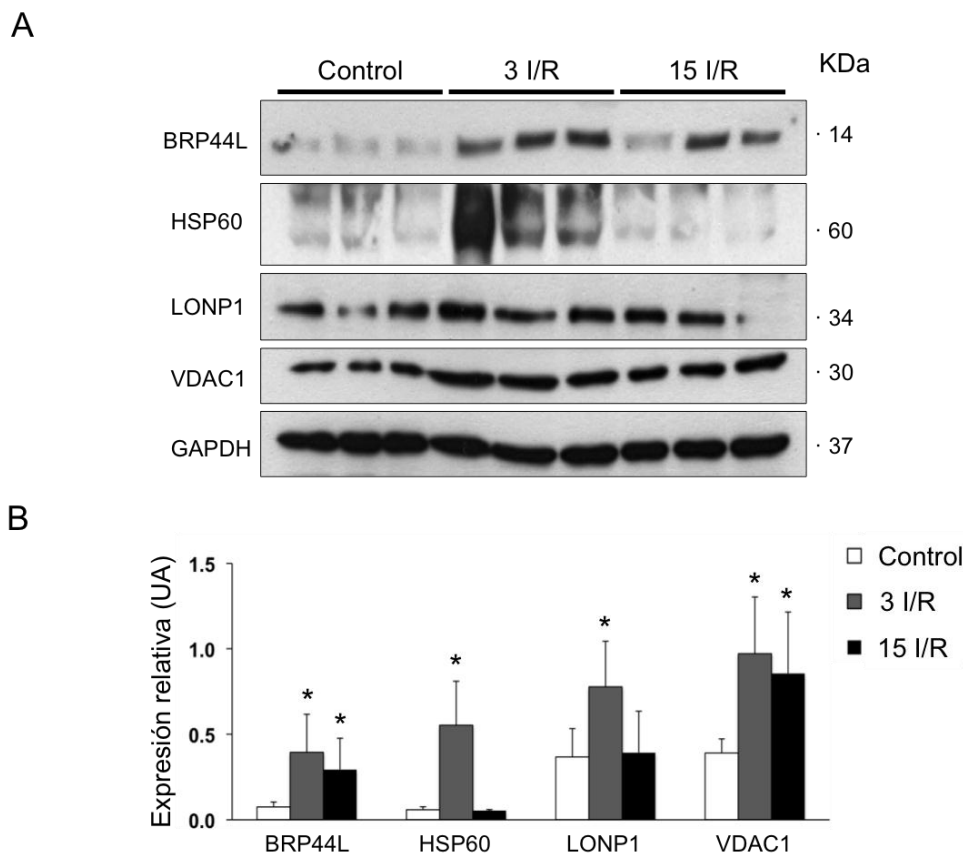
**Figura 33. Mapas térmicos de expresión de las proteínas diferencialmente expresadas para cada uno de los procesos celulares analizados.** Se indican los resultados para cada muestra de cada uno de los tres grupos analizados: Control (Ctrl), 3 I/R y 15 I/R. El agrupamiento jerárquico de estas proteínas permitió distinguir claramente los diferentes perfiles de expresión para cada uno de los procesos celulares estudiados.

#### **D. VALIDACIÓN POR TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS PROTEÓMICO**

Después de analizar los posibles procesos alterados durante la inducción de la isquemia en el tejido cardíaco, escogimos por su posible importancia, cuatro de las proteínas diferencialmente expresadas e involucradas en diferentes procesos celulares para su validación mediante diferentes técnicas moleculares e histológicas. Así, se comprobó el aumento de expresión de las proteínas BRP44L, involucrada en el transporte de piruvato, VDAC1, involucrada en apoptosis celular, HSP60, proteína de defensa frente a estrés oxidativo y LONM, involucrada en la modificación proteica e integridad del genoma mitocondrial. En la figura suplementaria I del Anexo se recogen espectros MS/MS representativos para estas proteínas.

##### **1. Validación por Western blot**

Los lisados proteicos completos se obtuvieron del mismo tejido empleado para realizar la extracción mitocondrial y posterior análisis proteómico en condiciones sanas y patológicas. Se validó mediante western blot la expresión de las proteínas BRP44L, HSP60, LONP1 y VDAC1. Como control de carga se empleó la proteína citosólica GAPDH. Mediante esta técnica se observó que aunque las proteínas BRP44L y VDAC1 se encontraron diferencialmente expresadas con respecto a los controles a los 3 días pero no a los 15 tras I/R mediante análisis proteómico, sí resultaron ser significativas a ese último tiempo post-isquemia cuando se realizó la densitometría de los resultados por western blot. Sin embargo, los resultados de la expresión por esta técnica de las proteínas HSP60, LONP1 coincidieron con los de proteómica, y solo presentaron diferencias significativas de expresión frente a los controles a los 3 días post-I/R (Figura 34).

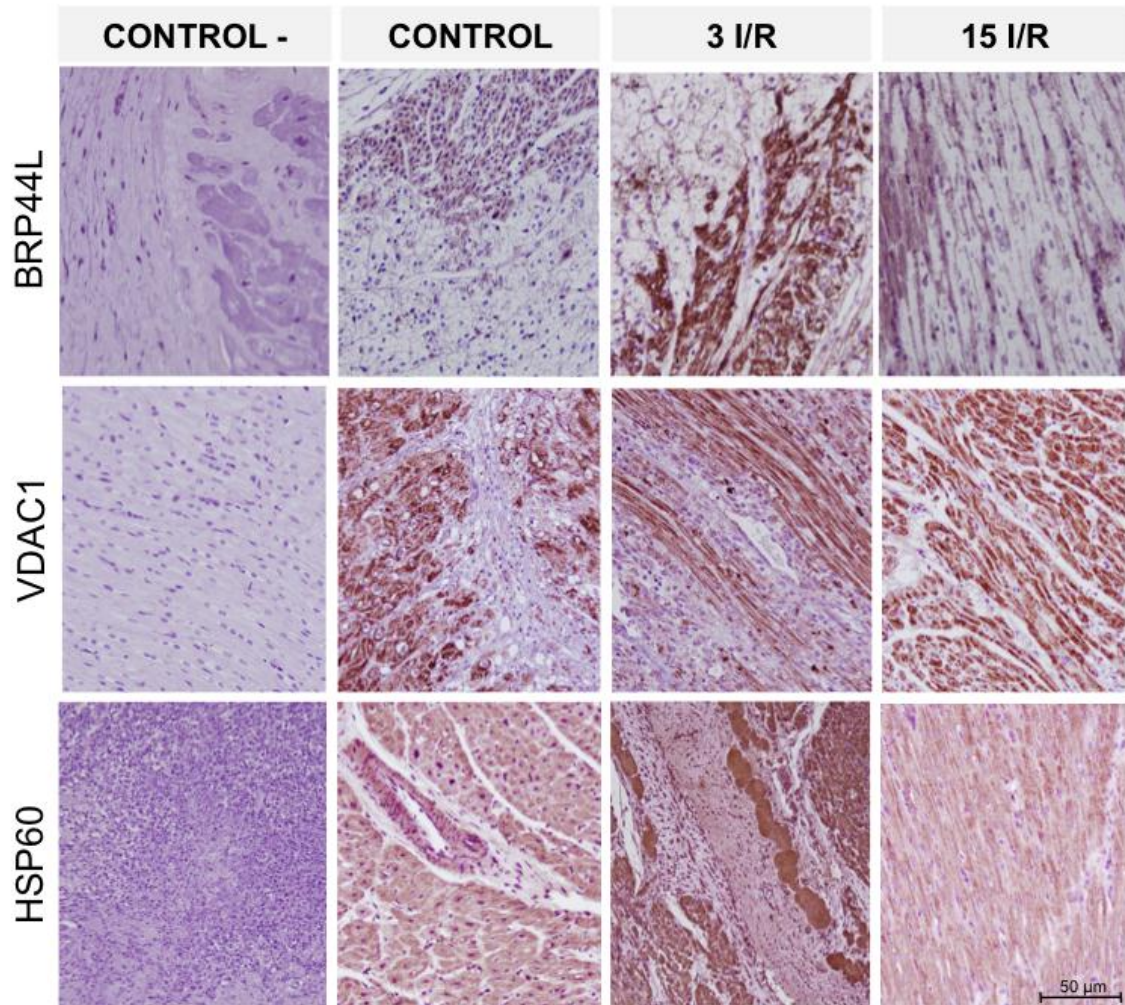


**Figura 34. Validación de cuatro de las proteínas diferencialmente expresadas mediante western blot.** Las validaciones se realizaron sobre el mismo tejido empleado para realizar la extracción mitocondrial y posterior análisis proteómico, verificando las identificaciones y su expresión diferencial en condiciones sanas y patológicas. \*denota  $p$ -valor $<0,005$ .

## 2. Validación en tejido porcino y humano por inmunohistoquímica

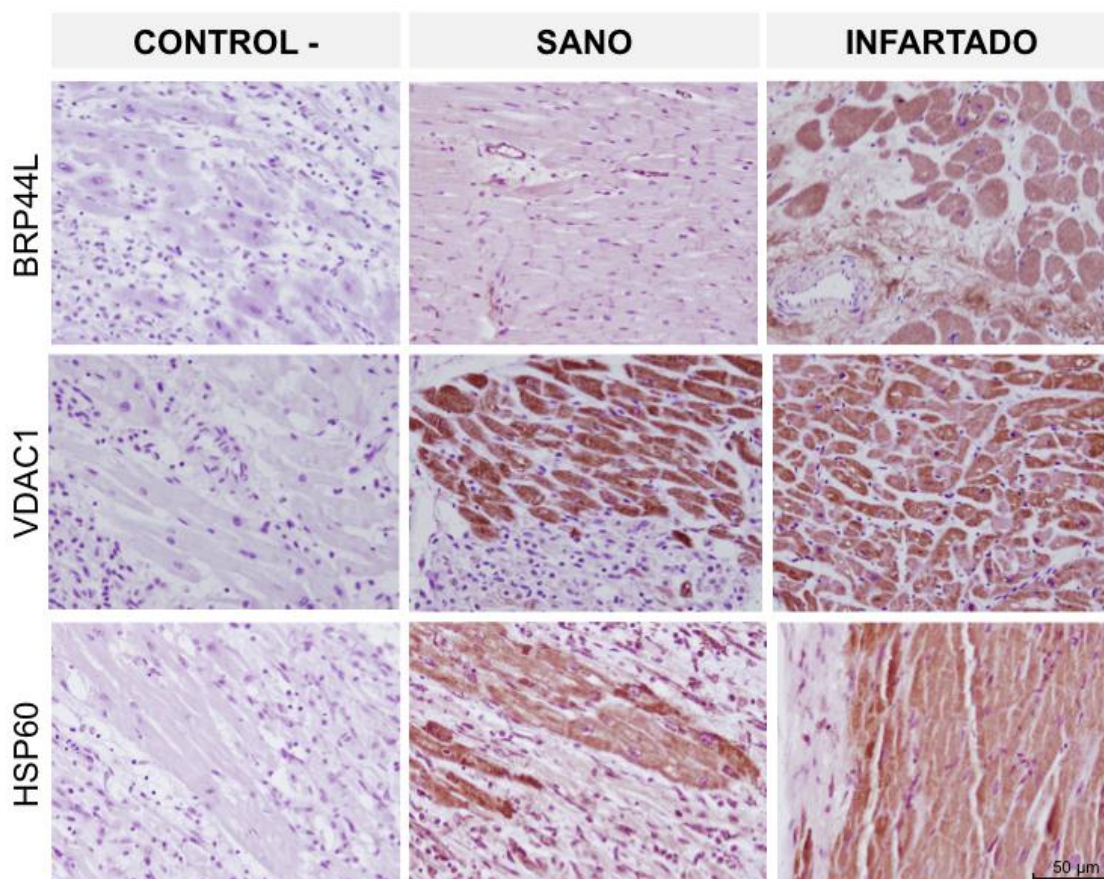
La presencia de tres de estas proteínas BRP44L, VDAC1 y HSP60 fue confirmada adicionalmente mediante inmunohistoquímica en tejido miocárdico de muestras de los animales que constituyeron los controles sanos y los grupos 3 I/R y 15 I/R. La determinación de LONP1 no se pudo realizar por esta técnica por carecer de anticuerpos adecuados. Los resultados obtenidos confirman los aquellos obtenidos tras el análisis proteómico, puesto que se detectó una mayor presencia de la proteína BRP44L en las muestras de I/R siendo más patente su incremento a los 3 días post-isquemia. Las inmunohistoquímicas de VDAC1 y HSP60, pese a no ser tan evidentes como las observadas con BRP44L, mostraron un ligero incremento de la expresión cuando se comparaba el grupo 3 I/R con respecto al control (Figura 35).





**Figura 35. Validación de la presencia de BRP44L, VDAC1 y HSP60 inmunohistoquímica en tejido cardíaco porcino.** El análisis sobre tejido sano (Control) y patológico (3 I/R y 15 I/R) de muestras de tejido cardíaco próximo a la zona de infarto demostró la presencia de BRP44L, VDAC1 y HSP60 en el tejido patológico, mientras que la expresión de las mismas fue menor en tejido procedente de individuos control. El control negativo consistió en la realización de la técnica sin anticuerpo primario. La barra de escala representa 50µm.

Tras observar la presencia de las proteínas BRP44L, VDAC1 y HSP60 en tejido porcino, se utilizaron muestras de ventrículo izquierdo de pacientes humanos diagnosticados con CI por la Unidad de Transplante Cardíaco del CHU A Coruña para comprobar su expresión en humanos. En este caso, la presencia de BRP44L solo se observó en muestras de tejido próximo al infartado. Las proteínas VDAC1 y HSP60 también fueron detectadas en tejido sano, aunque su incremento en la expresión en tejido humano patológico fue más patente que en tejido cardíaco porcino (Figura 36).



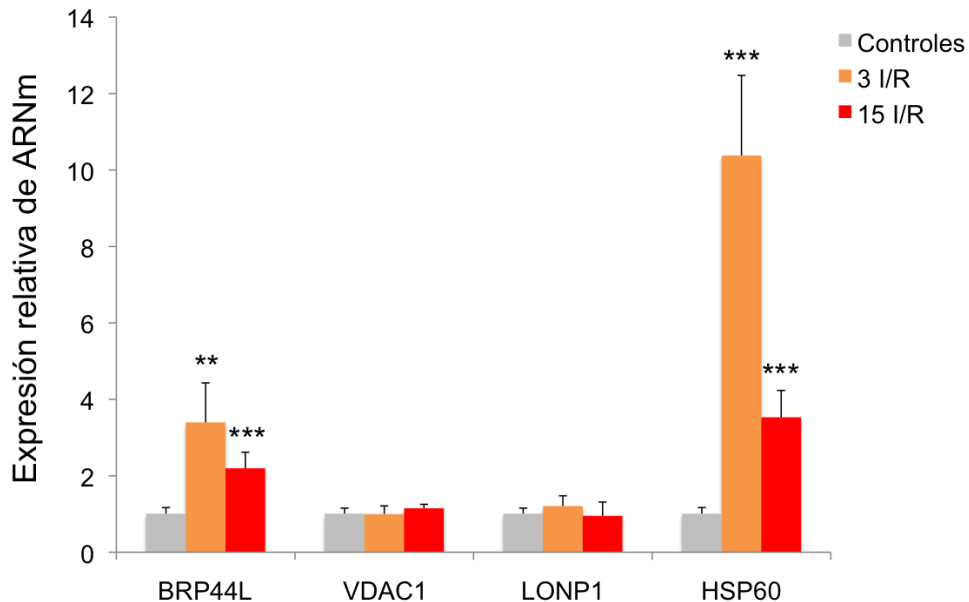
**Figura 36. Confirmación de la localización de las proteínas BRP44L, VDAC1 y HSP60 en tejido cardíaco humano.** La presencia de BRP44L, VDAC1 y HSP60 se confirmó mediante inmunohistoquímica en muestras de tejido cardíaco de pacientes diagnosticados con cardiopatía isquémica. Dicha presencia se compara con muestras equivalentes procedentes de tejido miocárdico sano. El control negativo consistió en la realización de la técnica sin anticuerpo primario. La barra de escala representa 50µm.

### 3. Análisis de la expresión génica

Se empleó PCR a tiempo real para analizar la presencia de transcritos de ARNm de BRP44L, VDAC1, LONP1 y HSP60 en tejido de muestras control, 3 I/R y 15 I/R. Se testaron dos genes de referencia GAPDH y actina. El transcrito para GAPDH presentó un ciclo umbral (Ct) de aproximadamente 26, mientras que la actina amplificó a un Ct de 17. Teniendo en cuenta que los cuatro genes interrogados amplificaron en torno a valores de Ct entre 26-29 se utilizó sólo GAPDH como gen de referencia para realizar el análisis de expresión relativa.

Se detectaron diferencias significativas respecto al control en la presencia de los transcritos de BRP44L y HSP60 tanto a 3 como a 15 días tras la I/R. Sin embargo,

no se observaron cambios en la expresión de los genes VDAC1 y LONP1 entre los 3 grupos. Esto sugiere que la traducción de BRP44L y HSP60 se produjo a los 3 y 15 días, mientras que la síntesis de VDAC1 y LONP1 ocurrió previamente (Figura 37).

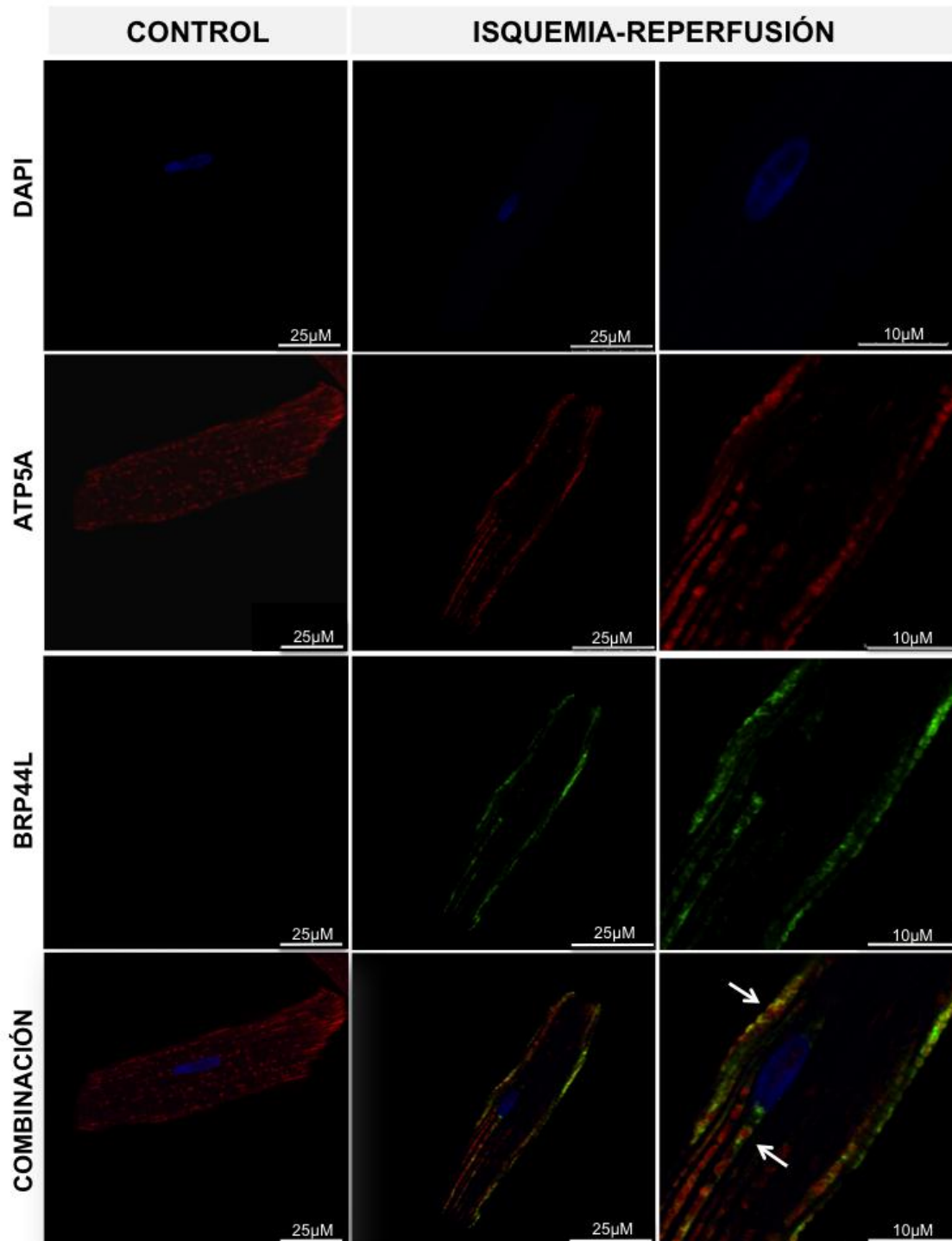


**Figura 37. Expresión relativa de ARNm para los genes BRP44L, VDAC1, LONP1 y HSP60.** Los valores se determinaron tomando como gen de referencia a GAPDH. \*\*Denota p-valor<0,05 y \*\*\* denota p-valor<0,01.

#### 4. Análisis de la expresión por inmunofluorescencia de BRP44L, VDAC1, LONP1 y HSP60 en un modelo de Isquemia/Reperfusión en cardiomiocitos de rata

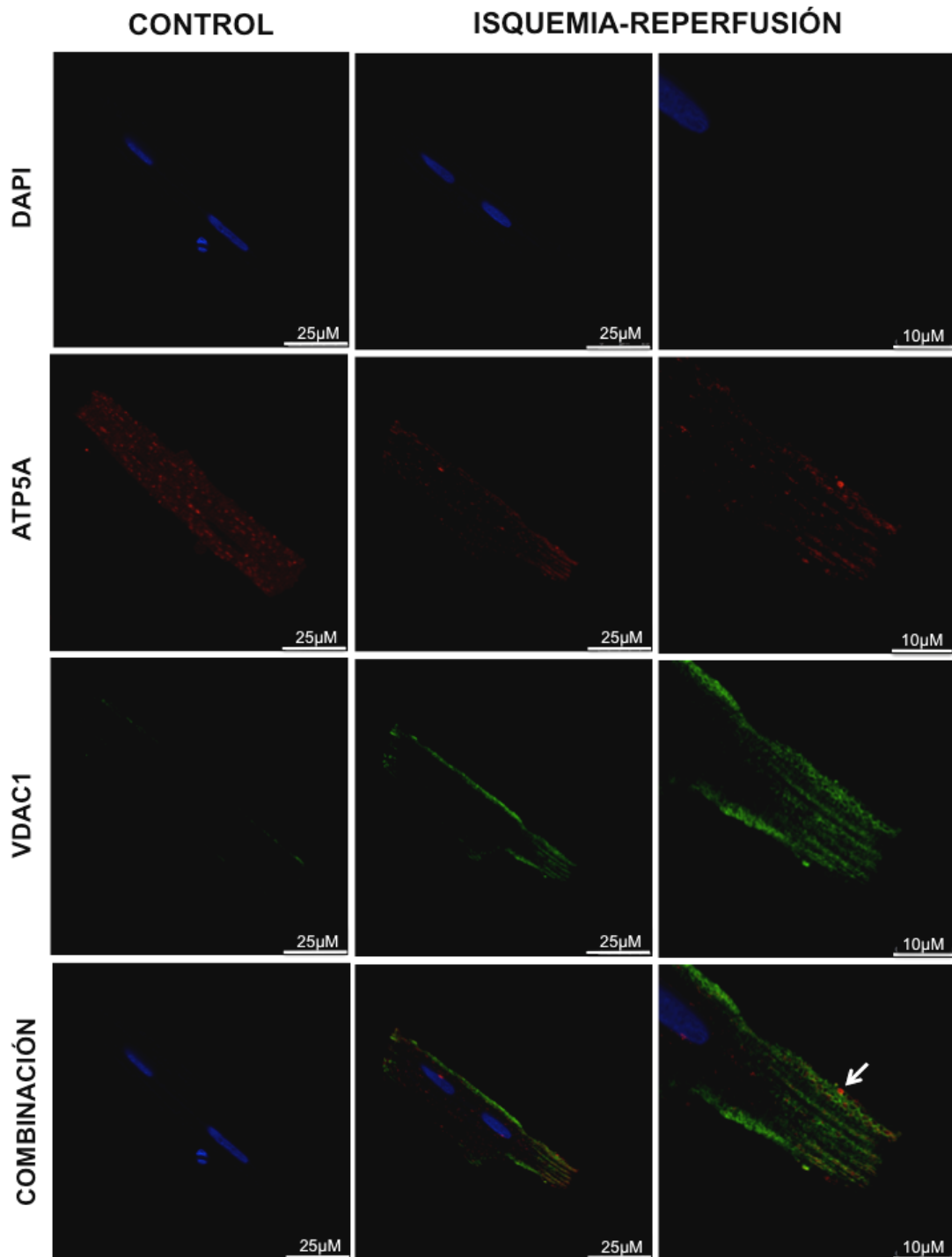
Para el análisis de expresión y localización de las proteínas BRP44L, VDAC1, LONP1 y HSP60 se empleó el análisis por inmunofluorescencia en cardiomiocitos. Las células de rata se dividieron en un grupo control y en un grupo tratado al día siguiente de su extracción con tampón de simulación de I/R. Para demostrar su colocalización con la mitocondria se emplearon los anticuerpos ATP5A y citocromo b (CYB). Se observó un aumento de expresión de BRP44L (Figura 38), VDAC1 (Figura 39), LONP1 (Figura 40) y HSP60 (Figura 41) y colocalización con la mitocondria en los cardiomiocitos tratados con el tampón I/R cuando se comparaban con los controles.



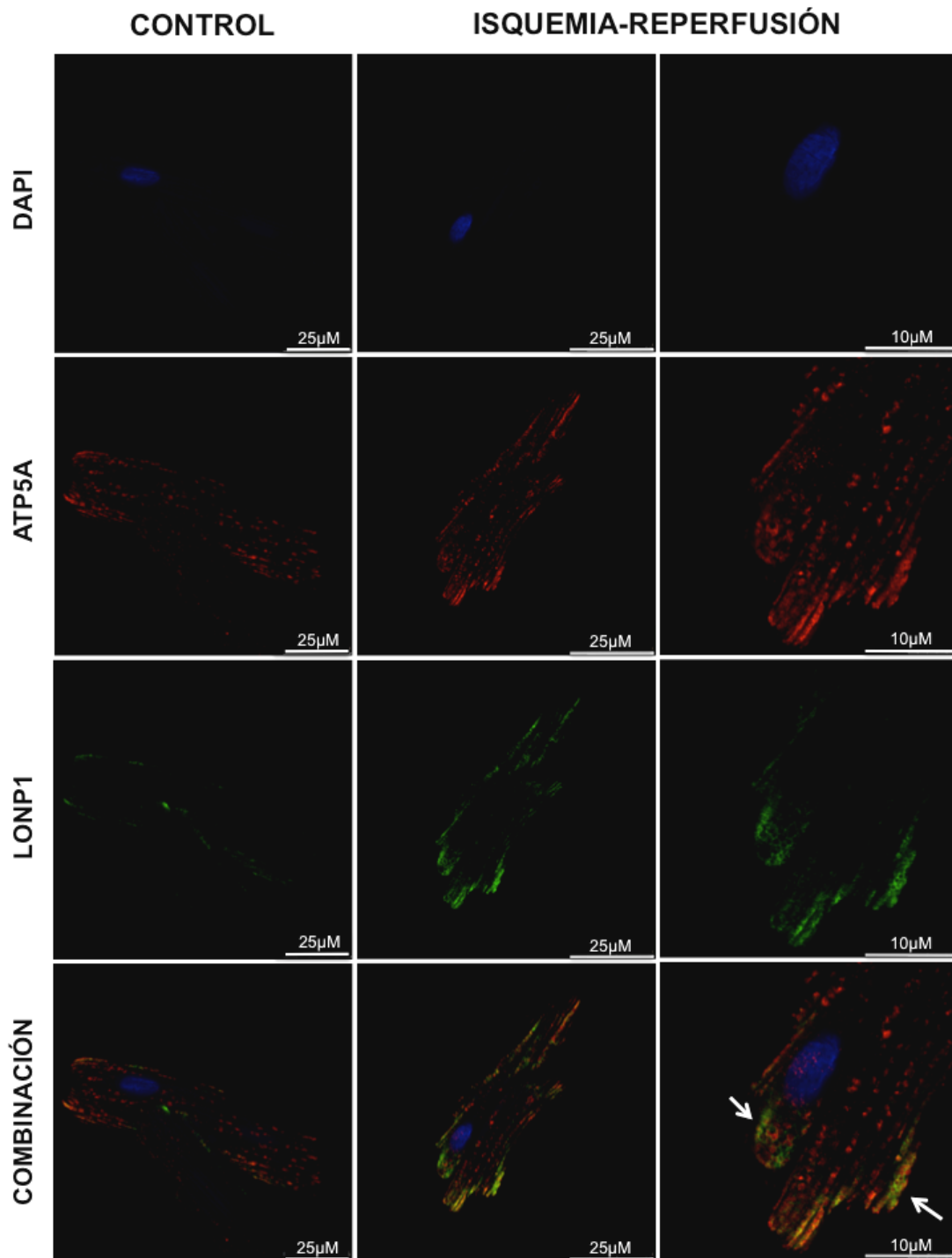


**Figura 38. Validación de la presencia de BRP44L mediante inmunofluorescencia sobre cardiomiocitos de rata.** Los cardiomiocitos control y los tratados con el tampón que simula una situación de I/R fueron analizados por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal. Las imágenes de las células demostraron la presencia de BRP44L (Cy5, verde) y colocalización con ATP5A (Cy3, rojo) en aquellos cardiomiocitos sometidos a I/R. Las flechas indican colocalización de BRP44L con la mitocondria. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra de escala representa 25 μm en las imágenes de las células completas y 10 μm en la ampliación de la imagen de la célula tratada.

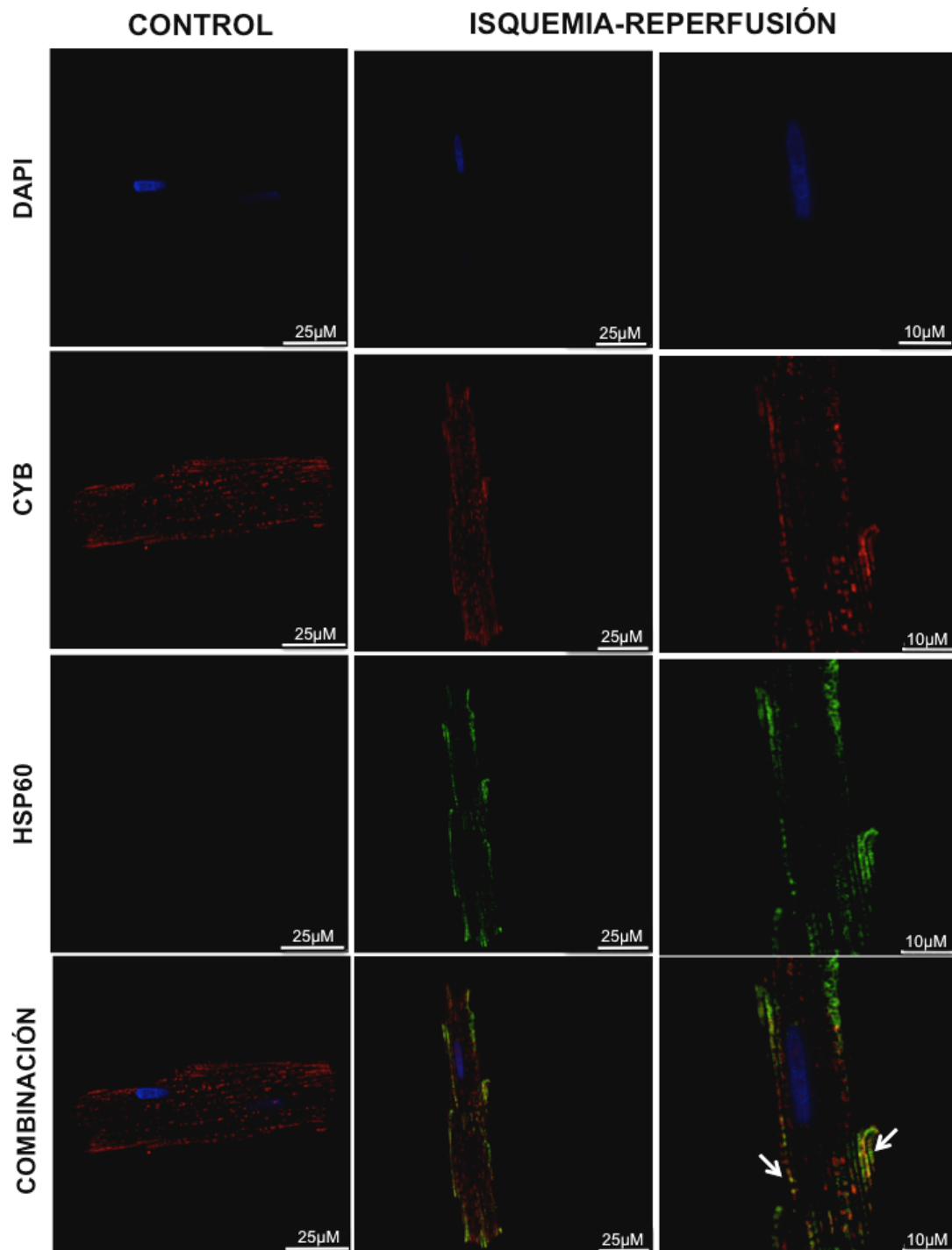




**Figura 39. Validación de la presencia de VDAC1 mediante inmunofluorescencia sobre cardiomiocitos de rata.** Los cardiomiocitos control y los tratados con el tampón que simula una situación de I/R fueron analizados por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal. Las imágenes de las células demostraron la presencia de VDAC1 (Cy5, verde) y colocalización con ATP5A (Cy3, rojo) en aquellos cardiomiocitos sometidos a I/R. Las flechas indican colocalización de VDAC1 con la mitocondria. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra de escala representa 25  $\mu\text{m}$  en las imágenes de las células completas y 10  $\mu\text{m}$  en la ampliación de la imagen de la célula tratada.



**Figura 40. Validación de la presencia de LONP1 mediante inmunofluorescencia sobre cardiomiocitos de rata.** Los cardiomiocitos control y los tratados con el tampón que simula una situación de I/R fueron analizados por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal. Las imágenes de las células demostraron la presencia de LONP1 (Cy5, verde) y colocalización con ATP5A (Cy3, rojo) en aquellos cardiomiocitos sometidos a I/R. Las flechas indican colocalización de LONP1 con la mitocondria. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra de escala representa 25 μm en las imágenes de las células completas y 10 μm en la ampliación de la imagen de la célula tratada.



**Figura 41. Validación de la presencia de HSP60 mediante inmunofluorescencia sobre cardiomiocitos de rata.** Los cardiomiocitos control y los tratados con el tampón que simula una situación de I/R fueron analizados por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal. Las imágenes de las células demostraron la presencia de HSP60 (Cy3, verde) y colocalización con CYB (Cy5, rojo) en aquellos cardiomiocitos sometidos a I/R. Las flechas indican colocalización de BRP44L con la mitocondria. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra de escala representa 25 µm en las imágenes de las células completas y 10 µm en la ampliación de la imagen de la célula tratada.



## **V. DISCUSIÓN**



## V. DISCUSIÓN

### 1. Mitocondria y cardiopatía isquémica: valoración inicial y aportación de este estudio

La cardiopatía isquémica (CI) constituye una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en la sociedad occidental<sup>230</sup>. Existen numerosos datos publicados que indican que uno de los puntos clave de causa y desarrollo de esta enfermedad reside en los eventos que tienen lugar en la mitocondria. Debido a esto, numerosos estudios han centrado sus objetivos en analizar la contribución de este orgánulo en el inicio y progresión de la CI debido a su papel central en la producción de energía, metabolismo, homeostasis del calcio y estrés oxidativo. La importancia de su implicación en el desarrollo de esta patología, hacen de la mitocondria un objetivo potencial aun por explorar en profundidad para tratar de alcanzar el perfeccionamiento de nuevas terapias. En este sentido, este trabajo de tesis aborda el papel de la mitocondria en la CI desde dos enfoques diferentes. El primer enfoque, desde un punto de vista genético, determinando la influencia de determinados polimorfismos mitocondriales que podrían acelerar o ralentizar el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, la mitocondria también juega un papel importante en los procesos celulares de respuesta a isquemia. Por este motivo el segundo enfoque, realizado desde un punto de vista proteómico, se centró en analizar las proteínas mitocondriales alteradas como consecuencia de un proceso de I/R en el tejido.

Existen varios aspectos a valorar en este estudio. En primer lugar se ha puesto de relevancia la importancia que tiene la composición genética de una determinada población para determinar las posibles causas para el desarrollo de la enfermedad. En concreto, se han establecido perfiles genéticos mitocondriales específicos que pueden contribuir o prevenir al avance de la CI. Esta caracterización se vio además reforzada por la inclusión de otros factores de riesgo previamente descritos para el desarrollo de la CI, haciendo el estudio más preciso y completo. En segundo lugar, el modelo porcino de I/R ha permitido el estudio de tejido cardíaco en zonas sanas cercanas a la infartada, con una mayor demanda de trabajo contráctil, simulando la situación que podría ocurrir en el corazón humano en el mismo área de tejido.

Tras el proceso de isquemia, en la mitocondria se centran muchos puntos clave para la supervivencia de los cardiomiocitos. Enfocándonos en el aislamiento de mitocondrias, hemos analizado las proteínas mitocondriales diferencialmente expresadas en la zona sana situada próxima a la infartada a diferentes tiempos tras la

I/R empleando herramientas proteómicas de vanguardia. Mediante el uso de este método, nuestros resultados mostraron perfiles de proteínas diferentes cuando se compararon corazones sanos con aquellos recogidos al tercer o decimoquinto día tras la I/R. Se han encontrado proteínas diferencialmente expresadas cuya función en el contexto cardíaco se encuentra aún por estudiar y que podrían ofrecer valiosa información acerca de los procesos que tienen lugar en la mitocondria a diferentes tiempos tras la isquemia. De esta forma, desde este estudio a gran escala se proponen una serie de proteínas que se encuentran alteradas en el tejido miocárdico a diferentes tiempos tras la I/R. Estas proteínas podrían ser candidatas para su posterior estudio a nivel funcional y poder así analizar su potencial papel como dianas de aproximaciones terapéuticas.

### **2. Haplogrupos H y J como factores de riesgo y de protección, respectivamente, para la cardiopatía isquémica**

El conjunto de SNPs presentes en el genoma mitocondrial determinan el haplogrupo de un individuo. En general, las mutaciones en el ADNmt que forman haplogrupos no patológicas *per se*, pero sin embargo podrían modular el metabolismo mitocondrial<sup>34,35</sup>. En este trabajo se han encontrado asociaciones significativas entre los haplogrupos mitocondriales H y J y la incidencia de CI en una población española. Los resultados mostraron que los haplogrupos H y J constituyen factores de riesgo y de protección respectivamente para el desarrollo de CI.

**Haplogrupos mitocondriales y factores de riesgo clásicos.** Las proporciones de edad y sexo fueron similares en los grupos de casos y controles en la población de estudio. Esto nos permitió excluir cualquier sesgo debido a las diferencias de estas dos variables. Además, se verificaron las frecuencias de principales factores de riesgo para la CI como son el hábito de fumar, la hipercolesterolemia, la hipertensión y la diabetes mellitus. Estos factores de riesgo clásicos, al igual que se ha observado en otros estudios<sup>231,232</sup>, se asociaron independientemente con el riesgo de desarrollar la enfermedad, puesto que su frecuencia era significativamente mayor en el grupo de pacientes con CI. Sin embargo, cuando se analizó la frecuencia de estos factores de riesgo estratificados por haplogrupos no se observó ninguna diferencia en su distribución, indicando que ningún haplogrupo analizado se encontraba más representado en el grupo de fumadores o diabéticos y que el poseer un determinado haplogrupo no predisponía al



desarrollo de hipertensión o hipercolesterolemia. Por tanto, la influencia del genotipo mitocondrial se encuentra directamente relacionada con el desarrollo de la CI, pudiendo, por ejemplo, propiciar los eventos que conducen a la isquemia del tejido.

**Haplogrupos mitocondriales y enfermedades cardíacas.** Varios estudios han demostrado la asociación entre haplogrupos y el desarrollo de enfermedades complejas<sup>39</sup> o relacionadas con el envejecimiento<sup>35</sup>, incluyendo las enfermedades cardiovasculares<sup>225,233</sup>. De acuerdo con nuestros resultados, un estudio reciente demostró también que el haplogrupo mitocondrial H es un factor de riesgo para la aparición temprana del infarto de miocardio<sup>233</sup>. Además, Gallardo et al. describieron al haplogrupo H como factor de riesgo para el progreso de la patología hacia insuficiencia cardíaca en la población española<sup>228</sup>. En dicho estudio se dividió a los receptores de aloinjertos según etiología observándose que la frecuencia del haplogrupo H en 174 pacientes con insuficiencia cardíaca era del 53% frente a un 41% de individuos sanos. Nuestros datos apoyan de manera estadística esta observación señalando al haplogrupo H como factor de riesgo para la CI. Por otra parte, nunca se había descrito el haplogrupo J ni los polimorfismos que lo definen como factores de protección en enfermedades cardiovasculares.

Aunque existen numerosas evidencias de asociación de haplogrupos mitocondriales con el evento isquémico<sup>48,49,51</sup>, no se ha alcanzado todavía una conclusión definitiva porque los resultados en algunos casos son dispares. La distribución de la población control empleada en este trabajo no difiere de las de otros estudios europeos<sup>225-228</sup>, sin embargo, un exhaustivo trabajo realizado por Benn et al. en una población danesa no mostró diferencias significativas entre los haplogrupos mitocondriales y riesgo de enfermedad cardiovascular isquémica<sup>234</sup>. Por lo tanto, la población española empleada en este estudio no sería directamente extrapolable a otras poblaciones del norte de Europa. Por otra parte, Kofler et al. encontraron una mayor frecuencia del haplogrupo T en una población de pacientes austríacos con enfermedad coronaria<sup>225</sup>. En este sentido, en nuestro trabajo no encontramos diferencias en la frecuencia del haplogrupo T entre pacientes y controles. Es por ello que las observaciones dispares entre estudios destacan la dificultad de encontrar asociaciones reproducibles de haplogrupos mitocondriales con CI. Una posible explicación a esta situación podría ser la especificidad geográfica de algunos SNPs presentes en el ADNmt. Por tanto, serían necesarios estudios de secuenciación del genoma mitocondrial completo para señalar a determinados alelos como factores de riesgo o de protección para la CI.

**Los alelos m.14766C y m.7028C como factores de riesgo, m.10398G y m.4216C como factores de protección frente a la CI.** Entre los muchos SNPs que caracterizan al haplogrupo H, los alelos m.14766C y m.7028C constituyeron factores de riesgo para el desarrollo de la isquemia en nuestro estudio. El SNP m.14766C>T produce la sustitución del aminoácido treonina por una isoleucina en la posición 7 del citocromo b, lugar donde se encuentra el núcleo del canal de agua del citocromo.

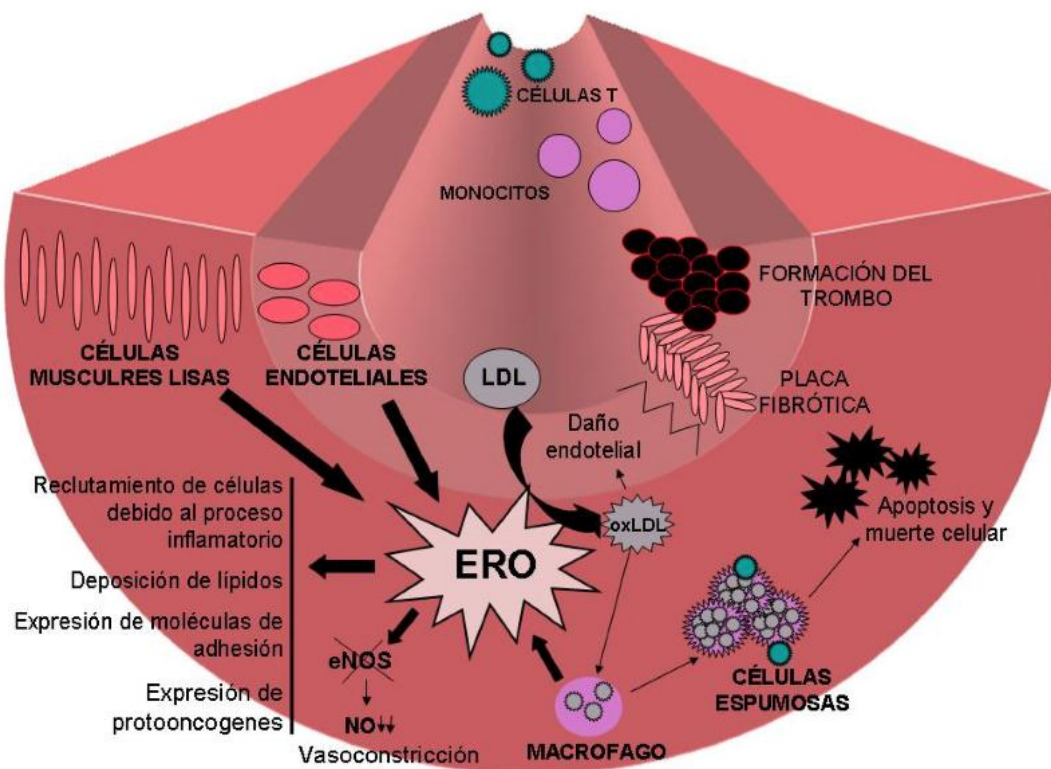
De hecho, un modelo computacional mostró que la presencia del aminoácido treonina, más hidrofílico que la isoleucina, favorece la apertura de este canal de agua haciéndolo menos globular y compacto<sup>235</sup>. Así, el aminoácido treonina, presente en el haplogrupo H, posee una mayor capacidad para captar y reducir el tiempo de la ubisemiquinona en el sitio Qo, lo que podría contribuir a una mayor eficiencia en el transporte de electrones. Teniendo en cuenta esta aproximación se deduce que la eficiencia de la CTE y por tanto producción de ROS en células con haplogrupo H debería ser mayor, aunque todavía se requieren estudios funcionales para demostrar el fenotipo que produce el poseer este alelo. Por su parte, el alelo m.7028C, que también caracteriza al haplogrupo H, constituye según nuestros resultados un factor de riesgo para el desarrollo de CI. Sin embargo, el polimorfismo m.7028C>T provoca un cambio sinónimo de aminoácidos y por lo tanto, este SNP no es responsable de los efectos fenotípicos que definen este haplogrupo como factor de riesgo para el desarrollo de CI. Curiosamente, el sub-haplogrupo H1 fue descrito como factor protector contra evento de accidente cerebrovascular isquémico<sup>48</sup>. Debido a que el sub-haplogrupo H1 se define en la posición 7028 del ADNmt por el mismo SNP que el haplogrupo H, otros polimorfismos presentes en sub-haplogrupo H1 podrían producir diferentes fenotipos.

En este trabajo se observaron por primera vez a los alelos m.10398G y m.4216C como factores de protección frente a un evento isquémico. Ambos SNPs provocan un cambio no sinónimo en la secuencia aminoácidica de la proteína. Así, el SNP m.10398A>G produce una sustitución de treonina a alanina en la posición 114 de la cadena de aminoácidos de la subunidad 3 de la NADH deshidrogenasa y el SNP m.4216T>C provoca la sustitución de tirosina a histidina en la posición 304 de la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa. Teniendo en cuenta estos resultados y los estudios cada vez más abundantes de asociación de polimorfismos mitocondriales con cardiopatías de distinto origen, urge la puesta en marcha de proyectos en los que se analicen los efectos que producen los diferentes alelos en el fenotipo energético de la célula.

**Haplogrupos mitocondriales, eficiencia energética de la CTM y riesgo de isquemia.** Diferentes estudios indican que el haplogrupo J presenta un menor consumo de oxígeno que el haplogrupo H<sup>38,236</sup>. En consecuencia, el haplogrupo J presenta una menor eficiencia en la cadena de transporte electrónico y una menor producción de ATP y ERO. Es por ello que, las células con haplogrupo mitocondrial H podrían estar sometidas a un mayor daño oxidativo que aquellas portadoras del haplogrupo J<sup>38</sup>.

Debido a que el corazón tiene la tasa más alta de consumo de oxígeno en el cuerpo, pequeñas diferencias en la eficiencia del transporte de la energía conducirían a importantes efectos fisiológicos. Así por ejemplo, los polimorfismos presentes en el haplogrupo H podrían actuar precipitando el evento de aterosclerosis. La obstrucción de las arterias coronarias es la causa principal de la CI, y está bien establecido que la inflamación es un mecanismo clave en la patogénesis de la aterosclerosis<sup>237</sup>. La producción de ERO juega un papel decisivo en la inflamación del tejido y, en consecuencia, en la aterosclerosis<sup>238</sup>. Las células endoteliales, células musculares lisas y macrófagos son fuentes de ERO que oxidan lipoproteínas de baja densidad (LDL). El paso de las LDL oxidadas a través del endotelio de la pared arterial es el primer paso de una cascada de eventos que conduce finalmente a la formación de la placa fibrosa que sobresale en el orificio arterial y causa isquemia<sup>239</sup> (Figura 42). Debido a que el haplogrupo H produce más ERO que otras variantes de haplogrupos, sugerimos que el hecho de presentar este haplogrupo podría precipitar los primeros pasos en este proceso de inflamación y el ciclo catastrófico de aterotrombosis. Por el contrario, la baja producción de ERO presente en las células con haplogrupo J produciría el efecto contrario.

Es evidente que tanto la etiología como la patología de la CI son complejas, y la mitocondria desempeña un papel crítico en este proceso. Los haplogrupos mitocondriales pueden actuar sinérgicamente con otros factores genéticos nucleares, proteicos y componentes ambientales, contribuyendo de forma epistática al desarrollo de la enfermedad.



**Figura 42. Implicación de las ERO en la aterosclerosis.** Las ERO producidas por las células musculares lisas, células endoteliales y los macrófagos oxidan el LDL (oxLDL). El oxLDL daña las células endoteliales iniciando los eventos que terminan en la formación del trombo y oclusión del vaso. eNOS. Oxido nítrico sintasa endotelial.

### 3. Análisis del proteoma mitocondrial de corazones con patología isquémica en un modelo porcino de infarto de miocardio.

**Modelo porcino para el estudio del infarto de miocardio.** El corazón porcino presenta una anatomía similar a la humana. Por este motivo y por la capacidad de obtener infartos de tamaño y ubicación predecibles este modelo animal ha sido ampliamente estudiado en la literatura<sup>165,240</sup>. En este trabajo la mortalidad asociada al procedimiento quirúrgico o tras las 24 horas de post-operatorio fue del 23,2%. Una vez superada, el animal consiguió estabilizarse y sobrevivir hasta formar un tejido crónico de cicatrización. Esta situación es similar a la que se produce en pacientes que son reperfundidos tras dos horas de isquemia<sup>229</sup> y no hace más que apoyar la idea de la similitud del modelo animal porcino al humano. Además, el procedimiento de

intervención mediante cateterismo femoral, menos invasivo que otras cirugías, redujo la posibilidad de pericarditis u otro tipo de infecciones.

El infarto se localizó de manera reproducible en la pared anterior del ventrículo izquierdo, próximo a la coronaria descendente anterior en todos los animales. Además, no se observaron episodios recurrentes de isquemia por oclusión coronaria, puesto que el componente aterosclerótico está ausente en este modelo de oclusión inducida.

Al igual que en estudios previos se observó inflamación post isquémica y reducción de la fracción eyección en los 3 días posteriores a la isquemia<sup>88</sup>. Sin embargo, en nuestro modelo, el proceso inflamatorio a los 3 días fue patente en el septo interventricular pero no en la pared del ventrículo izquierdo, posiblemente debido a que la región de septo recogida y analizada se encontraba más cercana a la zona infartada. La pared anterior del ventrículo izquierdo, sin contractibilidad, de acuerdo con ecocardiografías y electrocardiogramas, mantenía su espesor intacto sugiriendo que la reabsorción del tejido necrótico no había todavía tenido lugar, puesto que la presencia de tejido conectivo de cicatrización tampoco resultaba aparente. Este patrón se vio invertido quince días tras la I/R en los que la pared ventricular estaba significativamente adelgazada. Es importante destacar que la región borde de infarto recogida de tejido no presentó infiltrados ni fibrosis tanto a los 3 como a los 15 días tras la I/R. Por tanto, la extracción de mitocondrias se realizó en muestras homogéneas de tejido, evitándose así posibles enriquecimientos o contaminación con mitocondrias procedentes de otros tipos celulares de origen no miocárdico.

**Análisis del proteoma mitocondrial. Patrón temporal.** En este estudio se describió el perfil proteómico mitocondrial observado 3 y 15 días tras la reperusión del tejido en una zona próxima al área infartada, en la que la histología del tejido era comparable a un corazón sano. Se identificaron 298 proteínas mitocondriales, entre las cuales 70 se encontraron diferencialmente expresadas, aportando información acerca de los procesos biológicos que tienen lugar en la mitocondria 3 y 15 días tras la I/R.

Hasta la fecha, los enfoques experimentales empleados para definir el proteoma mitocondrial total utilizando mitocondrias purificadas a partir de un gradiente de centrifugación han identificado más de 600 proteínas asociadas a las mitocondrias humanas<sup>241</sup> y un número aún mayor en los estudios sobre mitocondrias de ratón<sup>203</sup>. Estos estudios estaban principalmente enfocados a la identificación del mayor número

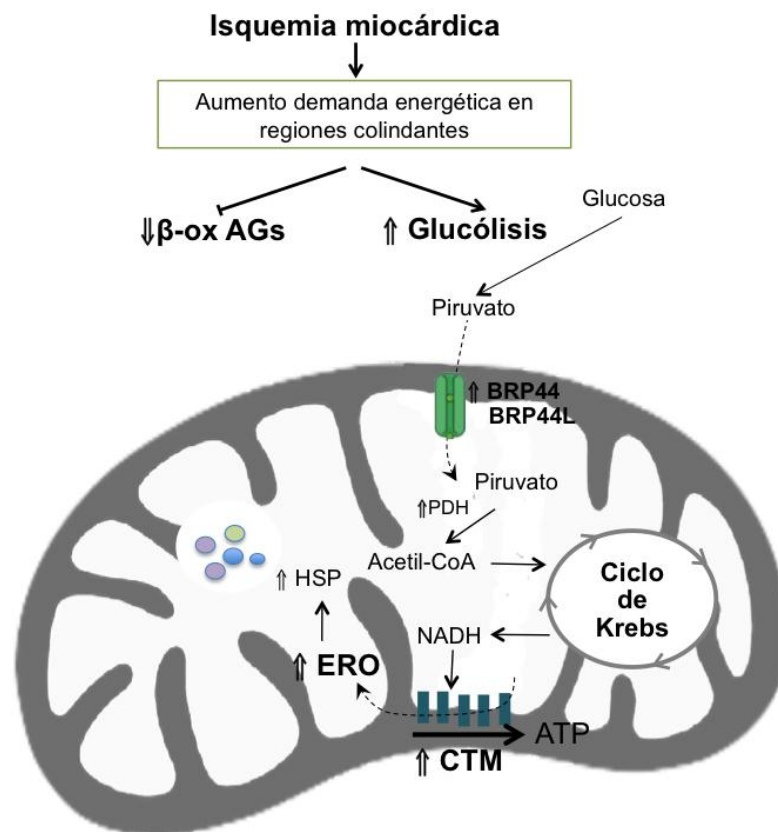
de proteínas mitocondriales posibles a partir de una gran cantidad de mitocondria purificada procedente de tejidos de diferentes órganos. Desde una perspectiva clínica, este abordaje se ve muy limitado por la cantidad de muestra obtenida, ya que en numerosas ocasiones la disponibilidad de tejido patológico que se desea analizar es limitado. Esta dificultad se hizo patente en nuestro trabajo puesto que en este sentido el tejido necesario para hacer el análisis proteómico, genético e histológico procedía de una zona específica del corazón, la zona sana del VI próxima a la infartada. Sin embargo, se identificaron 298 proteínas mitocondriales, entre las cuales 70 se encontraron diferencialmente expresadas, aportando información acerca de los procesos biológicos que tienen lugar en la mitocondria 3 y 15 días tras la I/R.

Estudios proteómicos y transcriptómicos a gran escala han confirmado que la alteración en la producción de energía y la disfunción mitocondrial están implicadas en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca<sup>211,242</sup>. A pesar de ello, el papel del metabolismo mitocondrial energético tras sufrir un infarto de miocardio es poco conocido. La función cardíaca normal depende del consumo adecuado de oxígeno y sustratos oxidables con el objetivo final de generar suficiente ATP para satisfacer las demandas energéticas del órgano. Este proceso implica diferentes vías metabólicas, incluyendo principalmente la beta oxidación de los ácidos grasos y la glucólisis. Bajo condiciones normales, en el corazón sano, la beta oxidación de los ácidos grasos es la ruta principal que se emplea para la obtención de energía<sup>243,244</sup>. Sin embargo, cuando el oxígeno y el flujo sanguíneo se interrumpen durante la isquemia, el corazón opta por una ruta metabólica con un consumo de oxígeno más eficiente, la glucólisis<sup>245,246</sup>.

Estas diferencias en el metabolismo energético fueron detectadas en nuestro estudio. Así, 3 días tras la isquemia se observó un descenso en las proteínas encargadas del metabolismo y transporte al interior de la mitocondria de sustratos procedentes de la beta oxidación. Entre ellas se incluían proteínas como la carnitina O-acetiltransferasa, la aspartato aminotransferasa, así como las subunidades alfa y beta de la flavoproteína transportadora de electrones, encargadas de captar electrones de diferentes acyl-CoA deshidrogenasas. Por el contrario, la presencia de BRP44L o BRP44 fue mayor en el grupo de 3 I/R. Dos relevantes estudios publicados recientemente de forma simultánea revelaron la función e importancia de ambas proteínas en humanos: el transporte de piruvato, producto final de la glucólisis, hacia la matriz mitocondrial<sup>247,248</sup>. Es importante señalar que a partir de estos estudios las proteínas BRP44L y BRP44 pasaron a denominarse MPC1 y MPC2 respectivamente (*mitochondrial pyruvate carriers*). Por tanto, en este trabajo se observó que las



diferencias en el perfil mitocondrial estaban sujetas a los cambios metabólicos que sufre el tejido tras la I/R. Además, se señaló por primera vez la sobreexpresión de las proteínas BRP44 y BRP44L como mecanismo adaptativo al incremento de la glucólisis en el citosol tras la I/R (Figura 43).



**Figura 43. Propuesta del esquema de las rutas metabólicas encontradas alteradas tras el análisis proteómico durante la isquemia miocárdica.** La isquemia del tejido miocárdico provoca un aumento de la demanda energética en las regiones colindantes. Así, la beta oxidación de los ácidos grasos ( $\beta$ -ox AGs), ruta mayoritaria de obtención de energía en un corazón sano, disminuye y la glucólisis, ruta más eficiente en el consumo de oxígeno, aumenta. La concentración de piruvato, producto final de la glucólisis, se incrementa en el citoplasma al igual que lo hacen las proteínas de membrana BRP44 y BRP44L encargadas de transportarlo a la matriz mitocondrial. Allí, el piruvato es catabolizado por la piruvato deshidrogenasa (PDH), enzima sobreexpresada tras la isquemia, a acetil-CoA, principal precursor del ciclo de Krebs. El poder reductor en forma de NADH generado en el ciclo de Krebs es empleado por la cadena de transporte mitocondrial (CTM), incrementada tras las isquemia, para la producción de más ATP. Paralelamente a la producción de energía también se produce el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de las proteínas de choque térmico (HSP del inglés heat shock proteins) encargadas de proteger y plegar otras proteínas en condiciones de estrés.

Del mismo modo que 3 días tras la I/R del tejido se produjo un aumento de las proteínas transportadoras de piruvato, también lo hizo una de las subunidades de la piruvato deshidrogenasa, enzima encargada de catalizar la descarboxilación del piruvato a acetil Co-A, principal precursor del ciclo de Krebs. Al mismo tiempo,

numerosas enzimas implicadas en este ciclo estaban sobreexpresadas, sugiriendo la necesidad por parte del tejido, de generar más poder reductor en forma de NADH. Interesantemente, 3 días tras la isquemia, numerosas proteínas que forman parte de la CTM incrementaron paralelamente su expresión. Por tanto, además de incrementar la capacidad de producción de poder reductor (NADH), también lo hicieron las proteínas de la CTM capaces de captar electrones a partir de él. Así, la generación de energía en forma de ATP sería mucho mayor 3 días tras la isquemia.

Igual que en estudios previos, se observó un incremento significativo de proteínas de choque térmico frente al daño por I/R<sup>249,250</sup>. Estas proteínas ejercen sus efectos a través de múltiples mecanismos de protección que implican la prevención de la agregación de proteínas y su correcto ensamblaje<sup>251</sup>. Entre aquellas diferencialmente expresadas en este análisis se incluyeron la HSP60, GRP75 y TRAP1. En este sentido, la proteína HSP60 es de particular interés, debido a que se encarga de preservar los niveles de ATP y funcionamiento de la CTM tras la simulación del proceso de I/R<sup>252</sup>. Además, su sobreexpresión ha demostrado ser protectora contra la muerte celular necrótica y apoptótica<sup>249</sup>. Por otra parte, estudios previos han observado que LONP1 aumenta su actividad durante la I/R temprana de forma directamente proporcional al tiempo transcurrido tras la isquemia y del nivel de proteína oxidada<sup>253</sup>. Estos resultados concuerdan con los de nuestro estudio en el que la proteína LONP1, incrementada a los 3 días, podría estar jugando un papel clave degradando las proteínas oxidadas que han dejado de ser funcionales en la zona próxima al infarto. Por tanto, observamos que la fase aguda de estrés oxidativo fue patente el tercer día tras la isquemia y que quince días más tarde la respuesta frente a estrés disminuyó indicando que la homeostasis redox del tejido probablemente había sido alcanzada.

Al mismo tiempo que se observó un incremento en proteínas de defensa frente a estrés oxidativo también lo hicieron aquellas relacionadas con la liberación de productos mitocondriales al citosol y activación de la cascada apoptótica. Entre ellas se encontraban proteínas de fisión mitocondrial o aquellas que forman el poro de permeabilidad mitocondrial. Aunque el papel fisiológico de los poros todavía no está claro, se sabe que su apertura debido al aumento de estrés oxidativo en la célula, causa una mayor permeabilidad mitocondrial y, en consecuencia juega un papel crítico en la progresión de la apoptosis<sup>254,255</sup>. Además de permitir la liberación de sustancias, la mayor permeabilidad provoca un desbalance en la generación de potencial en la membrana interna, inhibiendo así la síntesis de ATP. Sin embargo, a pesar de estar



significativamente sobreexpresada a nivel de proteína, los datos de PCR a tiempo real no mostraron un incremento en la expresión génica de VDAC1 a los 3 días. Por tanto, la mayor presencia de VDAC1 podría estar provocada por el estrés oxidativo generado el primer o segundo día tras la reperfusión.

Los resultados observados tras realizar el análisis de componentes principales mostraron que el porcentaje de la varianza del modelo explicado por el primer y el tercer componente principal no permitía diferenciar al grupo de muestras control de aquellas 15 I/R. Sin embargo, el grupo de muestras 3 I/R permaneció claramente diferenciado tras representar los componentes que explicaban el mayor porcentaje de la varianza. El grupo de 3 I/R fue el más discriminado por este tipo de análisis apoyando los datos observados en los mapas térmicos. Por tanto, teniendo en cuenta el análisis en conjunto de los resultados, se observó que 3 días tras el proceso de I/R se produce una respuesta aguda del tejido posiblemente activándose los mecanismos frente a estrés oxidativo e incrementándose aquellos de producción de energía a partir de la glucólisis.

## 5. Limitaciones del estudio

Existen varias limitaciones inherentes al diseño de ambos estudios.

**Estudio de asociación de haplogrupos mitocondriales con cardiopatía isquémica.** Nuestro estudio de población mostró resultados significativos de asociación de haplogrupos mitocondriales con el desarrollo de CI. Una de las limitaciones más importantes fue la falta de un estudio de replicación positiva en otra población relacionada<sup>256</sup>. Sin embargo, el elevado número de pacientes e individuos sanos clínicamente bien evaluados, nos permitió excluir posibles falsos positivos. Además, teniendo en cuenta las dificultades de reclutar un número similar de pacientes en la misma área geográfica la repetición del estudio resultaría un problema. A pesar de ello, pacientes y controles han sido reclutados en un área geográfica relativamente grande evitando así posibles sesgos relacionados con el efecto fundador o heterogeneidad de la población.

Otra limitación a tener en cuenta es el número de polimorfismos analizados. En este trabajo se analizaron los polimorfismos necesarios para clasificar los principales haplogrupos europeos. Evidentemente, existen un número elevado de polimorfismos presentes en cada cluster de haplogrupos que pueden ser los responsables de las

diferencias fenotípicas que conducen al desarrollo de la enfermedad. Aunque costosa, la secuenciación completa de todas las muestras podría indicar todos aquellos polimorfismos más frecuentemente representados en los individuos enfermos.

En este estudio hemos observado polimorfismos sobre o infrarepresentados en los pacientes con CI. En base a la literatura, hemos hipotetizado acerca de cómo los cambios aminoácidicos que producen dichos polimorfismos pueden contribuir a la producción de ERO, formación del trombo e isquemia. En este caso, se requiere la realización de un estudio funcional, por ejemplo, midiendo producción de ERO en cíbridos mitocondriales (células resultantes de la fusión de una línea celular parental sin ADNmt y células enucleadas) que incorporen los polimorfismos que se desean analizar.

En cuanto a las variables clínicas recogidas, algunas de ellas como por ejemplo el hábito de fumar estaban sujetas a las repuestas de los pacientes, por lo tanto alguna de ellas podría no ser exacta. Sin embargo, variables cuantitativas más específicas como el nivel de colesterol o la hipertensión fueron recogidas por el personal sanitario. En este sentido, la recopilación de un número de variables clínicas superior hubiese permitido un análisis estadístico más completo.

**Análisis del proteoma mitocondrial de corazones con cardiopatía isquémica.** El modelo animal porcino aportó numerosas ventajas a este estudio, entre ellas la similitud del modelo de I/R con respecto al humano. Sin embargo, el tamaño muestral aparece limitado por el coste y los requerimientos logísticos necesarios para mantener animales de gran tamaño. Por otro lado, el coste en tiempo y dinero que implica el uso del HPLC y espectrómetro de masas se volvería inasumible, y la posibilidad de simplificar el análisis en pro de aumentar el número de muestras analizadas afectaría a la calidad de los resultados obtenidos.

El modelo de simulación de isquemia desarrollado en este estudio es muy valioso clínicamente, aproximándose a un modelo real de CI. Sin embargo, la causa de la isquemia en pacientes suele ser la acumulación de LDL, ruptura de la placa de ateroma y posterior obstrucción del vaso. Es por ello que pese a la ventaja de la proximidad, homogeneidad y simplicidad del modelo, la acumulación progresiva de LDL en la pared arterial y el preconditionamiento isquémico que esto ocasiona<sup>257</sup>, está ausente en este modelo.

Aunque las bases de datos porcinas empleadas en este estudio para realizar la búsqueda e identificación de proteínas partiendo de péptidos es cada vez mayor, las bases de datos del proteoma del cerdo son todavía incompletas. Además, el catálogo de fragmentos de ARNm porcinos es muy amplio, aunque muchas secuencias se encuentran aún sin asociar con sus homólogos proteicos. Como solución a este problema, en este estudio se empleó una base de datos híbrida cerdo-humano. Sin embargo, muchas de las proteínas de bajo peso molecular digeridas en pocos péptidos presentan altas probabilidades de no ser detectadas.

En este estudio se analizó cada muestra individualmente y se obtuvo una cuantificación total del número de espectros encontrados para cada proteína. De esta forma se pudo comparar el número de espectros de una misma proteína en las diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, esta aproximación no es válida cuando se intentan hacer comparaciones entre los niveles de expresión entre distintas proteínas. Esto se debe a que las proteínas con peso molecular elevado son digeridas en un mayor número de péptidos, por tanto, el número de espectros identificados es mayor que en una proteína de menor peso molecular. Es por ello que esta aproximación proteómica permite evaluar la respuesta de una proteína específica en diferentes condiciones y no como un sistema de cuantificación absoluto para comparar la concentración de distintas proteínas en una misma muestra.

Tras observar las proteínas que modificaban su expresión en cada una de las condiciones se ha procedido al análisis molecular (western blot y PCR a tiempo real) y tisular (inmunohistoquímica e inmunofluorescencia) de las proteínas HSP60, BRP44L, VDAC1 y LONP1. Esto supone una pequeña parte del estudio de las proteínas diferencialmente expresadas. Es por ello que este trabajo debe tomarse como punto de partida para el estudio de las proteínas mitocondriales encontradas diferencialmente expresadas en diferentes etapas del proceso de I/R.

## **6. Valoraciones finales y direcciones futuras**

La mitocondria está involucrada en los procesos que conducen tanto al desarrollo como a la evolución de la CI. Los haplogrupos mitocondriales y los polimorfismos que los definen contribuyen a la aparición de enfermedades en las cuales diferencias en la energética mitocondrial y la producción de EROs participan en el avance hacia el estado patológico. Este estudio muestra la asociación de los

haplogrupos mitocondriales H y J como factores de riesgo y de protección para la cardiomiopatía isquémica, respectivamente. Futuros análisis de la secuencia completa del ADNmt en estos haplogrupos, podrán identificar todos aquellos polimorfismos responsables de las diferencias fenotípicas asociadas a una mayor o menor predisposición para el desarrollo de la enfermedad. Así, estos resultados no hacen más que contribuir hacia la idea de que el perfil genético del paciente es, junto con los factores de riesgo clásicos, importante para evaluar el riesgo real para el desarrollo de una determinada enfermedad.

Por otra parte, la isquemia y posterior reperfusión provoca un amplio rango de cambios funcionales y estructurales en la mitocondria. Es por ello que un punto fundamental a la hora analizar las rutas que podrían estar afectadas durante la CI es la identificación de todas aquellas proteínas mitocondriales diferencialmente expresadas en el estado patológico. En este estudio se observó una clara diferencia en el proteoma mitocondrial 3 y 15 días tras la reperfusión en la zona sana situada próxima a la infartada en un modelo porcino de I/R. En el tercer día tras la isquemia fue patente el incremento de proteínas relacionadas con el metabolismo del piruvato, producto de la glucólisis, ciclo de Krebs y estrés oxidativo, mientras que a los quince días la expresión de dichas proteínas disminuyó, sugiriendo una cierta estabilización del tejido tras un periodo de estrés oxidativo agudo.

Además, se identificaron y analizaron proteínas mitocondriales y genes no descritos anteriormente en la CI, como la proteína BRP44L o VDAC1. Por tanto, en este estudio se señala la importancia de estas proteínas en el equilibrio metabólico de la mitocondria en la situación de estrés que subsigue a la isquemia días. En este sentido, aproximaciones que contemplen el estudio de estas proteínas utilizando modelos *in vitro* o *in vivo* de ganancia y pérdida de función, resultarán de vital importancia.

## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

1. Los haplogrupos mitocondriales H y J constituyen, respectivamente, factores de riesgo y protección para el desarrollo de cardiopatía isquémica en una población española. La asociación de estos haplogrupos con todos los factores comunes de riesgo cardiovascular fue estadísticamente descartada, confirmando a los haplogrupos mitocondriales como factores independientes de estimación de riesgo.
2. El alelo C para el sitio polimórfico 14766 (m.14766C>T), asociado con los haplogrupos H y V, fue identificado como factor de riesgo en este estudio. Su manifestación fenotípica, un cambio conformacional en el citocromo bc1 que incrementa la eficiencia del complejo III, podría explicar en parte el riesgo asociado al haplogrupo mitocondrial H.
3. Los SNPs m.10398A>G y m.4216T>C, fueron identificados como factores de protección para la cardiopatía isquémica en este estudio. Fenotípicamente, el descenso de la actividad de las subunidades 3 y 1 de la NADH deshidrogenasa asociados respectivamente a estos SNPs, podría suponer un descenso en los niveles de producción basal de ERO y contribuir como factores de protección.
4. El modelo porcino de isquemia y reperfusión desarrollado en este trabajo resulta adecuado para el estudio de los procesos mitocondriales derivados de la alteración de la carga de trabajo contráctil en regiones no isquémicas del ventrículo izquierdo, como consecuencia de la pérdida de contractibilidad en regiones directamente afectadas por la isquemia.
5. El análisis del proteoma mitocondrial de la región sana, cercana a la zona isquémica del ventrículo izquierdo, demostró tras tres días la preponderancia de respuestas agudas a cambios bruscos en la demanda energética. Una vez superada la fase aguda, tras quince días, el miocardio de esa misma región se estabiliza a nivel energético, presentando un patrón mitocondrial más semejante al basal.

6. Hemos identificado alteraciones en la expresión de proteínas mitocondriales relacionadas con una inversión en patrón metabólico para la obtención de energía en forma de ATP. En particular, hemos demostrado por vez primera el incremento de los transportadores de piruvato BRP44 y BRP44L tras isquemia miocárdica. Su incremento en la expresión, validada en un modelo *in vitro* de isquemia con cardiomiocitos, es coherente con un desvío hacia la utilización de la glucólisis como fuente primaria de ATP durante el estrés agudo.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## VII. BIBIOGRAFÍA

1. Opie, L. H. *Heart Physiology*. (Lippincott Williams Wilkins, 2004).
2. Corno, A. F., Kocica, M. J. & Torrent-Guasp, F. The helical ventricular myocardial band of Torrent-Guasp: potential implications in congenital heart defects. *Eur J Cardiothorac Surg* **29 Suppl 1**, S61–8 (2006).
3. Klabunde, R. *Cardiovascular Physiology Concepts*. (LWW, 2011).
4. Torrent-Guasp, F. *et al.* Spatial orientation of the ventricular muscle band: physiologic contribution and surgical implications. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **122**, 389–392 (2001).
5. Rogers, K. *The Cardiovascular System*. (The Rosen Publishing Group, 2010).
6. Ross, M. H., Kaye, G. I. & Pawlina, W. *Histología*. (2004).
7. Buckberg, G., Hoffman, J. I. E., Mahajan, A., Saleh, S. & Coghlan, C. Cardiac Mechanics Revisited: The Relationship of Cardiac Architecture to Ventricular Function. *Circulation* **118**, 2571–2587 (2008).
8. Fritsch, H. & Wolfgang Kühnel, H. F. *Color Atlas of Human Anatomy, Volume 2*. (Thieme, 2008).
9. Katz, A. M. *Physiology of the Heart*. (Lippincott Williams Wilkins, 2010).
10. Rosendorff, C. *Essential Cardiology*. (Humana Press, 2005).
11. Bergmann, O. *et al.* Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science* **324**, 98–102 (2009).
12. Hill, J. & Olson, E. *Muscle*. (Academic Press, 2012).
13. Moore, K. L. & Agur, A. M. R. *Fundamentos de anatomía*. (Ed. Médica Panamericana, 2003).
14. Baudino, T. A. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *AJP: Heart and Circulatory Physiology* **291**, H1015–H1026 (2006).
15. Banerjee, I., Yekkala, K., Borg, T. K. & Baudino, T. A. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1080**, 76–84 (2006).
16. Akiyama-Uchida, Y. *et al.* Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts. *Hypertension* **40**, 148–154 (2002).
17. Chouaib, S. *et al.* Endothelial cells as key determinants of the tumor microenvironment: interaction with tumor cells, extracellular matrix and immune killer cells. *Crit. Rev. Immunol.* **30**, 529–545 (2010).
18. van Gils, J. M., Zwaginga, J. J. & Hordijk, P. L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 195–204 (2009).
19. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 803–815 (2007).
20. Mancardi, D., Pla, A. F., Moccia, F., Tanzi, F. & Munaron, L. Old and new gasotransmitters in the cardiovascular system: focus on the role of nitric oxide and hydrogen sulfide in endothelial cells and cardiomyocytes. *Curr Pharm Biotechnol* **12**, 1406–1415 (2011).
21. Allahverdian, S. & Francis, G. A. Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc. Med.* **20**, 96–102 (2010).

22. Schwartz, S. M. & Murry, C. E. Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions. *Annu. Rev. Med.* **49**, 437–460 (1998).
23. Iyemere, V. P., Proudfoot, D., Weissberg, P. L. & Shanahan, C. M. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Intern. Med.* **260**, 192–210 (2006).
24. Faxon, D. P. *et al.* Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* **109**, 2617–2625 (2004).
25. Rahmani, M., Cruz, R. P., Granville, D. J. & McManus, B. M. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circulation Research* **99**, 801–815 (2006).
26. Rosca, M. G. & Hoppel, C. L. Mitochondria in heart failure. *Cardiovascular Research* **88**, 40–50 (2010).
27. Passarge *Génética*. (Ed. Médica Panamericana, 2010).
28. Yakes, F. M. & Van Houten, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *PNAS* **94**, 514–519 (1997).
29. Corral-Debrinski, M. *et al.* Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. Implications for cardiac disease. *JAMA* **266**, 1812–1816 (1991).
30. Corral-Debrinski, M., Shoffner, J. M., Lott, M. T. & Wallace, D. C. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat. Res.* **275**, 169–180 (1992).
31. Puddu, P., Puddu, G. M., Galletti, L., Cravero, E. & Muscari, A. Mitochondrial Dysfunction as an Initiating Event in Atherogenesis: A Plausible Hypothesis. *Cardiology* **103**, 137–141 (2005).
32. Torroni, A. & Wallace, D. C. MtDNA haplogroups in Native Americans. *Am J Hum Genet* **56**, 1234–1238 (1995).
33. Eperon, I. C. I., Anderson, S. S. & Nierlich, D. P. D. Distinctive sequence of human mitochondrial ribosomal RNA genes. *Nature* **286**, 460–467 (1980).
34. Ruiz-Pesini, E. *et al.* Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* **67**, 682–696 (2000).
35. Santoro, A. *et al.* Mitochondrial DNA involvement in human longevity. *ACTA-BIOENERG* **1757**, 1388–1399 (2006).
36. Moreno-Loshuertos, R. R. *et al.* Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet* **38**, 1261–1268 (2006).
37. Pello, R. R. *et al.* Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *CORD Conference Proceedings* **17**, 4001–4011 (2008).
38. Marcuello, A. *et al.* Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion* **9**, 27–30 (2009).
39. van der Walt, J. M. J. *et al.* Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neuroscience Letters* **365**, 28–32 (2004).
40. van der Walt, J. M. *et al.* Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **72**, 804–811 (2003).
41. Guardado-Estrada, M. M. *et al.* The Amerindian mtDNA haplogroup B2 enhances the risk of HPV for cervical cancer: de-regulation of mitochondrial genes may be involved. *J Hum Genet* **57**, 269–276 (2012).
42. Rego-Pérez, I., Fernández-Moreno, M., Fernández-López, C., Arenas, J. & Blanco, F. J. Mitochondrial DNA haplogroups: Role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **58**, 2387–2396 (2008).

43. Gil Borlado, M. C. *et al.* Impact of the mitochondrial genetic background in complex III deficiency. *PLoS ONE* **5**, (2010).
44. Liu, M. *et al.* Mitochondrial dysfunction causing cardiac sodium channel downregulation in cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2012).doi:10.1016/j.yjmcc.2012.10.011
45. Planavila, A. *et al.* Dilated cardiomyopathy and mitochondrial dysfunction in Sirt1-deficient mice: a role for Sirt1-Mef2 in adult heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **53**, 521–531 (2012).
46. Duncan, J. G. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1351–1359 (2011).
47. Castro, M. G. *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* **112**, 202–206 (2006).
48. Rosa, A. *et al.* Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients. *BMC Med Genet* **9**, 57 (2008).
49. Chinnery, P. F., Elliott, H. R., Syed, A., Rothwell, P. M. & Study, F. T. O. V. Mitochondrial DNA haplogroups and risk of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: a genetic association study. *Lancet Neurol* **9**, 498–503 (2010).
50. Nishigaki, Y. *et al.* Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. *Hum Genet* **120**, 827–836 (2006).
51. Sawabe, M. M. *et al.* Mitochondrial haplogroups A and M7a confer a genetic risk for coronary atherosclerosis in the Japanese elderly: an autopsy study of 1,536 patients. *CORD Conference Proceedings* **18**, 166–175 (2011).
52. Gomez-Arroyo, J. *et al.* Metabolic Gene Remodeling and Mitochondrial Dysfunction in Failing Right Ventricular Hypertrophy due to Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Heart Fail* (2012).doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.966127
53. Abhijit, S. *et al.* Hyperinsulinemia-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation is mediated by converging mechanisms of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.* (2012).doi:10.1007/s11010-012-1478-5
54. Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* **333**, 1109–1112 (2011).
55. Madamanchi, N. R. & Runge, M. S. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation Research* **100**, 460–473 (2007).
56. Staniek, K. K. & Nohl, H. H. H(2)O(2) detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. *ACTA-BIOENERG* **1413**, 70–80 (1999).
57. Madamanchi, N. R. & Runge, M. S. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation Research* **100**, 460–473 (2007).
58. Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* **552**, 335–344 (2003).
59. Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J. & Camello, P. J. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *AJP: Cell Physiology* **291**, C1082–C1088 (2006).
60. Han, D., Canali, R., Rettori, D. & Kaplowitz, N. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1136–1144 (2003).
61. Ballinger, S. W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine* **38**, 1278–1295 (2005).
62. ge, W. D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological*

- Reviews* **82**, 47–95 (2002).
63. Turrens, J. F., Freeman, B. A., Levitt, J. G. & Crapo, J. D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 401–410 (1982).
  64. Waypa, G. B. G. & Schumacker, P. T. P. O<sub>2</sub> sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens. *Respir Physiol Neurobiol* **132**, 81–91 (2002).
  65. Echtay, K. S. K. *et al.* Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96–99 (2002).
  66. Teshima, Y., Akao, M., Jones, S. P. & Marbán, E. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circulation Research* **93**, 192–200 (2003).
  67. Ide, T. *et al.* Direct Evidence for Increased Hydroxyl Radicals Originating From Superoxide in the Failing Myocardium. *Circulation Research* **86**, 152–157 (2000).
  68. Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* **13**, 952–961 (2007).
  69. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59**, 527–605 (1979).
  70. Phung, C. D., Ezieme, J. A. & Turrens, J. F. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 479–482 (1994).
  71. Kloner, R. A. & Jennings, R. B. Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Clinical Implications: Part 1. *Circulation* **104**, 2981–2989 (2001).
  72. Kloner, R. A. & Jennings, R. B. Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Clinical Implications: Part 2. *Circulation* **104**, 3158–3167 (2001).
  73. Koenig, W., Löwel, H., Baumert, J. & Meisinger, C. C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. *Circulation* **109**, 1349–1353 (2004).
  74. Aspelund, T. *et al.* Analysing the large decline in coronary heart disease mortality in the Icelandic population aged 25-74 between the years 1981 and 2006. *PLoS ONE* **5**, e13957 (2010).
  75. DAWBER, T. R., MEADORS, G. F. & MOORE, F. E. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health* **41**, 279–281 (1951).
  76. Chambless, L. E. *et al.* Coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *J Clin Epidemiol* **56**, 880–890 (2003).
  77. Cooper, J. A., Miller, G. J. & Humphries, S. E. A comparison of the PROCAM and Framingham point-scoring systems for estimation of individual risk of coronary heart disease in the Second Northwick Park Heart Study. *Atherosclerosis* **181**, 93–100 (2005).
  78. Marenberg, M. E., Risch, N., Berkman, L. F., Floderus, B. & de Faire, U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1041–1046 (1994).
  79. McCarthy, J. J. *et al.* Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes. *J. Med. Genet.* **41**, 334–341 (2004).
  80. Karlamangla, A. S., Merkin, S. S., Crimmins, E. M. & Seeman, T. E. Socioeconomic and ethnic disparities in cardiovascular risk in the United States, 2001-2006. *Ann*

- Epidemiol* **20**, 617–628 (2010).
81. Safford, M. M. *et al.* Association of race and sex with risk of incident acute coronary heart disease events. *JAMA* **308**, 1768–1774 (2012).
  82. Wilson, P. W. *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97**, 1837–1847 (1998).
  83. Moens, A. L., Claeys, M. J., Timmermans, J. P. & Vrints, C. J. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int. J. Cardiol.* **100**, 179–190 (2005).
  84. Lee, K. L. *et al.* Predictors of 30-day mortality in the era of reperfusion for acute myocardial infarction. Results from an international trial of 41,021 patients. GUSTO-I Investigators. *Circulation* **91**, 1659–1668 (1995).
  85. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. The GUSTO investigators. *N. Engl. J. Med.* **329**, 673–682 (1993).
  86. Weber, K. T. Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. *Circulation* **96**, 2488–2492 (1997).
  87. Vasquez, C., Benamer, N. & Morley, G. E. The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **57**, 380–388 (2011).
  88. Matsui, Y., Morimoto, J. & Uede, T. Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. *World J Biol Chem* **1**, 69–80 (2010).
  89. Cao, Y. Therapeutic angiogenesis for ischemic disorders: what is missing for clinical benefits? *Discov Med* **9**, 179–184 (2010).
  90. Eriksson, A. *et al.* Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability. *Circulation* **107**, 1532–1538 (2003).
  91. Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 333–343 (2009).
  92. Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135–1143 (2002).
  93. Yoshida, H. & Kisugi, R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin. Chim. Acta* **411**, 1875–1882 (2010).
  94. Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J. & Zeiher, A. M. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the ‘response to injury’ hypothesis. *Circulation* **95**, 1760–1763 (1997).
  95. Walter, D. H., Haendeler, J., Galle, J., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria. *Circulation* **98**, 1153–1157 (1998).
  96. Zmijewski, J. W. *et al.* Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H852–61 (2005).
  97. Chae, I.-H., Park, K.-W., Kim, H.-S. & Oh, B.-H. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin. Chim. Acta* **341**, 83–91 (2004).
  98. Vindis, C. Two Distinct Calcium-Dependent Mitochondrial Pathways Are Involved in Oxidized LDL-Induced Apoptosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25**, 639–645 (2005).
  99. Boveris, A. & Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General



- properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**, 707–716 (1973).
100. Csiszar, A., Labinsky, N., Orosz, Z. & Ungvari, Z. Altered mitochondrial energy metabolism may play a role in vascular aging. *Medical Hypotheses* **67**, 904–908 (2006).
  101. Griffith, T. M., Edwards, D. H., Newby, A. C., Lewis, M. J. & Henderson, A. H. Production of endothelium derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. *Cardiovascular Research* **20**, 7–12 (1986).
  102. Chen, W., Wetsel, W., Steenbergen, C. & Murphy, E. Effect of ischemic preconditioning and PKC activation on acidification during ischemia in rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **28**, 871–880 (1996).
  103. Kadenbach, B., Ramzan, R., Moosdorf, R. & Vogt, S. The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure. *Mitochondrion* **11**, 700–706 (2011).
  104. Hardy, L., Clark, J. B., Darley-USmar, V. M., Smith, D. R. & Stone, D. Reoxygenation-dependent decrease in mitochondrial NADH:CoQ reductase (Complex I) activity in the hypoxic/reoxygenated rat heart. *Biochem J* **274** ( Pt 1), 133–137 (1991).
  105. Ferrari, R. *et al.* Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischaemia and reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* **88**, 495–512 (1993).
  106. Ferrari, R. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **28 Suppl 1**, S1–10 (1996).
  107. Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews* **87**, 99–163 (2007).
  108. Weiss, J. N., Korge, P., Honda, H. M. & Ping, P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circulation Research* **93**, 292–301 (2003).
  109. Chipuk, J. E. J., Moldoveanu, T. T., Llambi, F. F., Parsons, M. J. M. & Green, D. R. D. The BCL-2 family reunion. *CORD Conference Proceedings* **37**, 299–310 (2010).
  110. Walensky, L. D. L. & Gavathiotis, E. E. BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem Sci* **36**, 642–652 (2011).
  111. Cheng, E. H. Y., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J. & Korsmeyer, S. J. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**, 513–517 (2003).
  112. Antignani, A. A. & Youle, R. J. R. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* **18**, 685–689 (2006).
  113. Li, P. P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489 (1997).
  114. Acehan, D. D. *et al.* Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**, 423–432 (2002).
  115. Scorrano, L. L. *et al.* BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *CORD Conference Proceedings* **300**, 135–139 (2003).
  116. *J. Biol. Chem.*-2008-Ghosh-5188-94. 1–7 (2008).
  117. Crompton, M. M., Ellinger, H. H. & Costi, A. A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* **255**, 357–360 (1988).
  118. Halestrap, A. P. A. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J* **278** ( Pt 3), 715–719 (1991).
  119. Baines, C. P. *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658–662 (2005).
  120. Ricci, J.-E. J. *et al.* Disruption of Mitochondrial Function during Apoptosis Is Mediated



- by Caspase Cleavage of the p75 Subunit of Complex I of the Electron Transport Chain. *Cell* **117**, 773–786 (2004).
121. Krombach, G. A., Kinzel, S., Mahnken, A. H., Gänther, R. W. & Buecker, A. Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine. *Invest Radiol* **40**, 14–18 (2005).
  122. Rademaker, M. T. M. *et al.* Neurohormones in an ovine model of compensated postinfarction left ventricular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H731–H740 (2000).
  123. Knight, A. A. Reviewing existing knowledge prior to conducting animal studies. *Altern Lab Anim* **36**, 709–712 (2008).
  124. Madeddu, P. *et al.* Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic endpoints and relevance to clinical problems. *Vascul Pharmacol* **45**, 281–301 (2006).
  125. Hackam, D. G. & Redelmeier, D. A. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA* **296**, 1731–1732 (2006).
  126. Bolli, R. *et al.* Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circulation Research* **95**, 125–134 (2004).
  127. Verdouw, P. D. P., van den Doel, M. A. M., de Zeeuw, S. S. & Duncker, D. J. D. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovascular Research* **39**, 121–135 (1998).
  128. Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A. & Schulz, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff—still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods* **55**, 113–126 (2007).
  129. Zimmer, H.-G. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol. Sci.* **13**, 203–210 (1998).
  130. Klocke, R. R., Tian, W. W., Kuhlmann, M. T. M. & Nikol, S. S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovascular Research* **74**, 29–38 (2007).
  131. Ytrehus, K. K. The ischemic heart—experimental models. *Pharmacol Res* **42**, 193–203 (2000).
  132. Avkiran, M. M. & Curtis, M. J. M. Independent dual perfusion of left and right coronary arteries in isolated rat hearts. *Am J Physiol* **261**, H2082–H2090 (1991).
  133. Fletcher, A. J. W. *et al.* Effects of gestational age and cortisol treatment on ovine fetal heart function in a novel biventricular Langendorff preparation. *The Journal of Physiology* **562**, 493–505 (2005).
  134. Neely, J. R. J., Liebermeister, H. H., Battersby, E. J. E. & Morgan, H. E. H. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol* **212**, 804–814 (1967).
  135. Chinchoy, E. E. *et al.* Isolated four-chamber working swine heart model. *Ann Thorac Surg* **70**, 1607–1614 (2000).
  136. Hill, A. J. A. *et al.* In vitro studies of human hearts. *CORD Conference Proceedings* **79**, 168–177 (2005).
  137. Gauthier, N. S. N., Matherne, G. P. G., Morrison, R. R. R. & Headrick, J. P. J. Determination of Function in the Isolated Working Mouse Heart: Issues in Experimental Design. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **30**, 453–461 (1998).
  138. Nossuli, T. O. T. *et al.* A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1049–H1055 (2000).
  139. Dewald, O. O. *et al.* Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory

- response following myocardial infarction. *Am J Pathol* **164**, 665–677 (2004).
140. St Louis, J. D. *et al.* An experimental model of chronic myocardial hibernation. *Ann Thorac Surg* **69**, 1351–1357 (2000).
141. Roth, D. M. *et al.* Effects of left circumflex Ameroid constrictor placement on adrenergic innervation of myocardium. *Am J Physiol* **253**, H1425–34 (1987).
142. Iannini, J. P. & Spinale, F. G. The identification of contributory mechanisms for the development and progression of congestive heart failure in animal models. *J. Heart Lung Transplant.* **15**, 1138–1150 (1996).
143. Sabbah, H. N. *et al.* A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations. *Am J Physiol* **260**, H1379–84 (1991).
144. Suzuki, M., Asano, H., Tanaka, H. & Usuda, S. Development and evaluation of a new canine myocardial infarction model using a closed-chest injection of thrombogenic material. *Jpn. Circ. J.* **63**, 900–905 (1999).
145. van Wijngaarden, J. *et al.* Effects of early angiotensin-converting enzyme inhibition in a pig model of myocardial ischemia and reperfusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **19**, 408–416 (1992).
146. Carll, A. P., Willis, M. S., Lust, R. M., Costa, D. L. & Farraj, A. K. Merits of non-invasive rat models of left ventricular heart failure. *Cardiovasc. Toxicol.* **11**, 91–112 (2011).
147. Abassi, Z., Goltsman, I., Karram, T., Winaver, J. & Hoffman, A. Aortocaval fistula in rat: a unique model of volume-overload congestive heart failure and cardiac hypertrophy. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 729497 (2011).
148. Doetschman, T. & Azhar, M. Cardiac-specific inducible and conditional gene targeting in mice. *Circulation Research* **110**, 1498–1512 (2012).
149. Tsutsui, M., Shimokawa, H., Otsuji, Y. & Yanagihara, N. Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: novel insight from mice lacking all NO synthases. *Pharmacol. Ther.* **128**, 499–508 (2010).
150. *Ultrasound in medicine & biology.*
151. Georgakopoulos, D. *et al.* In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am J Physiol* **274**, H1416–22 (1998).
152. Phoon, C. K. L. Imaging tools for the developmental biologist: ultrasound biomicroscopy of mouse embryonic development. *Pediatr. Res.* **60**, 14–21 (2006).
153. Endoh, M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 73–86 (2004).
154. Haghghi, K. *et al.* Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J. Clin. Invest.* **111**, 869–876 (2003).
155. Hasenfuss, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular Research* **39**, 60–76 (1998).
156. Bers, D. M. Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **34**, 369–373 (2002).
157. Ginis, I. *et al.* Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **269**, 360–380 (2004).
158. Reimer, K. A. & Jennings, R. B. The changing anatomic reference base of evolving myocardial infarction. Underestimation of myocardial collateral blood flow and overestimation of experimental anatomic infarct size due to tissue edema, hemorrhage and acute inflammation. *Circulation* **60**, 866–876 (1979).
159. Jugdutt, B. I. & Menon, V. Valsartan-induced cardioprotection involves angiotensin II type 2 receptor upregulation in dog and rat models of in vivo reperfused myocardial infarction. *J. Card. Fail.* **10**, 74–82 (2004).

160. van der Spoel, T. I. G. *et al.* Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovascular Research* **91**, 649–658 (2011).
161. Yamanishi, K., Fujita, M., Ohno, A. & Sasayama, S. Importance of myocardial ischaemia for recruitment of coronary collateral circulation in dogs. *Cardiovascular Research* **24**, 271–277 (1990).
162. Maxwell, M. P., Hearse, D. J. & Yellon, D. M. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovascular Research* **21**, 737–746 (1987).
163. Gorman, J. H. *et al.* Infarct size and location determine development of mitral regurgitation in the sheep model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **115**, 615–622 (1998).
164. Jackson, B. M. *et al.* Border zone geometry increases wall stress after myocardial infarction: contrast echocardiographic assessment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H475–9 (2003).
165. Barallobre-Barreiro, J. *et al.* Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **125**, 789–802 (2012).
166. Jackson, B. M. *et al.* Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 1160–7– discussion 1168–71 (2002).
167. Teramoto, N. *et al.* Experimental pig model of old myocardial infarction with long survival leading to chronic left ventricular dysfunction and remodeling as evaluated by PET. *J. Nucl. Med.* **52**, 761–768 (2011).
168. Barallobre-Barreiro, J. *et al.* Gene expression profiles following intracoronary injection of mesenchymal stromal cells using a porcine model of chronic myocardial infarction. *Cytotherapy* **13**, 407–418 (2011).
169. Czaplicki, J., Blońska, B. & Religa, Z. The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human. *J. Heart Lung Transplant.* **11**, 393–397 (1992).
170. Konertz, W. *et al.* Right ventricular outflow tract reconstruction with decellularized porcine xenografts in patients with congenital heart disease. *J. Heart Valve Dis.* **20**, 341–347 (2011).
171. Mukherjee, R. *et al.* Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation* **107**, 618–625 (2003).
172. Fan, B., Gorbach, D. M. & Rothschild, M. F. The pig genome project has plenty to squeal about. *Cytogenet. Genome Res.* **134**, 9–18 (2011).
173. Crick, S. J., Sheppard, M. N., Ho, S. Y., Gebstein, L. & Anderson, R. H. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J. Anat.* **193 ( Pt 1)**, 105–119 (1998).
174. Weaver, M. E., Pantely, G. A., Bristow, J. D. & Ladley, H. D. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovascular Research* **20**, 907–917 (1986).
175. Gonzalez-Juanatey, C. *et al.* Persistent left superior vena cava draining into the coronary sinus: report of 10 cases and literature review. *Clin Cardiol* **27**, 515–518 (2004).
176. Hamlin, R. L. & Smith, C. R. Categorization of common domestic mammals based upon their ventricular activation process. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **127**, 195–203 (1965).
177. Morton, D. B. & Griffiths, P. H. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* **116**, 431–436 (1985).

178. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**, 1853–1861 (1998).
179. MacGillivray, A. J. & Rickwood, D. The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. *Eur. J. Biochem.* **41**, 181–190 (1974).
180. O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021 (1975).
181. Horvatovich, P., Hoekman, B., Govorukhina, N. & Bischoff, R. Multidimensional chromatography coupled to mass spectrometry in analysing complex proteomics samples. *J Sep Sci* **33**, 1421–1437 (2010).
182. Tomás, R., Klepárník, K. & Foret, F. Multidimensional liquid phase separations for mass spectrometry. *J Sep Sci* **31**, 1964–1979 (2008).
183. Voshol, H., Ehrat, M., Traenkle, J., Bertrand, E. & van Oostrum, J. Antibody-based proteomics: analysis of signaling networks using reverse protein arrays. *FEBS J.* **276**, 6871–6879 (2009).
184. Sharp, V. & Utz, P. J. Technology insight: can autoantibody profiling improve clinical practice? *Nat Clin Pract Rheumatol* **3**, 96–103 (2007).
185. Ross, P. L. *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics* **3**, 1154–1169 (2004).
186. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* **389**, 1017–1031 (2007).
187. Gallien, S. *et al.* Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell Proteomics* (2012).doi:10.1074/mcp.O112.019802
188. Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Lane, C. S., Elliott, V. L. & Park, B. K. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**, 1229–1239 (2009).
189. DeSouza, L. V. *et al.* Multiple reaction monitoring of mTRAQ-labeled peptides enables absolute quantification of endogenous levels of a potential cancer marker in cancerous and normal endometrial tissues. *J. Proteome Res.* **7**, 3525–3534 (2008).
190. Fu, Q., Schoenhoff, F. S., Savage, W. J., Zhang, P. & Van Eyk, J. E. Multiplex assays for biomarker research and clinical application: translational science coming of age. *Proteomics Clin Appl* **4**, 271–284 (2010).
191. Corthals, G. L., Wasinger, V. C., Hochstrasser, D. F. & Sanchez, J. C. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* **21**, 1104–1115 (2000).
192. McGregor, E. & Dunn, M. J. Proteomics of the heart: unraveling disease. *Circulation Research* **98**, 309–321 (2006).
193. Michelsen, U. & Hagen, von, J. Isolation of subcellular organelles and structures. *Meth. Enzymol.* **463**, 305–328 (2009).
194. Agnetti, G., Husberg, C. & Van Eyk, J. E. Divide and conquer: the application of organelle proteomics to heart failure. *Circulation Research* **108**, 512–526 (2011).
195. Lee, Y. H., Tan, H. T. & Chung, M. C. M. Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. *Proteomics* **10**, 3935–3956 (2010).
196. Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G. & Hepple, R. T. Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of Physiology* **589**, 4413–4421 (2011).
197. Calvo, S. E. & Mootha, V. K. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **11**, 25–44 (2010).

198. Barthelery, M., Salli, U. & Vrana, K. E. Nuclear proteomics and directed differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **16**, 905–919 (2007).
199. Schröder, B. A., Wrocklage, C., Hasilik, A. & Saftig, P. The proteome of lysosomes. *Proteomics* **10**, 4053–4076 (2010).
200. Cordwell, S. J. & Thingholm, T. E. Technologies for plasma membrane proteomics. *Proteomics* **10**, 611–627 (2010).
201. Calvo, S. *et al.* Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet* **38**, 576–582 (2006).
202. Lopez, M. F. *et al.* High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis* **21**, 3427–3440 (2000).
203. Pagliarini, D. J. *et al.* A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* **134**, 112–123 (2008).
204. Hoye, A. T., Davoren, J. E., Wipf, P., Fink, M. P. & Kagan, V. E. Targeting mitochondria. *Acc. Chem. Res.* **41**, 87–97 (2008).
205. Basso, M. *et al.* Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* **4**, 3943–3952 (2004).
206. Da Cruz, S. & Martinou, J.-C. Purification and proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *Methods Mol. Biol.* **432**, 101–116 (2008).
207. Kim, N. *et al.* Potential biomarkers for ischemic heart damage identified in mitochondrial proteins by comparative proteomics. *Proteomics* **6**, 1237–1249 (2006).
208. Jüllig, M. *et al.* Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. *Proteomics* **8**, 2556–2572 (2008).
209. Major, T., Janowsky, von, B., Ruppert, T., Mogk, A. & Voos, W. Proteomic analysis of mitochondrial protein turnover: identification of novel substrate proteins of the matrix protease pim1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 762–776 (2006).
210. Bugger, H. *et al.* Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovascular Research* **85**, 376–384 (2010).
211. Urbonavicius, S. *et al.* Proteomic analysis identifies mitochondrial metabolic enzymes as major discriminators between different stages of the failing human myocardium. *Acta Cardiol* **64**, 511–522 (2009).
212. Essop, M. F., Chan, W. A. & Hattingh, S. Proteomic analysis of mitochondrial proteins in a mouse model of type 2 diabetes. *Cardiovasc J Afr* **22**, 175–178 (2011).
213. Hunzinger, C. *et al.* Comparative profiling of the mammalian mitochondrial proteome: multiple aconitase-2 isoforms including N-formylkynurenine modifications as part of a protein biomarker signature for reactive oxidative species. *J. Proteome Res.* **5**, 625–633 (2006).
214. Little, J. *et al.* Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the STROBE Statement. *Hum Genet* **125**, 131–151 (2009).
215. Radford, M. J. *et al.* ACC/AHA key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with chronic heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards (Writing Committee to Develop Heart Failure Clinical Data Standards): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Failure Society of America. *Circulation* **112**, 1888–1916 (2005).
216. Rego, I., Fernandez-Moreno, M., Relaño, S., Arenas, J. & Blanco, F. J. The Use of Single Base Extension (SBE) for the Assessment of European Mitochondrial DNA Haplogroups in Galician Population. *The Open Cell Development & Biology Journal*
217. Fernández Caggiano, M. *et al.* Mitochondrial Haplogroups H and J: Risk and



- Protective Factors for Ischemic Cardiomyopathy. *PLoS ONE* **7**, e44128 (2012).
218. Simpson, J. M. & Cook, A. Repeatability of echocardiographic measurements in the human fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol* **20**, 332–339 (2002).
219. Punn, A., Mockridge, J. W., Farooqui, S., Marber, M. S. & Heads, R. J. Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *Biochem J* **350 Pt 3**, 891–899 (2000).
220. Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. & Aebersold, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* **74**, 5383–5392 (2002).
221. Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E. & Aebersold, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646–4658 (2003).
222. Untergasser, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**, W71–4 (2007).
223. Nygard, A.-B., Jørgensen, C. B., Cirera, S. & Fredholm, M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* **8**, 67 (2007).
224. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
225. Kofler, B. *et al.* Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet* **10**, 35 (2009).
226. Mancuso, M. *et al.* Could mitochondrial haplogroups play a role in sporadic amyotrophic lateral sclerosis? *Neuroscience Letters* **371**, 158–162 (2004).
227. Torroni, A. *et al.* Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* **144**, 1835–1850 (1996).
228. Gallardo, M. E. *et al.* Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients. *Eur. Heart J.* **33**, 346–353 (2012).
229. Brodie, B. R. *et al.* Importance of time-to-reperfusion in patients with acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock treated with primary percutaneous coronary intervention. *Am. Heart J.* **145**, 708–715 (2003).
230. Leal, J., Luengo-Fernández, R., Gray, A., Petersen, S. & Rayner, M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur. Heart J.* **27**, 1610–1619 (2006).
231. Mozaffari, M. S. & Schaffer, S. W. Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury. *Hypertension* **42**, 1042–1049 (2003).
232. Yusuf, S., Reddy, S., Ounpuu, S. & Anand, S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* **104**, 2746–2753 (2001).
233. Palacín, M. *et al.* Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion* **11**, 176–181 (2011).
234. Benn, M., Schwartz, M., Nordestgaard, B. G. & Tybjaerg-Hansen, A. Mitochondrial Haplogroups: Ischemic Cardiovascular Disease, Other Diseases, Mortality, and Longevity in the General Population. *Circulation* **117**, 2492–2501 (2008).
235. Beckstead, W. A., Ebbert, M. T. W., Rowe, M. J. & McClellan, D. A. Evolutionary pressure on mitochondrial cytochrome b is consistent with a role of Cytb17T affecting longevity during caloric restriction. *PLoS ONE* **4**, e5836 (2009).
236. Martínez-Redondo, D. *et al.* Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO<sub>2</sub>max

- consumer--is it a paradox? *Mitochondrion* **10**, 102–107 (2010).
237. Kojda, G. & Harrison, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Research* **43**, 562–571 (1999).
238. Ross, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am. Heart J.* **138**, S419–20 (1999).
239. Navab, M. *et al.* The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **16**, 831–842 (1996).
240. Ogura, Y. *et al.* Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. *Circulation* **126**, 1728–1738 (2012).
241. Taylor, S. W. *et al.* Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat. Biotechnol.* **21**, 281–286 (2003).
242. Heinke, M. Y. *et al.* Protein changes observed in pacing-induced heart failure using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 2021–2030 (1998).
243. Neely, J. R. & Morgan, H. E. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **36**, 413–459 (1974).
244. Zhang, L., Keung, W., Samokhvalov, V., Wang, W. & Lopaschuk, G. D. Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 1–22 (2010).
245. Wambolt, R. B. *et al.* Glucose utilization and glycogen turnover are accelerated in hypertrophied rat hearts during severe low-flow ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31**, 493–502 (1999).
246. Renstrom, B., Liedtke, A. J. & Nellis, S. H. Mechanisms of substrate preference for oxidative metabolism during early myocardial reperfusion. *Am J Physiol* **259**, H317–23 (1990).
247. Herzig, S. *et al.* Identification and Functional Expression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Science* **337**, 93–96 (2012).
248. Bricker, D. K. *et al.* A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science* **337**, 96–100 (2012).
249. Lau, S., Patnaik, N., Sayen, M. R. & Mestril, R. Simultaneous overexpression of two stress proteins in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against ischemia-induced injury. *Circulation* **96**, 2287–2294 (1997).
250. Martin, J. L., Mestril, R., Hilal-Dandan, R., Brunton, L. L. & Dillmann, W. H. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation* **96**, 4343–4348 (1997).
251. Welch, W. J., Kang, H. S., Beckmann, R. P. & Mizzen, L. A. Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **167**, 31–55 (1991).
252. Lin, K. M. *et al.* Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation* **103**, 1787–1792 (2001).
253. Bulteau, A.-L., Lundberg, K. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. & Szveda, L. I. Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion. *PNAS* **102**, 5987–5991 (2005).
254. Zamzami, N. & Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 67–71 (2001).
255. Crompton, M., Barksby, E., Johnson, N. & Capano, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* **84**, 143–152

- (2002).
256. NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies *et al.* Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* **447**, 655–660 (2007).
  257. Vinten-Johansen, J. & Shi, W. Preconditioning and postconditioning: current knowledge, knowledge gaps, barriers to adoption, and future directions. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **16**, 260–266 (2011).



## **VIII. ANEXOS**



## VIII. ANEXOS

## FIGURAS

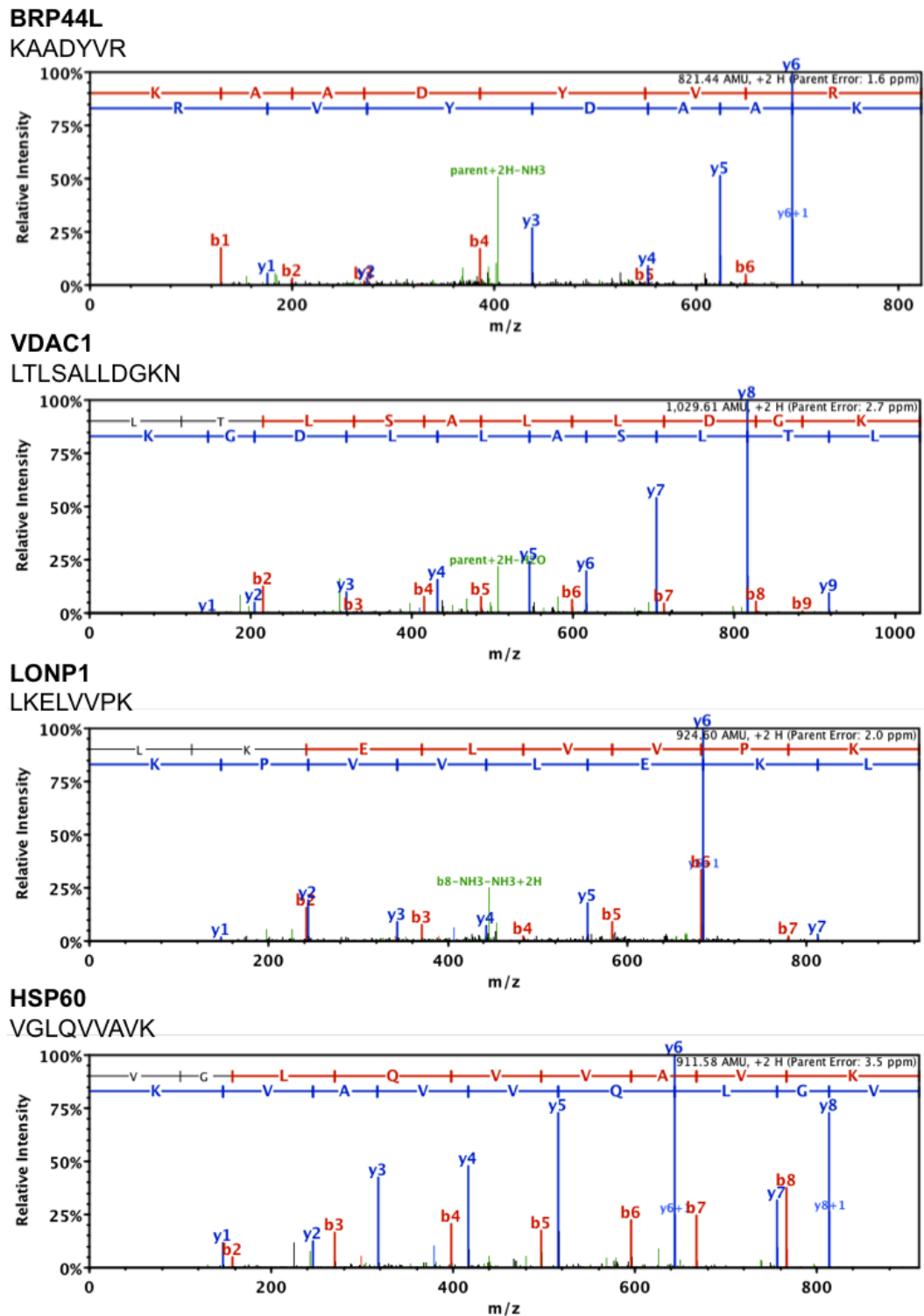


Figura suplementaria I. Espectros MS/MS representativos de las proteínas identificadas y validadas en este estudio.

**TABLAS**

**Tabla suplementaria I.** Material y métodos. Listado de anticuerpos utilizados en este estudio.

Molécula diana	Hospedador	Marcaje	Fabricante (referencia)	Dilución empleada
LONP1	Conejo		Abcam (ab103809)	WB (1:1000), IHQ (1:100) IF (1:100)
HSP60	Ratón		Abcam (ab13532)	WB (1:1000), IHQ (1:100) IF (1:100)
VDAC1	Conejo		Cell Signaling (4866)	WB (1:1000), IHQ (1:75) IF (1:100)
BRP44L	Conejo		Lifespan biosciences (LS-C-119789)	WB (1:1000), IHQ (1:100) IF (1:100)
ATP5A	Ratón		Abcam (ab110273)	WB (1:5000), IF (1:200)
Citocromo b	Conejo		Santa Cruz (sc-11436)	IF (1:100)
TRAP1	Ratón		Santa Cruz (sc-13134)	WB (1:1000), IHQ (1:100) IF (1:100)
GAPDH	Conejo		Abcam (ab9485)	WB (1:1000)
Mioglobina	Conejo		Abcam (ab9536)	WB (1:1000)
Miogenina	Conejo		Abcam (ab1835)	WB (1:1000)
Anti-Conejo	Cabra	HRP	Dako (P0448)	WB (1:2000)
Anti-Ratón	Cabra	HRP	Dako (K4006)	WB (1:2000)
Anti-Ratón Cy3	Cabra	Cyanine	Jackson Immuno Research (115-165-146)	IF (1:100)
Anti-Conejo Cy5	Burro	Cyanine	Jackson Immuno Research (711-175-152)	IF (1:100)
Anti-Conejo	Cabra	HRP	DAKO (K5007)	IHQ (1:100)
Anti-Ratón	Cabra	HRP	DAKO (K4007)	IHQ (1:100)

**Tabla suplementaria II.** Material y métodos. Lista de cebadores de ADN utilizados para los experimentos de expresión génica.

mRNA Diana	Oligo 5' →3'	Oligo 3'→ 5'	Referencia NCBI
LONP1	5'-gggtggcatcaagagaaga-3'	5'-ctcaggaaggcgatatcaa-3'	NM_001243220.1
HSP60	5'-gatgatgccatgctcttgaa-3'	5'-ccttcagcacagctacacca-3'	NM_001254716
VDAC1	5'-gacagcaggaaacagcaaca-3'	5'-cggacagcgtcagttgata-3'	NM_213960.1
BRP44L	5'-gcatgacagtggaaaacgaa-3'	5'-ctttaaggccgcagagttg-3'	NM_001244864
GAPDH	5'-gtcggttgtggatctgacct-3'	5'-agcttgacgaagtggtcgtt-3'	NM_001206359

**Tabla suplementaria III.** Resultados. Características de los cerdos utilizados para este trabajo.

Individuo	Peso corporal (kg)	Peso del corazón (g)	Área infartada (mm <sup>2</sup> )
Ctrl-1	27	129	0
Ctrl-2	28	150	0
Ctrl-3	27	129	0
Ctrl-4	30	159	0
Ctrl-5	25	110	0
Ctrl-6	19	90	0
<b>Media Ctrl</b>	<b>26,0±3,8</b>	<b>127,8±25,3</b>	<b>0,0±0,0</b>
I/R 3-1	20	97	300
I/R 3-2	22	90	875
I/R 3-3	21	75	700
I/R 3-4	19	96	375
I/R 3-5	24	117	375
<b>Media 3 I/R</b>	<b>21,2±1,9</b>	<b>95,0±15,1</b>	<b>525,0±249,4</b>
I/R 15-1	31	189	200
I/R 15-2	31	135	270
I/R 15-3	33	181	500
I/R 15-4	23	117	1050
I/R 15-5	21	150	750
I/R 15-6	20	90	1600
<b>Media 15 I/R</b>	<b>24,9±5,3</b>	<b>133,6±35,7</b>	<b>1068,9±706,5</b>



**Tabla suplementaria IV.** Resultados. Resumen del análisis proteómico para las proteínas mitocondriales identificadas.

Nombre de la proteína (296)	Código UniProt	KDa	Péptidos Únicos	Espectros Únicos	Max. % cobertura	Espectros asignados			
						Total	Media Control	Media 3 I/R	Media 15 I/R
ATP synthase subunit beta	ATPB_HUMAN	57	503	857	74.0	18708	1085.7	1112.4	1105.3
ATP synthase subunit alpha	ATPA_HUMAN	60	839	1245	65.0	17259	880.3	1150.8	1037.2
Malate dehydrogenase	MDHM_PIG	36	425	614	75.0	4665	266.3	273.8	283.0
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	IDHP_PIG	48	496	682	65.0	3941	218.7	228.6	247.7
Trifunctional enzyme subunit alpha	ECHA_PIG	83	612	795	64.0	2400	140.7	152.2	132.5
ATP synthase subunit O	ATPO_PIG	23	290	426	84.0	2381	144.3	134.4	140.5
Aspartate aminotransferase	AATM_PIG	47	440	612	80.0	2223	111.3	152.6	132.0
Creatine kinase S-type	KCRS_HUMAN	48	357	517	60.0	2142	115.3	127.6	135.3
ADP/ATP translocase 1	ADT1_HUMAN	33	336	439	61.0	1936	107.8	128.4	107.8
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	HCDH_PIG	34	376	502	77.0	1931	110.2	128.4	104.7
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1_PIG	31	330	436	87.0	1891	73.2	138.2	126.8
ATP synthase subunit e	ATP5I_PIG	8	147	218	80.0	1857	64.8	152.0	118.0
60 kDa heat shock protein	CH60_HUMAN	61	628	793	66.0	1818	91.3	135.8	98.5
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1	NDUV1_HUMAN	51	326	436	53.0	1766	97.5	113.0	102.7
Cytochrome b-c1 complex subunit 1	QCR1_HUMAN	53	217	302	21.0	1749	96.3	101.6	110.5
Aconitate hydratase	ACON_PIG	86	538	684	56.0	1703	95.2	109.4	97.5
Dihydrolipoyl dehydrogenase	DLDH_PIG	54	308	423	47.0	1398	79.5	87.2	80.8
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	ODO2_PIG	49	264	319	39.0	1304	75.0	83.8	72.5
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADL_PIG	48	322	422	48.0	1292	66.3	94.6	70.2
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	NDUS3_HUMAN	30	238	392	41.0	1184	58.3	72.6	78.5
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	NDUS1_HUMAN	79	388	502	38.0	1174	62.8	72.2	72.7
Citrate synthase	CISY_PIG	52	266	307	45.0	1165	57.5	76.8	72.7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	NDUV2_HUMAN	27	231	293	58.0	1165	65.5	76.4	65.0
Apoptosis-inducing factor 1	AIFM1_HUMAN	67	396	508	40.0	1121	60.7	66.8	70.5
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form	ODPA_PIG	43	312	363	71.0	1117	62.8	73.2	62.3
2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	ODO1_HUMAN	116	515	616	45.0	1106	63.5	78.0	55.8
Fumarate hydratase	FUMH_PIG	50	370	428	58.0	1075	47.5	81.6	63.7

Prohibitin-2	PHB2_HUMAN	33	296	344	64.0	1061	53.7	62.8	70.8
Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB_PIG	28	297	355	67.0	1018	55.8	74.6	51.7
Trifunctional enzyme subunit beta	ECHB_HUMAN	51	229	305	31.0	991	54.7	65.6	55.8
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADM_PIG	46	312	370	57.0	972	49.7	64.8	58.3
Prohibitin	PHB_HUMAN	30	235	294	74.0	950	54.3	56.6	56.8
Cytochrome c	CYC_PIG	12	266	460	79.0	925	43.8	60.6	59.8
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit	DHSB_HUMAN	32	166	184	41.0	901	49.2	56.4	54.0
Cytochrome b-c1 complex subunit 2	QCR2_HUMAN	48	106	128	19.0	896	45.3	51.4	61.2
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	IDH3A_HUMAN	40	185	229	39.0	894	47.0	64.0	48.7
Mitochondrial inner membrane protein	IMMT_HUMAN	84	470	577	32.0	847	45.7	56.8	48.2
Stress-70 protein	GRP75_HUMAN	74	322	390	47.0	817	40.8	57.0	47.8
Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1	SCOT_PIG	?	301	372	N/A	816	39.2	62.8	44.5
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	ODPB_HUMAN	39	120	156	29.0	805	46.8	52.2	43.8
Polymerase I and transcript release factor	PTRF_HUMAN	43	233	341	41.0	786	44.5	45.2	48.8
ATP synthase subunit d	ATP5H_HUMAN	18	114	143	19.0	728	40.8	46.4	41.8
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	COX41_PIG	11	171	287	75.0	690	35.8	51.0	36.7
Cytochrome c oxidase subunit 5B	COX5B_PIG	14	139	217	62.0	669	38.5	40.0	39.7
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	CMC1_HUMAN	75	314	367	42.0	668	37.7	44.4	36.7
ATP synthase subunit b	AT5F1_HUMAN	29	117	176	17.0	658	34.5	41.4	40.7
Electron transfer flavoprotein subunit alpha	ETFA_HUMAN	35	120	175	47.0	634	33.5	46.6	33.3
Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	M2OM_HUMAN	34	110	138	37.0	614	31.0	36.8	40.7
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	ETFD_PIG	68	282	327	38.0	600	37.8	39.6	29.2
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	DHSA_HUMAN	73	165	216	25.0	588	34.2	36.6	33.3
ATP synthase subunit gamma	ATPG_HUMAN	33	89	123	17.0	576	31.3	34.8	35.7
Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3	CHCH3_HUMAN	26	194	257	32.0	562	32.3	31.6	35.0
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta	IDH3B_HUMAN	42	138	218	27.0	547	32.8	37.0	27.5
ATP synthase subunit f	ATPK_PIG	10	68	89	56.0	532	31.2	33.2	29.8
Thioredoxin-dependent peroxide reductase	PRDX3_HUMAN	28	92	112	34.0	527	31.2	34.0	28.3
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta	SUCB2_PIG	47	209	228	48.0	480	26.7	41.8	18.5
Cytochrome c oxidase subunit 2	COX2_PIG	26	87	110	26.0	480	22.2	34.4	29.2
ATP synthase subunit alpha liver isoform	ATPA2_PIG	16	30	39	9.5	477	28.3	34.8	22.2
Elongation factor Tu	EFTU_HUMAN	50	158	202	26.0	463	28.3	30.2	23.7



Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADV_HUMAN	70	169	197	19.0	459	25.8	29.6	26.0
Superoxide dismutase [Mn]	SODM_PIG	16	123	161	43.0	424	26.3	30.6	18.8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	NDUA4_HUMAN	9	52	55	35.0	410	24.3	24.6	23.5
Acetyl-CoA acetyltransferase	THIL_HUMAN	45	141	177	23.0	396	21.2	25.8	23.3
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha	SUCA_PIG	36	112	158	32.0	392	21.5	28.6	20.0
Carnitine O-acetyltransferase	CACP_HUMAN	71	147	173	19.0	379	21.0	28.0	18.8
Cytochrome c oxidase subunit 5A	COX5A_HUMAN	17	52	72	41.0	374	21.7	19.2	24.7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8	NDUS8_HUMAN	24	113	121	37.0	373	23.2	21.8	20.8
10 kDa heat shock protein	CH10_HUMAN	11	135	163	79.0	372	18.3	28.0	20.3
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	SUCB1_PIG	46	182	201	52.0	372	24.8	23.4	17.7
Cytochrome c1, heme protein	CY1_HUMAN	35	91	103	28.0	370	19.3	26.8	20.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	NDUAD_HUMAN	17	140	202	39.0	356	21.7	21.4	19.8
Cytochrome c oxidase polypeptide 7A1	CX7A1_PIG	9	56	95	41.0	355	23.7	19.0	19.7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	NDUA2_HUMAN	11	112	143	38.0	353	20.5	25.4	17.2
Cytochrome b-c1 complex subunit 8	QCR8_HUMAN	10	59	83	23.0	346	20.8	23.2	17.5
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2	NDUS2_HUMAN	53	153	178	34.0	343	18.7	22.4	19.8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	NDUA7_HUMAN	13	104	132	36.0	339	21.2	22.2	16.8
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	BDH_HUMAN	38	86	86	18.0	338	22.7	21.0	16.2
Transcription factor A	TFAM_PIG	29	172	192	53.0	324	20.3	19.4	17.5
Protein DJ-1	PARK7_HUMAN	20	116	125	52.0	324	19.5	22.4	15.8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7	NDUS7_HUMAN	24	74	78	19.0	323	23.3	20.0	13.8
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADS_PIG	45	134	137	33.0	317	17.2	18.4	20.3
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9	COQ9_HUMAN	36	81	101	17.0	311	17.2	26.0	13.0
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	QCR7_HUMAN	14	102	126	38.0	303	16.8	17.2	19.3
Brain protein 44	BRP44_HUMAN	14	71	98	43.0	302	12.8	20.8	20.2
Cytochrome c oxidase subunit 6B1	CX6B1_HUMAN	10	65	81	33.0	296	15.0	18.0	19.3
Pyruvate dehydrogenase protein X component	ODPX_HUMAN	54	126	140	23.0	288	11.7	25.0	15.5
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9	NDUA9_HUMAN	43	51	72	12.0	280	17.0	18.4	14.3
NAD(P) transhydrogenase	NNTM_HUMAN	114	210	219	16.0	278	15.8	19.6	14.2

ATPase inhibitor	ATIF1_PIG	12	149	191	50.0	267	17.5	11.6	17.3
Brain protein 44-like protein	BRP44L_HUMAN	12	83	93	47.0	259	11.8	19.0	15.5
Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	ODP2_HUMAN	69	131	135	16.0	255	15.2	17.6	12.7
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	CPT1B_PIG	88	141	167	20.0	251	13.3	19.4	12.3
Mitochondrial fission 1 protein	FIS1_HUMAN	17	70	72	45.0	250	12.3	18.6	13.8
Glutamate dehydrogenase 1	DHE3_HUMAN	61	167	168	31.0	238	12.7	15.8	13.8
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HCD2_HUMAN	27	62	94	25.0	228	14.8	12.4	12.8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4	NDUS4_HUMAN	20	98	115	31.0	227	13.7	13.4	13.0
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC3_PIG	31	70	89	24.0	227	14.3	13.4	12.3
2,4-dienoyl-CoA reductase	DECR_HUMAN	36	58	58	20.0	223	12.8	13.2	13.3
Phosphate carrier protein	MPCP_HUMAN	40	74	80	20.0	222	13.7	11.2	14.0
Adenylate kinase 2	KAD2_HUMAN	26	98	101	60.0	217	12.7	13.8	12.0
Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	AL7A1_HUMAN	55	160	162	35.0	212	13.8	15.8	8.3
ATP synthase protein 8	ATP8_PIG	8	47	56	55.0	210	14.0	12.6	10.5
Lon protease homolog	LONM_HUMAN	106	116	121	13.0	206	12.7	15.0	9.2
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	NDUA8_HUMAN	20	69	120	27.0	203	12.3	11.0	12.3
Metaxin-2	MTX2_PIG	30	98	105	36.0	203	11.2	14.6	10.5
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha	SUCA_HUMAN	36	43	43	10.0	188	11.0	11.6	10.7
Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	COQ6_HUMAN	51	72	84	18.0	185	12.3	13.0	7.7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	NDUB6_PIG	15	84	103	44.0	179	9.3	11.8	10.7
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]	MMSA_HUMAN	58	96	96	20.0	178	9.7	12.0	10.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	NDUAC_HUMAN	17	56	84	17.0	173	9.3	12.0	9.5
Cytochrome c oxidase subunit 6C	COX6C_HUMAN	9	48	70	12.0	169	12.0	9.8	8.0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIF_HUMAN	22	97	107	28.0	168	8.2	13.0	9.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	NDUBA_HUMAN	21	41	56	13.0	163	11.0	9.8	8.0
NADH-cytochrome b5 reductase 3 (Fragment)	NB5R3_PIG	31	106	116	39.0	160	9.0	9.0	10.2
Superoxide dismutase [Mn]	SODM_HUMAN	25	14	22	9.9	156	3.2	15.0	10.3
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske-like protein 1	UCRIL_HUMAN	31	27	30	14.0	154	11.3	9.6	6.3
CDGSH iron sulfur domain-containing protein 3	CISD3_HUMAN	14	63	80	30.0	153	12.2	8.6	6.2

Hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase	COQ3_HUMAN	41	47	64	13.0	148	8.5	12.4	5.8
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	AL4A1_HUMAN	62	75	85	14.0	145	5.7	14.4	6.5
ATP synthase-coupling factor 6	ATP5J_PIG	9	85	106	84.0	143	5.5	10.2	9.8
Propionyl-CoA carboxylase beta chain	PCCB_PIG	59	77	88	23.0	141	8.7	12.6	4.3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10	NDUAA_HUMAN	41	44	44	7.6	138	9.2	7.6	7.5
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit	DHSB_PIG	32	28	40	9.3	137	10.7	9.6	4.2
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	NDUB9_HUMAN	22	46	62	17.0	136	9.0	9.2	6.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	NDUA5_HUMAN	13	39	43	15.0	130	9.8	4.2	8.3
ATP synthase subunit g	ATP5L_HUMAN	11	52	63	24.0	123	7.2	6.8	7.7
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	TIM44_HUMAN	51	56	58	12.0	121	6.2	8.4	7.0
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	IDH3A_PIG	10	28	34	33.0	118	8.3	9.0	3.8
ADP/ATP translocase 3	ADT3_HUMAN	33	34	34	11.0	117	4.3	8.8	7.8
Isovaleryl-CoA dehydrogenase	IVD_HUMAN	46	63	64	16.0	116	6.7	8.8	5.3
Hexokinase-1	HXK1_HUMAN	102	60	75	8.2	112	5.3	8.6	6.2
Chaperone activity of bc1 complex-like	ADCK3_HUMAN	72	51	51	11.0	111	7.0	8.0	4.8
Aconitate hydratase	ACON_HUMAN	85	45	59	4.0	109	5.5	7.4	6.5
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit	DHSD_PIG	17	43	48	28.0	108	5.2	9.6	4.8
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3HIDH_HUMAN	35	50	50	15.0	107	6.0	9.0	4.3
GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial	KAD3_HUMAN	26	56	65	24.0	106	3.5	8.6	7.0
3-ketoacyl-CoA thiolase	THIM_HUMAN	42	49	66	8.6	105	7.2	6.6	4.8
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14	TIM14_HUMAN	12	88	91	54.0	103	7.0	6.4	4.8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2	NDUC2_HUMAN	14	28	31	9.2	102	5.5	8.4	4.5
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	NDUA6_HUMAN	15	34	36	19.0	100	4.2	8.2	5.7
Thiosulfate sulfurtransferase	THTR_HUMAN	33	68	75	19.0	99	5.7	8.6	3.7
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma	IDH3G_HUMAN	43	58	75	28.0	93	4.5	10.0	2.7
ATP synthase subunit a	ATP6_PIG	25	16	23	10.0	92	2.3	2.4	11.0
Cytochrome b5	CYB5_PIG	15	57	74	45.0	87	4.2	7.2	4.3
ES1 protein homolog	ES1_HUMAN	28	41	44	10.0	85	4.3	6.8	4.2

NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6	NDUS6_HUMAN	14	18	21	18.0	80	7.2	2.0	4.5
ATP synthase subunit epsilon	ATP5E_HUMAN	6	24	24	29.0	78	4.3	5.4	4.2
Enoyl-CoA hydratase	ECHM_HUMAN	31	31	31	9.0	77	5.5	4.0	4.0
DnaJ homolog subfamily A member 3	DNJA3_HUMAN	53	56	60	14.0	75	4.8	5.4	3.2
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase	ECH1_HUMAN	36	28	28	6.1	74	3.5	6.0	3.8
28S ribosomal protein S36	RT36_HUMAN	11	42	60	25.0	72	4.0	5.2	3.7
Coenzyme Q-binding protein COQ10 homolog A	CQ10A_HUMAN	28	35	42	20.0	71	5.5	3.6	3.3
Cytochrome c oxidase subunit 7C	COX7C_PIG	7	43	51	32.0	71	3.8	5.0	3.8
Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	TOM22_HUMAN	16	28	33	16.0	70	4.2	3.0	5.0
Mitochondrial 18 kDa protein	MTP18_HUMAN	18	38	38	15.0	69	4.8	5.6	2.0
Dihydroorotate dehydrogenase	PYRD_HUMAN	43	57	59	17.0	68	3.2	5.0	4.0
Mitochondrial import receptor subunit TOM70	TOM70_HUMAN	67	37	39	8.9	67	2.8	7.4	2.2
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	ODB2_HUMAN	53	38	42	7.1	66	3.2	5.2	3.5
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim16	TIM16_HUMAN	14	49	54	38.0	64	2.5	4.6	4.3
Acyl carrier protein	ACPM_HUMAN	17	31	40	15.0	63	3.2	2.2	5.5
Histidine triad nucleotide-binding protein 2	HINT2_HUMAN	17	26	27	36.0	63	1.5	7.0	3.2
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	HIBCH_HUMAN	43	30	30	5.2	63	3.3	4.6	3.3
Ubiquinone biosynthesis protein COQ7 homolog	COQ7_HUMAN	24	40	51	22.0	62	3.0	6.4	2.0
Endonuclease G	NUCG_HUMAN	33	48	48	18.0	60	4.2	3.6	2.8
Ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5	COQ5_HUMAN	37	43	43	9.8	60	2.7	4.6	3.5
[Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 1	PDP1_HUMAN	61	43	43	13.0	57	4.0	3.8	2.3
Methylglutaconyl-CoA hydratase	AUHM_HUMAN	36	51	51	16.0	57	1.8	5.8	2.8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 2	NDUB2_HUMAN	12	30	39	8.6	56	2.8	4.0	3.2
39S ribosomal protein L12	RM12_HUMAN	21	50	54	18.0	54	3.3	3.4	2.8
Non-specific lipid-transfer protein	NLTP_HUMAN	59	42	42	4.9	54	2.8	4.6	2.3
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23	TIM23_HUMAN	22	32	33	17.0	51	2.0	4.6	2.7
NADP-dependent malic enzyme	MAON_HUMAN	67	28	34	18.0	49	3.7	5.4	0.0
Acyl-coenzyme A thioesterase 9	ACOT9_HUMAN	50	28	28	11.0	47	1.8	4.8	2.0
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	ACSL1_HUMAN	78	33	37	11.0	47	3.3	3.8	1.3
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit	TIM50_HUMAN	40	19	19	5.9	46	1.2	2.2	4.7

## TIM50

NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	NU1M_PIG	36	25	28	13.0	46	0.8	4.6	3.0
Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5	PGAM5_HUMAN	32	31	31	14.0	45	3.3	3.0	1.7
Membrane-associated progesterone receptor component 2	PGRC2_HUMAN	24	26	26	21.0	45	2.7	3.8	1.7
Cytochrome b-c1 complex subunit 9	QCR9_HUMAN	7	12	12	13.0	44	1.7	5.0	1.5
Mitochondrial carrier homolog 2	MTCH2_HUMAN	33	25	25	13.0	44	3.7	1.8	2.2
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	TIM9_HUMAN	10	32	37	56.0	44	2.0	2.4	3.3
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	GPX4_PIG	22	30	30	22.0	43	2.3	3.8	1.7
28S ribosomal protein S28	RT28_HUMAN	21	29	29	16.0	43	3.8	2.6	1.2
Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3	ACSS3_HUMAN	75	33	33	12.0	40	2.8	3.2	1.2
Lipoprotein lipase	LIPL_PIG	53	35	37	19.0	40	1.5	2.0	3.5
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A	TIM8A_HUMAN	11	30	30	34.0	40	2.2	2.8	2.2
28S ribosomal protein S23	RT23_HUMAN	22	26	26	11.0	40	2.3	4.2	0.8
Single-stranded DNA-binding protein	SSB_HUMAN	?	17	23	N/A	39	0.0	3.0	4.0
Synaptojanin-2-binding protein	SYJ2B_HUMAN	16	30	37	28.0	38	1.7	3.6	1.7
Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5	USMG5_HUMAN	6	14	14	19.0	37	0.7	2.6	3.3
Serine protease HTRA2	HTRA2_HUMAN	49	30	30	8.5	37	1.3	2.8	2.5
Sulfide:quinone oxidoreductase	SQRD_HUMAN	50	34	34	14.0	37	3.0	1.6	1.8
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	PCCA_HUMAN	77	32	33	7.7	36	1.2	3.4	2.0
Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	TOM40_HUMAN	38	32	32	14.0	36	1.8	2.0	2.5
Cardiac phospholamban	PPLA_HUMAN (+1)	6	16	16	33.0	35	2.7	0.4	2.8
BAG family molecular chaperone regulator 2	BAG2_HUMAN	24	28	28	21.0	33	0.5	1.4	3.8
39S ribosomal protein L49	RM49_HUMAN	19	26	26	22.0	32	0.8	3.2	1.8
Glutaredoxin-related protein 5	GLRX5_HUMAN	17	14	21	17.0	30	0.0	3.6	2.0
Heat shock protein 75 kDa	TRAP1_HUMAN	80	27	27	6.1	29	0.0	2.6	2.7
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	NDUB7_HUMAN	16	12	13	8.0	28	3.3	0.0	1.3
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13	TIM13_HUMAN	11	25	25	43.0	28	2.5	1.6	0.8
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	NDUB4_HUMAN	15	9	9	16.0	26	0.8	1.2	2.5
Glutaryl-CoA dehydrogenase	GCDH_PIG	45	18	19	13.0	26	1.0	3.0	0.8

Dynamin-like 120 kDa protein	OPA1_HUMAN	112	23	23	7.0	24	1.8	1.6	0.8
Sorting and assembly machinery component 50 homolog	SAM50_HUMAN	52	20	20	11.0	24	0.7	2.8	1.0
Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase	HOT_HUMAN	50	8	8	4.7	23	0.8	3.6	0.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	NDUB3_HUMAN	11	15	17	13.0	22	2.2	1.2	0.5
Mitochondrial chaperone BCS1	BCS1_HUMAN	48	8	11	7.2	22	0.3	4.0	0.0
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADS_HUMAN	44	9	9	9.7	21	2.7	1.0	0.0
	RL32_HUMAN								
60S ribosomal protein L32	(+1)	16	17	18	24.0	21	0.0	1.8	2.0
Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	ETFD_HUMAN	69	6	9	5.7	20	1.3	1.4	0.8
[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide]] kinase	BCKD_HUMAN	46	8	9	9.5	20	1.8	1.0	0.7
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	HMGCL_HUMAN	34	11	11	6.8	19	1.5	2.0	0.0
Reticulon-4-interacting protein 1	RT4I1_HUMAN	44	19	19	17.0	19	1.2	1.6	0.7
Methylmalonyl-CoA mutase	MUTA_PIG	83	10	10	2.8	19	0.7	2.4	0.5
28S ribosomal protein S34	RT34_HUMAN	26	9	9	11.0	18	0.0	2.0	1.3
28S ribosomal protein S10	RT10_HUMAN	23	17	17	16.0	18	0.3	1.8	1.2
Dihydrodipicolinate synthase-like	DAPAL_HUMAN	35	15	15	12.0	18	0.0	3.2	0.3
Acyl-CoA-binding protein	ACBP_PIG	10	16	16	53.0	17	0.7	2.0	0.5
Dynamin-1-like protein	DNM1L_HUMAN	82	16	16	6.0	17	0.3	2.2	0.7
Carbonyl reductase family member 4	CBR4_HUMAN	25	10	10	7.2	16	1.0	1.4	0.5
Leucine-rich PPR motif-containing protein	LPPRC_HUMAN	158	11	11	2.2	16	1.3	1.6	0.0
Glyoxalase domain-containing protein 4	GLOD4_HUMAN	35	11	11	13.0	16	0.8	2.2	0.0
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1_HUMAN	36	12	12	14.0	15	1.5	0.6	0.5
CDGSH iron sulfur domain-containing protein 1	CISD1_HUMAN	12	6	8	20.0	14	1.2	1.4	0.0
39S ribosomal protein L11	RM11_HUMAN	21	12	12	21.0	14	0.0	2.8	0.0
Chloride intracellular channel protein 4	CLIC4_HUMAN	29	14	14	21.0	14	0.7	1.6	0.3
Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	TOM20_HUMAN	16	8	8	23.0	13	0.0	1.2	1.2
Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like	ACS2L_HUMAN	75	10	10	3.9	12	0.3	2.0	0.0
39S ribosomal protein L14	RM14_HUMAN	16	10	10	19.0	12	0.0	1.4	0.8
Hydroxyacylglutathione hydrolase	GLO2_HUMAN	34	4	4	6.5	11	0.0	1.0	1.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8	NDUB8_HUMAN	22	4	5	12.0	11	1.8	0.0	0.0
39S ribosomal protein L13	RM13_HUMAN	21	8	8	11.0	11	0.7	1.4	0.0

NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	NU4M_PIG	52	8	8	12.0	11	0.0	0.6	1.3
Uncharacterized protein C9orf105	C1105_HUMAN	?	9	9	N/A	10	0.0	0.6	1.2
Putative transferase C1orf69	CA069_HUMAN	38	8	8	5.3	10	1.3	0.4	0.0
Valacyclovir hydrolase	BPHL_HUMAN	33	10	10	5.8	10	0.3	1.2	0.3
AFG3-like protein 2	AFG32_HUMAN	89	6	6	2.6	8	0.5	1.0	0.0
39S ribosomal protein L9	RM09_HUMAN	30	8	8	8.6	8	0.0	0.4	1.0
Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3	NMNA3_HUMAN	28	6	7	9.1	8	0.8	0.6	0.0
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	NU5M_PIG	69	4	6	4.3	7	0.0	0.6	0.7
Mitochondrial fission factor	MFF_HUMAN	38	6	6	7.9	7	0.7	0.6	0.0
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPDM_HUMAN	81	4	4	2.2	7	0.5	0.8	0.0
NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog	NFU1_HUMAN	28	6	6	12.0	7	0.0	1.4	0.0
Probable methyltransferase C20orf7	CT007_HUMAN	39	6	6	4.9	7	0.3	1.0	0.0
RNA 3'-terminal phosphate cyclase	RTC1_HUMAN	39	4	4	6.6	6	0.7	0.0	0.3
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	ODBA_HUMAN	50	4	5	6.7	6	0.5	0.6	0.0
Citrate lyase subunit beta-like protein	CLYBL_HUMAN	37	5	5	12.0	6	0.3	0.8	0.0
Branched-chain-amino-acid aminotransferase	BCAT2_HUMAN	44	4	4	7.1	6	0.7	0.4	0.0
HCLS1-associated protein X-1	HAX1_HUMAN	32	4	4	7.2	6	0.0	1.2	0.0
Aldehyde dehydrogenase	ALDH2_PIG	57	4	4	5.4	6	0.0	0.8	0.3
Ferrochelatase	HEMH_HUMAN	48	4	4	3.1	5	0.8	0.0	0.0
Trifunctional enzyme subunit alpha	ECHA_HUMAN	83	2	2	2.2	5	0.0	0.0	0.8
Dihydrolipoyl dehydrogenase	DLDH_HUMAN	54	4	4	8.6	5	0.0	1.0	0.0
28S ribosomal protein S22	RT22_HUMAN	41	4	5	6.4	5	0.3	0.6	0.0
Amine oxidase [flavin-containing] B	AOFB_PIG	58	4	4	4.0	5	0.0	0.0	0.8
Mitochondrial import receptor subunit TOM7 homolog	TOM7_PIG	6	4	4	45.0	5	0.0	1.0	0.0
Dynein light chain 1, cytoplasmic	DYL1_HUMAN	10	4	4	15.0	5	0.0	1.0	0.0
39S ribosomal protein L38	RM38_HUMAN	45	4	4	5.3	5	0.0	1.0	0.0
Acyl-CoA dehydrogenase family member 9	ACAD9_HUMAN	69	2	2	3.4	4	0.0	0.8	0.0
Fumarate hydratase	FUMH_HUMAN	55	2	2	8.0	4	0.0	0.0	0.7
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	ATPF1_HUMAN	36	4	4	10.0	4	0.0	0.8	0.0
28S ribosomal protein S29	RT29_HUMAN	46	4	4	7.8	4	0.3	0.0	0.3
Ornithine aminotransferase	OAT_HUMAN	49	4	4	7.3	4	0.0	0.8	0.0
C-Myc-binding protein	MYCBP_HUMAN	12	4	4	19.0	4	0.0	0.4	0.3

Putative ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	CLPP_HUMAN	30	4	4	9.7	4	0.3	0.4	0.0
Peroxiredoxin-5	PRDX5_HUMAN	22	4	4	11.0	4	0.3	0.4	0.0
High mobility group protein B3	HMGB3_HUMAN	23	4	4	14.0	4	0.7	0.0	0.0
COX assembly mitochondrial protein homolog	COXAM_HUMAN	12	4	4	17.0	4	0.7	0.0	0.0
39S ribosomal protein L22	RM22_HUMAN	24	4	4	10.0	4	0.7	0.0	0.0
Pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit	PDPR_HUMAN	99	4	4	4.2	4	0.0	0.8	0.0
2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	OAS1_PIG	40	3	3	14.0	4	0.7	0.0	0.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	NDUB1_HUMAN	7	2	2	16.0	3	0.0	0.0	0.5
VP13B_HUMAN-R	VP13B_HUMAN-R	?	2	2	N/A	3	0.0	0.0	0.5
Cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	MMAB_HUMAN	27	2	2	9.6	3	0.5	0.0	0.0
Nesprin-2	SYNE2_HUMAN	796	2	2	0.2	2	0.0	0.0	0.3
6.8 kDa mitochondrial proteolipid	68MP_HUMAN	7	2	2	33.0	2	0.3	0.0	0.0
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	MPPB_HUMAN	54	2	2	4.5	2	0.0	0.4	0.0
28S ribosomal protein S7	RT07_HUMAN	28	2	2	9.1	2	0.0	0.0	0.3
Periplakin	PEPL_HUMAN	205	2	2	0.8	2	0.0	0.4	0.0
Microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1_PIG	18	2	2	14.0	2	0.0	0.0	0.3
Protein ETHE1	ETHE1_HUMAN	28	2	2	7.1	2	0.0	0.4	0.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	NDUB6_HUMAN	15	2	2	9.4	2	0.3	0.0	0.0
Immature colon carcinoma transcript 1 protein	ICT1_HUMAN	24	2	2	8.7	2	0.0	0.0	0.3
[Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]] kinase isozyme 3	PDK3_HUMAN	47	2	2	6.4	2	0.0	0.0	0.3
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	ODBB_HUMAN	43	2	2	7.7	2	0.0	0.4	0.0
Trans-2-enoyl-CoA reductase	MECR_HUMAN	40	2	2	5.9	2	0.0	0.4	0.0
Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog	COX15_HUMAN	46	2	2	3.9	2	0.0	0.0	0.3
ATP synthase subunit s	ATP5S_HUMAN	25	2	2	7.9	2	0.0	0.4	0.0
39S ribosomal protein L16	RM16_HUMAN	28	2	2	8.4	2	0.3	0.0	0.0
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	NDUS5_HUMAN	13	2	2	12.0	2	0.0	0.0	0.3
Uncharacterized protein C2orf47	CB047_HUMAN	33	2	2	7.2	2	0.3	0.0	0.0
Acyl-CoA synthetase family member 3	ACSF3_HUMAN	64	2	2	2.3	2	0.3	0.0	0.0
Protein EMI5 homolog	EMI5_HUMAN	?	2	2	N/A	2	0.0	0.4	0.0
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B	TIM8B_HUMAN	9	2	2	27.0	2	0.3	0.0	0.0



Tryptophanyl-tRNA synthetase

SYWM\_HUMAN

40

2

2

5.3

2

0.0

0.0

0.3



# **DIFUSIÓN DE RESULTADOS**