



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Departamento de Bioquímica Clínica

**“Mecanismo protector antioxidante de tioredoxina 1 (Trx1)
en el miocardio de ratones sépticos”**

Juana Patricia Sánchez Villamil

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área Biología Molecular

Directora de Tesis: Prof. Dra. María Cecilia Carreras

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno

INIGEM-CONICET-UBA

Año 2015

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por ser mi compañía, por ser mi guía y por poner en mi camino a todas las personas que me han ayudado a crecer intelectual y personalmente.

Así mismo quiero dedicar este proyecto a mi esposo por brindarme tanta seguridad, apoyo, orientación, motivación y por impulsarme a ser cada día mejor.

A mis hijos Juanchito y Nicolás por ser mis angelitos de mi guarda y más grande compañía y motivación.

A mis padres por su ejemplo y amor que junto con mis hermanas me rodearon de tanto cariño, apoyo y aliento siempre que lo necesité.

Así mismo quiero dar especiales agradecimientos:

A los Dres Juan José Poderoso y Jorge Peralta, quienes con enorme y generoso conocimiento siempre fueron esa respuesta orientadora.

A mis compañeros de laboratorio Sofía, Inés, Yael, Eugenia, Hernán y Paola, quienes me colaboraron en la realización de la parte experimental. Gracias Sofia por brindarme tu tiempo en enseñanza, tu conocimiento y experiencia. Gracias Euge por orientarme en cuanto duda tenía. Gracias a todos por esos momentos gratos y no tan gratos que nos permiten crecer.

Al Dr. Gelpi y su equipo de trabajo, por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

A Colfuturo y Colciencias por financiar y creer en mis sueños y en el de muchos beneficiarios profesionales en mi país.

Y un sincero y especial agradecimiento a la Dra. María Cecilia Carreras por su capacidad de escucha, dedicación y paciencia. Y en mi persona, por abrirme las puertas a la investigación, por permitirme la libre construcción del conocimiento sin dejarme perder del objetivo principal y por colaborarme en todo cuanto necesité en todo momento.

Abreviaturas

ADNmt	ADN mitocondrial
ALT	Alanino-transaminasa
AMPK	kinasa dependiente de AMPc
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ASAT	Aspartato-transaminasa
ATF2	factor activador de transcripción
ATP	Adenosín Trifosfato
ASK1	Kinasa de señalización apoptótica
BAR	Receptor β -adrenérgico
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CaMKIV	quinasas IV dependientes de calmodulina
CK	Creatinfosfoquinasa
CK-MB	Creatinfosfoquinasa cardiaca
DRP1	<i>Dynamin-related protein 1</i>
EIM	Espacio intermembrana mitocondrial
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ESM	Error estándar de la media
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FC	Frecuencia cardiaca
FCCP	Carbamil-cianuro-trifluorometoxifenilhidrazona
FMN	Flavín momonucleótido
Fis-1	<i>Fission protein 1</i>
GPx	Glutación peroxidasa
GSH/GSSG	Glutación reducido/oxidado
IF	Mitocondria Intermiofibrilar

IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	NG-monometil-L-arginina
LPC	Ligadura-doble punción cecal
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MEM	Membrana externa mitocondrial
Mfn 1/2	Mitofusinas 1 / 2
MIF	Factor inhibitorio de migración de macrófagos
MIM	Membrana Interna mitocondrial
MnSOD	Superóxido dismutasa 2
mPTP	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NLR	Receptor <i>nod-like</i>
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NRF	Factor respiratorio nuclear
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
OPA1	<i>Optic atrophy-1</i>
PDVI	Presión desarrollada del ventrículo izquierdo
PGC-1 α	PPAR γ <i>coactivator-1</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
PKA	proteína kinasa A
PPAR- γ	<i>Peroxisome-proliferator activated receptor</i>

RE	Retículo endoplásmico
RS	Retículo sarcoplásmico
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SOD	Superóxido dismutasa
SSM	Mitocondria subsarcolemal
Tfam	Factor de transcripción mitocondrial A
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
Trx 1	Tiorredoxina 1 citosólica
Trx2	Tiorredoxina 2 mitocondrial
TrxR	Tiorredoxina reductasa
UCP	Proteína desacoplante
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje

	Pág.
INDICE	
ABREVIATURAS	
INTRODUCCION	1
1. El corazón: Estructura, función y metabolismo	1
1.1. Estructura del corazón	1
1.1.1. El miocito cardiaco	1
1.1.2. La mitocondria cardiaca	3
1.1.2.1. Dinámica mitocondrial	7
1.1.2.2. Biogénesis mitocondrial	9
1.2. Fisiología del músculo cardiaco	11
1.2.1. La bomba cardiaca	12
1.3. Metabolismo cardiaco	13
1.4. Mecanismos de muerte celular en el músculo cardiaco	14
2. Sepsis	19
2.1. Generalidades	18
2.2. Disfunción miocárdica en sepsis	21
2.2.1. Mediadores Inflamatorios en sepsis	22
2.2.2. Especies activas del O ₂ en miocardio durante la sepsis	23
2.2.3. Óxido nítrico y especies activas relacionadas en miocardio durante la sepsis	23
2.2.4. Disfunción mitocondrial en miocardio durante la sepsis	25
2.3. Estudios en disfunción miocárdica en sepsis	26
3. Estrés oxidativo y Sistemas Antioxidantes celulares	27
3.1. Generalidades	27
3.2. Sistema Tiorredoxina	27
3.2.1. Estructura de tiorredoxina-1	29
3.2.2. Regulación y modificaciones post-translacionales de tiorredoxina	32
3.2.3. Sistema Tiorredoxina en la enfermedad cardiovascular	33
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	
1. Objetivo General	35

2. Objetivos Específicos	35
MATERIALES Y METODOS	
1. Modelo animal de experimentación	37
1.1. Modelo de ligadura y doble punción cecal	38
2. Procedimientos de experimentación en órgano entero	39
2.1. Técnica de Langendorff	39
2.2. Determinación del tiempo de sobrevida	39
3. Procedimientos de obtencion y cuantificación de muestras	40
3.1. Obtención de homogenizados	40
3.2. Aislamiento de mitocondrias	40
3.3. Cuantificación de proteínas	41
4. Procedimientos bioquímicos	41
4.1. Evaluación de marcadores bioquímicos en suero	41
4.2. Evaluación de la actividad de Tiorredoxina-1 por el método de reducción de la Insulina	43
5. Determinación de la función mitocondrial	44
5.1. Consumo de oxígeno (O ₂) en cortes de tejido miocárdico	44
5.2. Estudio de la actividad de los complejos mitocondriales	45
5.2.1. Medición de la actividad del complejo I (NADH-ubiquinona reductasa)	45
5.2.2. Medición de la actividad de Succinato-ubiquinona-citocromo <i>c</i> reductasa (Complejos II-III)	45
5.2.3. Medición de la actividad de Citocromo <i>c</i> oxidasa (Complejo IV)	46
5.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	46
6. Determinación de estrés oxidativo	47
6.1. Producción mitocondrial de especies reactivas del O ₂	47
6.1.1. Producción de H ₂ O ₂ mitocondrial	47
6.2. Evaluación de la actividad enzimática antioxidante	47
6.2.1. Actividad de dismutasa de manganeso-superóxido (MnSOD)	47
6.2.2. Actividad de Catalasa (CAT)	48
6.3. Evaluación de la oxidación de proteínas: determinación de grupos carbonilos	48
7. Determinación de estrés nitrosativo	49

7.1. Determinación de nitración en tirosina de homogenato de tejido cardiaco	49
7.2. Medición de la producción de óxido nítrico (NO) por conversión de la [³ H]L-arginina a [3H]L-citrulina	50
7.3. Evaluación de la expresión de óxido nítrico sintasas	50
8. Determinación de la expresión de proteínas por Western Blot	50
9. Procedimientos moleculares	51
9.1. Extracción de ARN Total	51
9.2. Transcripción reversa (RT)	52
9.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real	52
10. Procedimientos histológicos	53
10.1. Estudio de la ultraestructura tisular y mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión	53
10.2. Estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL	54
10.3. Estudio histopatológico mediante el método de tinción hematoxilina-eosina	54
11. Estadística	55
RESULTADOS	
1. Caracterización general y análisis de sobrevida	56
1.1. Caracterización de parámetros físicos	56
1.2. Evaluación de parámetros bioquímicos sistémicos de injuria tisular	57
1.3. Evaluación de sobrevida en el modelo LPC	59
2. Efecto de Tiorredoxina-1 sobre la contractilidad cardiaca en la Disfunción miocárdica por sepsis	59
3. Efecto de Tiorredoxina-1 sobre el estrés oxidativo en la Disfunción miocárdica por sepsis	61
3.1. Ensayo de la expresión y actividad antioxidante del sistema Trx	62
3.2. Actividad de otros sistemas antioxidantes	65
3.3. Oxidación de proteínas en mitocondria y citosol de tejido cardiaco	67
4. Efecto de Tiorredoxina-1 sobre el estrés nitrosativo en la DM por sepsis	70
4.1. Evaluación de la expresión proteica de oxido nítrico sintasas	70
4.2. Evaluación de la actividad enzimática de óxido nítrico sintasas	73
4.3. Nitración en tirosina de homogenato de músculo cardiaco	73
5. Efecto de Tiorredoxina-1 sobre la función mitocondrial en la Disfunción	75

miocárdica por sepsis	75
5.1. Evaluación del consumo de oxígeno	75
5.2. Evaluación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria	77
5.3. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno	78
5.4. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	79
6. Efecto de Tiorredoxina-1 sobre el proceso de muerte celular apoptosis/autofagia en la Disfunción miocárdica por sepsis	83
6.1. Evaluación de apoptosis	83
6.2. Evaluación de autofagia	89
7. Efecto de Tiorredoxina-1 sobre los procesos de dinámica y biogénesis mitocondrial en la Disfunción miocárdica por sepsis	92
7.1. Dinámica mitocondrial	92
7.2. Biogénesis mitocondrial	96
DISCUSION	99
CONCLUSIONES	113
RESUMEN	116
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	118

Introducción

1. EL CORAZÓN: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El corazón es un órgano muscular localizado en la cavidad torácica, medial a los pulmones y posterior al esternón, que se encarga de funcionar como una bomba circulatoria tomando la sangre desoxigenada a través de las venas, liberándola a los pulmones para su oxigenación y retornándola al cuerpo a través de la aorta y una red compleja de arterias.

1.1 Estructura del corazón

El corazón está conformado por el pericardio y el músculo o pared cardiaca. El pericardio es un saco de doble pared que contiene el corazón y que sirve para protegerlo y fijarlo al tórax. La pared cardiaca está conformada por el epicardio, miocardio y endocardio.

Epicardio: Consta de una capa superficial de células mesoteliales escamosas y una capa profunda de tejido conectivo fibroelástico.

Endocardio: Consta de una capa interna compuesta de endotelio y tejido conectivo laxo subyacente; una capa intermedia compuesta de tejido conectivo denso y regularmente organizado; y una capa profunda compuesta de tejido conectivo irregular que incluye vasos y fibras de Pankinje.

Miocardio: Formado de células musculares estriadas (miocitos cardiacos), intersticio, vasos y terminaciones nerviosas.

1.1.1 El miocito cardiaco

Es el elemento contráctil básico del miocardio y la célula más energética del organismo. Sus estructuras son el sarcolema (membrana plasmática) que presenta invaginaciones hacia el interior de la célula que reciben el nombre de túbulos T y canales de calcio que responden a la onda de despolarización permitiendo la entrada de calcio; el

sarcoplasma (citoplasma) y el núcleo que es grande y ovalado. Cada fibra o miocito presenta uniones término terminales denominadas discos intercalares, que son membranas celulares que se encargan de transmitir la fuerza durante la contracción muscular.

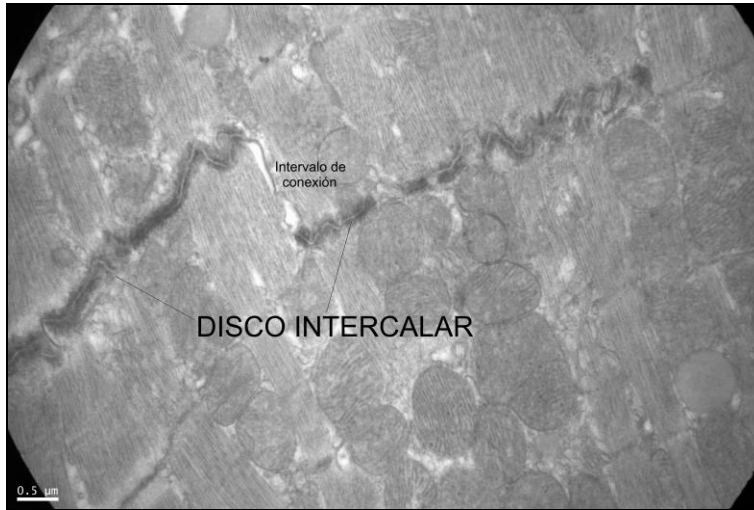


Figura 1. Micrografía electrónica 12.000X de tejido miocárdico señalando disco intercalar

Los miocitos se caracterizan por la presencia de bandas, oscuras (bandas A) compuestas de fibras de actina y miosina paralelas, y claras (bandas I) formadas por fibras de actina. La unidad funcional se conoce como sarcómero.

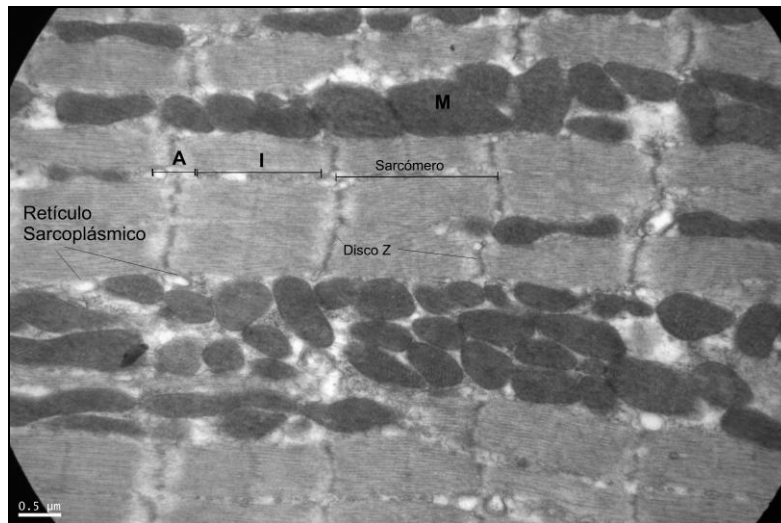


Figura 2. Micrografía electrónica 12.000X señalando componentes estructurales del miocito

1.1.2 La mitocondria cardiaca

Las mitocondrias son una parte integral de la compleja citoarquitectura de los cardiomiocitos adultos. Se organizan en tres subpoblaciones de acuerdo a su localización: mitocondrias intermiofibrilares (IM), subsarcolémicas (SM) y perinucleares (PN), con características morfológicas y funcionales diferentes (Piquereau y col, 2013).

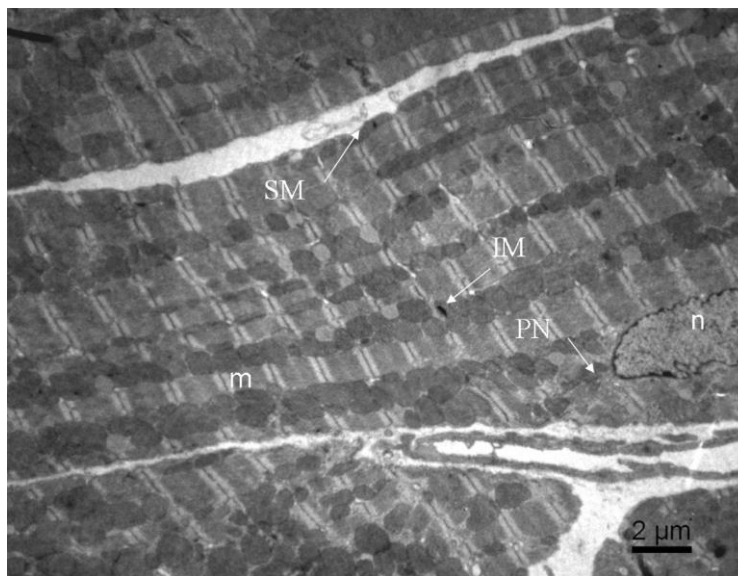


Figura 3. Micrografía electrónica de los tipos de mitocondria en tejido miocárdico

Los cardiomiocitos tienen una alta densidad mitocondrial, lo que les permite producir ATP rápidamente y ser altamente resistentes a la fatiga. Estas organelas ocupan alrededor del 30% del volumen celular total y producen 30 kg de ATP diarios para poder sostener la función contráctil normal del corazón. Si bien su rol primario es la generación de ATP, también están involucradas en la señalización, diferenciación y muerte celular.

Debido a su origen bacteriano, tienen su propio genoma y pueden autorreplicarse. El ADN mitocondrial es una doble hebra circular que contiene 37 genes que codifican 13 subunidades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Estructuralmente, la mitocondria está formada por una membrana externa (MEM), una membrana interna (MIM), matriz y el espacio intermembrana. La membrana externa representa una barrera a moléculas citosólicas mayores a 1500 Da y separa el espacio intermembrana del citosol. La membrana interna es impermeable a la mayoría de las moléculas e iones, incluidos los protones; consiste de regiones invaginadas en la matriz, conocidas como crestas, y es donde se localizan los transportadores electrónicos (complejos mitocondriales).

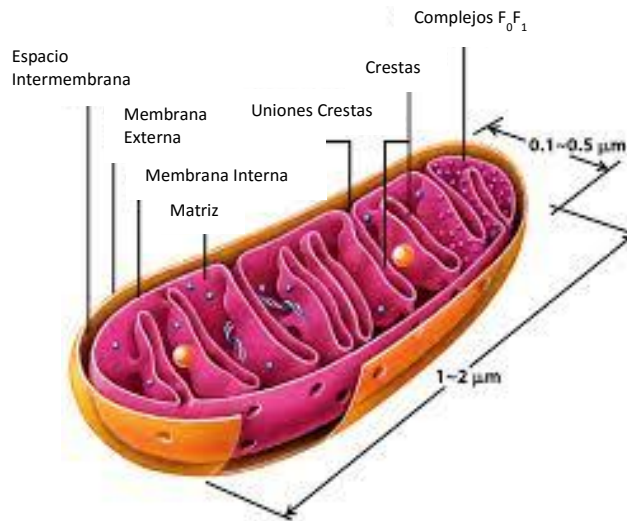


Figura 4. Representación esquemática de una mitocondria. Se observan los diferentes compartimentos y las principales estructuras que la componen

En la membrana interna tiene lugar la fosforilación oxidativa, proceso en el que se genera energía en forma de gradiente de potencial electroquímico, conocido como fuerza protón-motriz que impulsa la producción de ATP, el transporte iónico y el metabolismo. La fuerza protón-motriz se genera a través de una serie de reacciones de óxido-reducción conducidas por la cadena de transporte de electrones, la cual está formada por los complejos mitocondriales localizados en la membrana interna:

El Complejo I (NADH-ubiquinona oxido-reductasa) es por donde ingresan los electrones a la cadena y son transferidos a la CoQ a través del FMN (flavín mononucleótido). Por cada par de electrones transferido se bombean 4 protones, desde la matriz hasta el espacio intermembrana.

El complejo II (succinato deshidrogenasa), cataliza la oxidación de succinato a fumarato, proceso durante el cual los electrones del FADH₂ (flavín adenin dinucleótido) son transportados hasta la ubiquinona. Este complejo no transloca protones al espacio intermembrana y por lo tanto no contribuye al gradiente electroquímico.

El complejo III (CoQ-citocromo *c* oxido-reductasa) transfiere los dos electrones de la ubiquinona reducida al citocromo *c*. Por cada dos electrones transferidos se bombean 4 protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana.

El complejo IV (citocromo oxidasa) cataliza la formación de agua llevando los electrones del citocromo *c* al oxígeno. El complejo bombea 2 protones al espacio intermembrana por cada 2 electrones que transfiere.

El complejo V (ATPasa) está formado por los componentes Fo y F1 que corresponden al canal protónico y las unidades catalíticas de la ATPasa, respectivamente. Es el encargado de sintetizar e hidrolizar ATP.

La fuerza protón-motriz tiene dos componentes: a) El gradiente de pH, que es la diferencia en la concentración del ión H⁺ entre la matriz y el espacio intermembrana y b) El potencial de membrana, que surge del movimiento de cargas positivas a través de la membrana interna. Este último, es un indicador del estado de energización de la mitocondria y su mantenimiento es vitalmente esencial para la síntesis de ATP y para proveer la fuerza conductora para el ingreso de calcio (Ca²⁺) a la mitocondria. El ingreso de Ca²⁺, es a su vez para el cardiomiocito una señal para la producción de ATP en respuesta a un incremento en la demanda de energía celular.

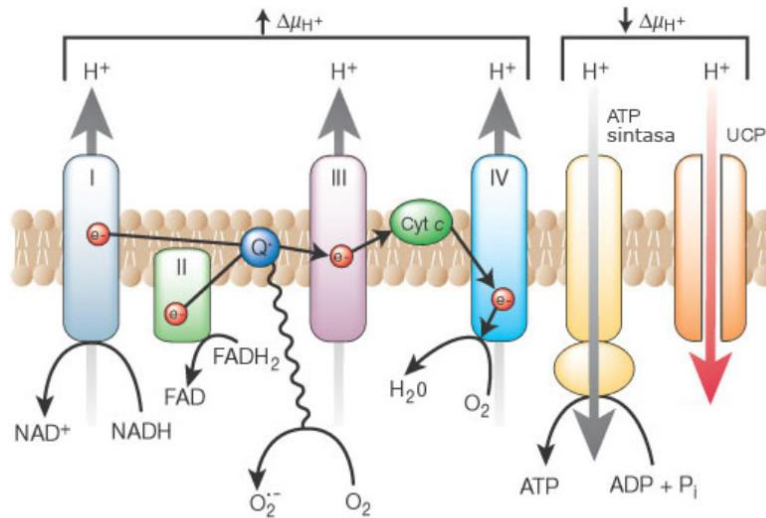


Figura 5. Esquema representativo de la cadena respiratoria mitocondrial. Los protones (H^+) son bombeados desde la matriz hacia el espacio intermembrana a través de los complejos I, III y IV. Luego, éstos fluyen a favor de su gradiente a través de la ATP sintasa con la consecuente producción de ATP.

Como producto de la fosforilación oxidativa, en la mitocondria se producen especies reactivas del oxígeno (ERO). Éstas se generan por el filtrado de electrones al oxígeno molecular que, por la adición de un único electrón forma O_2^- el cual puede ser rápidamente dismutado por la Superoxido dismutasa (SOD) hacia la formación de H_2O_2 y O_2 , y este último puede ser reutilizado para generar O_2^- nuevamente. Del O_2 consumido, un 0,2 – 2% es convertido en O_2^- . Esto la convierte en la mayor fuente de ERO intracelularmente.

El O_2^- se produce principalmente en los complejos I y III. En el complejo I puede generarse por transporte reverso de electrones, en presencia de una fuerza próton-motriz y un *pool* de UQ reducida. El transporte reverso de electrones sucede cuando el abastecimiento de electrones reduce el *pool* de UQ, la cual en presencia de una significativa fuerza próton-motriz obliga a los electrones a pasar desde la UQ reducida hacia el complejo I y reduce NAD^+ hacia $NADH$ en el sitio FMN. Esta producción de O_2^- por transporte reverso de electrones es anulada por rotenona, confirmando que la

procedencia de los electrones que entran al complejo I es desde el sitio de unión a la UQ (Lambert and Brand 2004).

El complejo III ha sido considerado una fuente importante de O_2^- durante mucho tiempo (Cadenas, Boveris et al. 1977). Cuando hay un pool de UQ reducida y el complejo III está inhibido por antimicina A, el O_2 reacciona con ubisemiquinona y genera O_2^- , el cual es liberado hacia ambas caras de la membrana interna (Muller, Liu et al. 2004). Su producción es despreciable frente a la generada a nivel del complejo I.

La mitocondria al igual que el citosol, posee varios sistemas antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos para detoxificar las ERO producidas. En la detoxificación además está involucrado el potencial de membrana; un incremento en el potencial incrementa la formación de radicales. En condiciones de estrés oxidativo la defensa antioxidante responde; una vez agotada, el mecanismo de desacoplamiento mitocondrial disipa ligeramente el potencial de membrana reduciendo así la formación de radicales, sin influenciar la síntesis de ATP.

1.1.2.1 Dinámica mitocondrial

La mayoría de las funciones de la mitocondria están enlazadas a la morfología y dinámica mitocondrial. Las mitocondrias continuamente se unen por procesos de fusión y se dividen por procesos de fisión que son fundamentales para la transmisión de mensajeros químicos, la homeostasis del calcio y la generación de ATP y ERO. La fisión crea mitocondrias más pequeñas que facilitan la mitofagia o aceleran la proliferación celular. La fusión produce una red que incrementa la comunicación con el retículo endoplasmático e internamente permite la difusión del contenido de la matriz entre mitocondrias.

Estos procesos son mediados por GTPasas. Específicamente, la fisión está mediada por la proteína relacionada a la familia de las Dinaminas tipo 1 (DRP1) y la proteína de la fisión mitocondrial (Fis-1). DRP1 es el componente principal de la división mitocondrial y se localiza en el citosol, pero una vez activada es traslocada y reclutada en la membrana externa mitocondrial, en donde se multimeriza creando una estructura

alrededor de la mitocondria, constriñéndola y dividiéndola. DRP1 está regulado post-transcripcionalmente; principalmente, por efectos de fosforilación en dos serinas claves; la fosforilación de serina 616 por ciclina B1-cdk1 incrementa la actividad de DRP1, mientras que la fosforilación de serina 637 por PKA la disminuye.

Fis1 es una pequeña proteína ubicada en la membrana externa de la mitocondria. Su sobreexpresión produce fragmentación mitocondrial al unirse con DRP1, mientras que su bloqueo produce elongación mitocondrial.

La fusión está mediada por las isoformas mitofusina 1 (Mfn1) y mitofusina 2 (Mfn2) localizadas en la membrana mitocondrial externa con una homología en su secuencia de un 81% y OPA-1 (atrofia óptica 1) que es una proteína perteneciente a la familia de las dinaminas con actividad de GTPasa que se encuentra localizada en la membrana mitocondrial interna y espacio intermembrana. Mfn2 además de participar en la fusión mitocondrial, también media la unión de la mitocondria con otras organelas tales como el retículo sarcoplásmico y melanosomas. La continuidad en la red mitocondrial facilita la propagación del potencial de membrana (Chen, Detmer et al. 2003), la difusión de metabolitos, la transmisión de señales de Ca^{2+} y la mezcla de los contenidos de matriz mitocondrial entre dos o más mitocondrias (Legros, Lombes et al. 2002). La pérdida de OPA1 resulta en fragmentación mitocondrial, debido a la pérdida de fusión mitocondrial y lleva a aberraciones en la estructura de las crestas, sugiriendo que OPA1 controla la forma de las crestas; la estrechez entre las crestas correlaciona con la oligomerización de OPA1 (Hom and Sheu 2009). Una reducción en la actividad de fusión mitocondrial resulta en disminución de consumo de oxígeno y potencial de membrana, así como también decrecimiento en ADNmt.

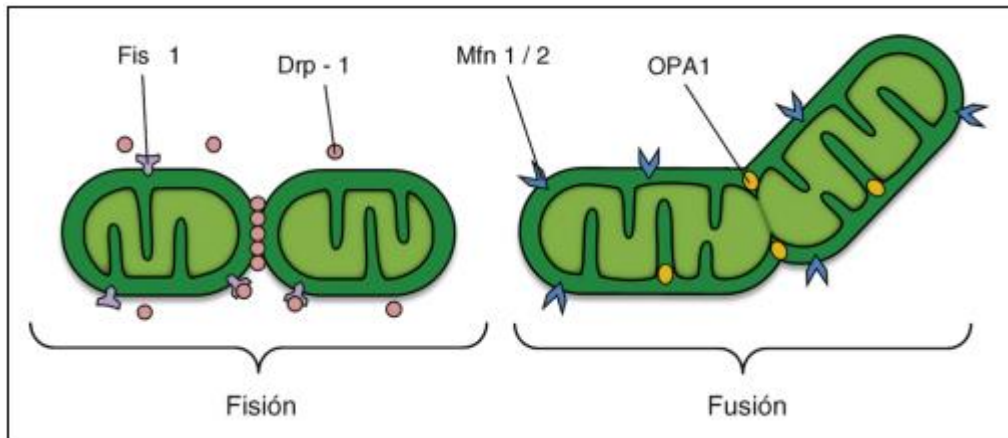


Figura 6. Representación gráfica de los procesos de dinámica mitocondrial y las principales proteínas involucradas. Modificada de Kuzmicic J, et al. 2011

Las mitocondrias cardiacas exhiben una red compacta aparentemente fragmentada, rodeadas de largos miofilamentos y un citoesqueleto rígido que impide el movimiento mitocondrial (Piquereau, Caffin et al. 2013). El mecanismo de fusión/fisión mitocondrial y las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial son factores indispensables para la supervivencia y continuo control de calidad mitocondrial (Song and Dorn 2015) y para la normal función cardiaca (Dorn 2013). Defectos y/o cambios en la estructura, función y equilibrio de la dinámica mitocondrial están conectados como factores causales o contribuyentes en la patología cardiaca como las miocardiopatías hipertrófica y dilatada, miocardiopatías isquémicas y alcohólicas y miocarditis. En insuficiencia cardiaca post-infarto se ha hallado caída en los niveles de OPA-1 acompañado de fragmentación mitocondrial y reducción en el área mitocondrial e incremento en el número de mitocondrias (Chen, Gong et al. 2009). La cardiomiopatía dilatada, puede resultar del incremento en la fusión mitocondrial debido a una mutación disfuncional en la proteína DRP1 (Ashrafian, Docherty et al. 2010).

1.1.2.2 Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial se refiere al mecanismo por el cual hay crecimiento y división de mitocondrias preexistentes para producir unas nuevas. El número

mitocondrial está regulado por el proceso de biogénesis, con el fin de regular la demanda de energía celular y compensar el daño celular.

Este proceso está mediado por el factor de transcripción clave en el proceso de biogénesis mitocondrial denominado proliferador de peroxisoma activado por los receptores gama coactivador 1-alfa (PGC-1 α). PGC-1 α es un miembro de la familia de receptores nucleares que es responsable de dirigir la transcripción de ARNm de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y de incrementar la expresión de factores de transcripción como el receptor gama activador del factor proliferador de peroxisoma (PPAR- γ), con el cual interacciona permitiendo así la activación de múltiples factores de transcripción incluyendo NRF-1 y NRF-2 (factores respiratorios nucleares 1 y 2). Estos últimos promueven la expresión de Tfam (Factor de transcripción mitocondrial A) que conduce al incremento en la transcripción y replicación de DNA mitocondrial y enzimas mitocondriales.

Tras la activación de PGC-1 α dos vías de activación transcripcional pueden originarse: (a) a través de calcineurina A (CnA) y kinasas IV dependientes de calmodulina (CaMKIV); en este caso CnA interactúa y activa los factores incrementadores de miocitos (MEF2C y MEF2D) los cuales regulan la transcripción de PGC-1 α directamente. CaMKIV activa PGC-1 α fosforilando la proteína de ajuste al elemento de respuesta AMPc (CREB) la cual se enlaza a elementos promotores directamente sobre el gen PGC-1 α . (b) la proteína quinasa activada por el mitógeno p38 (p38 MAPK) y la quinasa dependiente de AMPc (AMPK) son activadas por ciertos factores de estrés celulares que activan MEF2 y el factor activador de transcripción (ATF2) los cuales regulan la expresión de PGC-1 α .

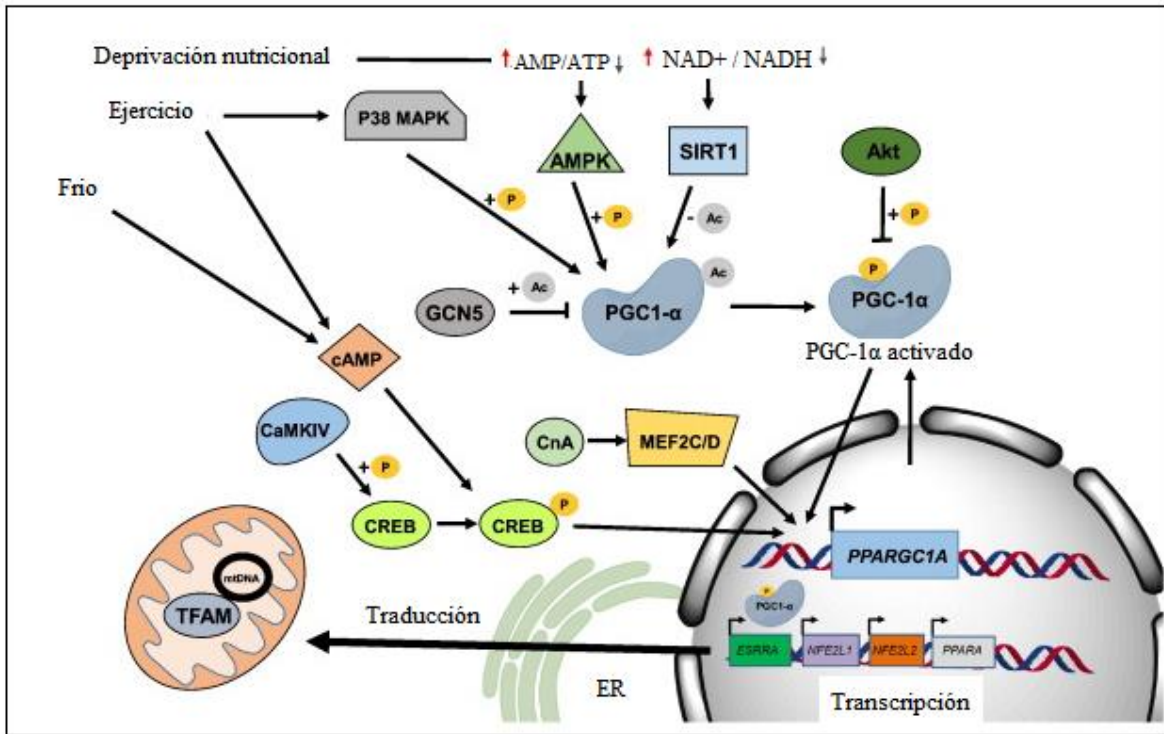


Figura 7. Representación gráfica del proceso de biogénesis mitocondrial. Modificada de Stotland A *Mitochondrial quality control; easy come, easy go*, 2015

1.2 Fisiología del músculo cardíaco

El corazón cumple su función debido a la contracción secuencial de las aurículas y ventrículos, que resulta de la interacción de cuatro propiedades fundamentales: excitabilidad, automatismo, conducción y contractilidad. Para ello, el corazón consta de tres tipos de músculo cardíaco: músculo atrial, músculo ventricular y fibras musculares conductoras y excitatorias. Los dos primeros se contraen fuertemente en cada latido cardíaco garantizando que la sangre salga propulsada a todo el organismo, en cambio las fibras se contraen tenuemente porque contienen pocas fibras contráctiles y reciben la descarga eléctrica rítmica automática que provee el sistema excitatorio que controla los latidos rítmicos del corazón (Guyton 2006).

1.2.1 La bomba cardiaca

La función de la bomba cardiaca depende de la precarga, la poscarga, la contractilidad o fuerza contráctil del músculo y de la frecuencia cardiaca (FC). A su vez, independiente de la precarga y la poscarga, la contractilidad está regulada por el estiramiento muscular (Ley de Frank-Starling: cuanto más se estira el músculo, mayor es la fuerza contráctil), la frecuencia cardiaca y las propiedades intrínsecas del músculo cardiaco.

Durante el proceso contráctil, las catecolaminas se ligan a los receptores específicos que poseen las fibras cardiacas en el sarcolema, los receptores alfa-adrenérgicos, β -adrenérgicos (β -AR) y muscarínico colinérgicos, los cuales se conectan con vías intracelulares transduciendo las señales al interior celular. El β -AR se acopla a la adenilatociclase por medio de la proteína G estimulante (G_s) y así produce AMP_c, quien a su vez se liga a la proteína kinasa A (PKA) que fosforila canales iónicos (canales de Ca^{2+}), proteínas contráctiles (troponina) y enzimas metabólicas. La fosforilación de los canales de Ca^{2+} produce mayor entrada de este ión en la célula, el cual gatilla la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) por activación de receptores rianodínicos (fosforilados por la PKA). A mayor disponibilidad de Ca^{2+} para las proteínas contráctiles, aumenta la fuerza contráctil del miocito y también facilita la relajación por fosforilación de la troponina I y del fosfolamban, quien controla la bomba Ca^{2+} -ATPasa (SERCA) retornando el calcio del citosol al RS. Por tanto, la fortaleza de la contracción del músculo cardiaco depende en gran parte de la concentración de iones de calcio.

Ante una excesiva activación adrenérgica, el miocardio ejerce resistencia a las catecolaminas por autorregulación de los receptores adrenérgicos, quienes pueden cambiar su conformación, su número y afinidad a su sustrato, evitando daños por exceso en la cantidad o frecuencia del estímulo transmisor. Cuando se fosforila el receptor (inhibición), se produce un secuestro dentro de la membrana y hacia el citoplasma (internalización) haciéndose inalcanzable para el agonista, degradándose o inactivándose.

1.3 Metabolismo cardiaco

El corazón requiere alta demanda y continua generación de ATP, que permite el funcionamiento de las bombas e intercambiadores iónicos en la membrana [Na^+/K^+ , Ca^{2+}] y del mecanismo de contracción-relajación. El mayor aporte de ATP proviene de la producción aeróbica, por medio de la β -oxidación de ácidos grasos (60-70%) y carbohidratos (~30%).

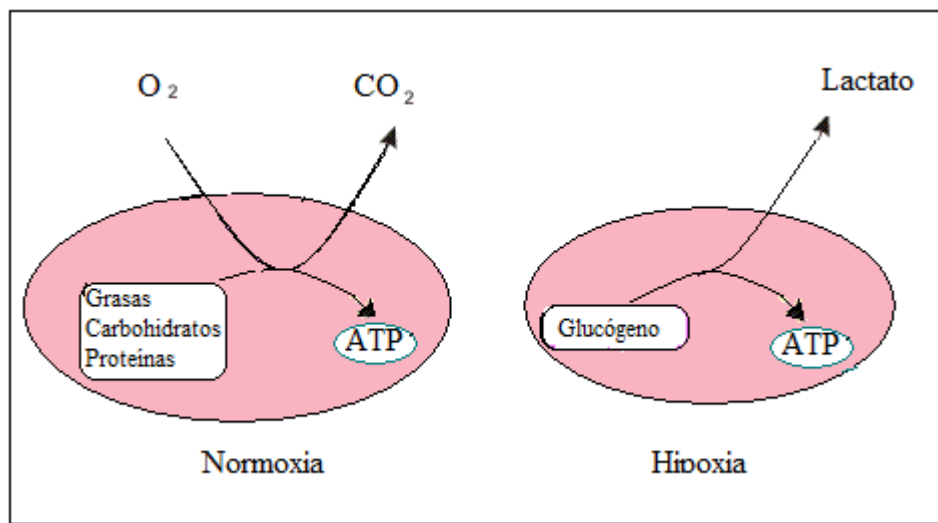


Figura 8. Esquema de utilización de sustratos por condiciones de oxigenación. Modificada de: Klabunde, R.E. Ph.D. Cardiovascular Physiology Concepts. 2011.

La β -oxidación está regulada por múltiples factores como la disponibilidad de sustratos, la demanda energética, la oxigenación y el control de la función mitocondrial. Las enzimas participantes de la β -oxidación están bajo el control transcripcional por factores de transcripción como PPAR y su coactivador PGC-1 α (Lopaschuk, Ussher et al. 2010). PPAR es un regulador del metabolismo de ácidos grasos; y PGC-1 α , en el corazón, regula el metabolismo energético celular, estimula la biogénesis mitocondrial (Lehman, Barger et al. 2000) y estimula la expresión de genes de fosforilación oxidativa, dándole un papel esencial en la adaptación ante una incrementada demanda de trabajo y ATP en respuesta a estímulos fisiológicos (Liang and Wong-Riley 2006).

El corazón tiene una alta demanda y alto consumo de oxígeno; es así que durante la isquemia e hipoxia, el corazón no cuenta con los sustratos metabólicos requeridos para el metabolismo aeróbico y utiliza el glucógeno como sustrato para la generación anaeróbica de ATP y la formación de ácido láctico, aunque la cantidad producida por esta vía es muy pequeña comparada a la cantidad de ATP que puede ser producida vía metabolismo aeróbico.

1.4 Mecanismos de muerte celular en el músculo cardiaco

Los cardiomiocitos son células terminalmente diferenciadas que dejan de dividirse poco después del nacimiento y poseen una limitada capacidad de regeneración de magnitud insuficiente como para que clínicamente restaure de forma significativa su actividad funcional después de eventos patológicos que produzcan muerte celular miocárdica (Mercola, Ruiz-Lozano et al. 2011). La frecuencia de reemplazo celular anual va de un 1% en adultos jóvenes a un 0,45% en adultos mayores (Bergmann, Bhardwaj et al. 2009).

Los procesos de daño y muerte celular en tejido miocárdico en respuesta a varias patologías cardiacas, tienen un impacto importante en su función. La reducción en el número de cardiomiocitos resulta en falla contráctil. Los tipos de muerte celular comprenden la necrosis, la apoptosis y la autofagia, los cuales han sido observados en falla cardiaca (Narula, Haider et al. 1996, van Empel, Bertrand et al. 2005), infarto e isquemia/reperfusión ((Kostin, Pool et al. 2003)

Necrosis: Es un proceso generado por algún agente externo o no fisiológico (traumatismo, agentes infecciosos e isquemia) que produce una alteración en las membranas plasmática y mitocondrial. Se distingue por cambios degradativos no controlados y caracterizados por depleción de niveles de ATP, aumento del volumen celular y pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Estos cambios tienen como factor generador la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial mPTP (Bernardi and von Stockum 2012). La apertura contribuye al incremento en la

permeabilidad de la membrana mitocondrial permitiendo la salida de Ca^{2+} de la mitocondria hacia el citosol. Con ello, se produce swelling mitocondrial y pérdida del gradiente de protones que afecta la fosforilación oxidativa y consecuentemente la síntesis de ATP. Finalmente, estos cambios estimulan la activación de la muerte celular por necrosis.

Apoptosis: La apoptosis significa “muerte celular programada” y se caracteriza por achicamiento celular y fragmentación nuclear; es intensamente regulada y tiene tres fases no distintivas: una fase de inducción, una efectora y una de degradación. La primera fase comprende la activación de las cascadas de transducción de señales apoptóticas por factores como $\text{TNF-}\alpha$ y alteraciones en la familia de proteínas Bcl-2. En la segunda fase, ocurre la activación del dominio de muerte, activadores nucleares como p53 o liberación de citocromo *c*. En la fase final de degradación, se activan las caspasas y la membrana nuclear se rompe activando las endonucleasas, causando a su vez fragmentación nuclear. Tejidos como la piel y el intestino sufren continuamente apoptosis, para hacer espacio a células saludables; pero, en el caso del tejido cardiaco en el que el reemplazo celular es mínimo, la apoptosis no es un mecanismo frecuente.

Existen principalmente dos vías de señalización apoptótica: intrínseca y extrínseca. Ambas vías juegan un papel crucial en la inducción de apoptosis en el corazón.

La vía intrínseca es activada en los miocitos por estímulos celulares como hipoxia, isquemia-reperfusión y estrés oxidativo. Esta vía utiliza la mitocondria, la cual juega un papel clave en la regulación de la apoptosis para activar la muerte celular (Tait and Green 2013), mediada por señales intra- y extracelulares como el estado de oxidación/reducción y el incremento de ERO, que ocasionan la disrupción de la normal fisiología mitocondrial. El mecanismo comprende la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial y el incremento de la permeabilidad de las membranas interna y externa mitocondriales, desencadenando la repentina liberación de citocromo *c* y otras proteínas desde la mitocondria al citosol. El citocromo *c* se une a la proteína citosólica APAF1 facilitando la formación del “complejo apoptosoma” el cual resulta en la activación de

caspasa -9 y caspasa-3. (van Empel, Bertrand et al. 2005). Otros mecanismos incluidos en esta vía son la traslocación de Bax y Bad a la mitocondria.

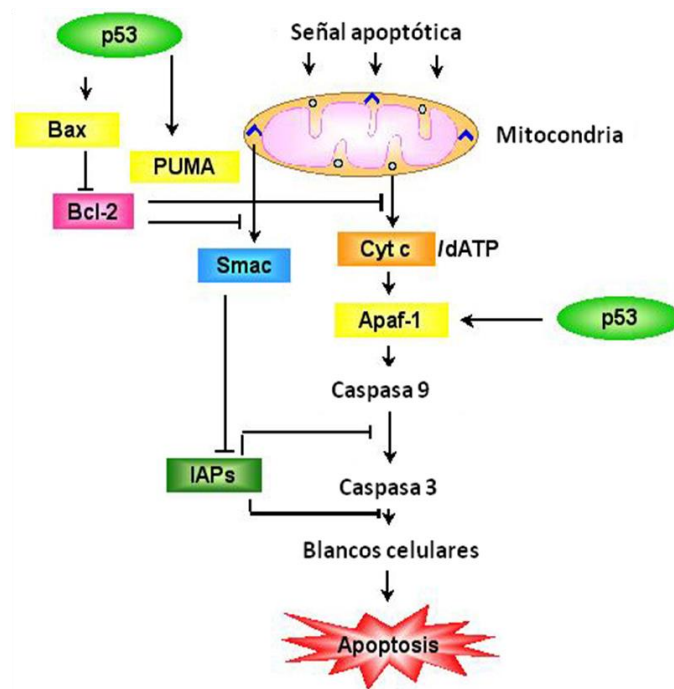


Figura 9. Esquema del mecanismo de señalización de la apoptosis por la vía intrínseca mitocondrial

La vía extrínseca es la vía de los receptores de muerte como el receptor Fas (CD95) y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNFR). La unión de Fas a su receptor FasL activa el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) y éste recluta procaspasa- 8, la cual es activada, y a su vez activa caspasa 3.

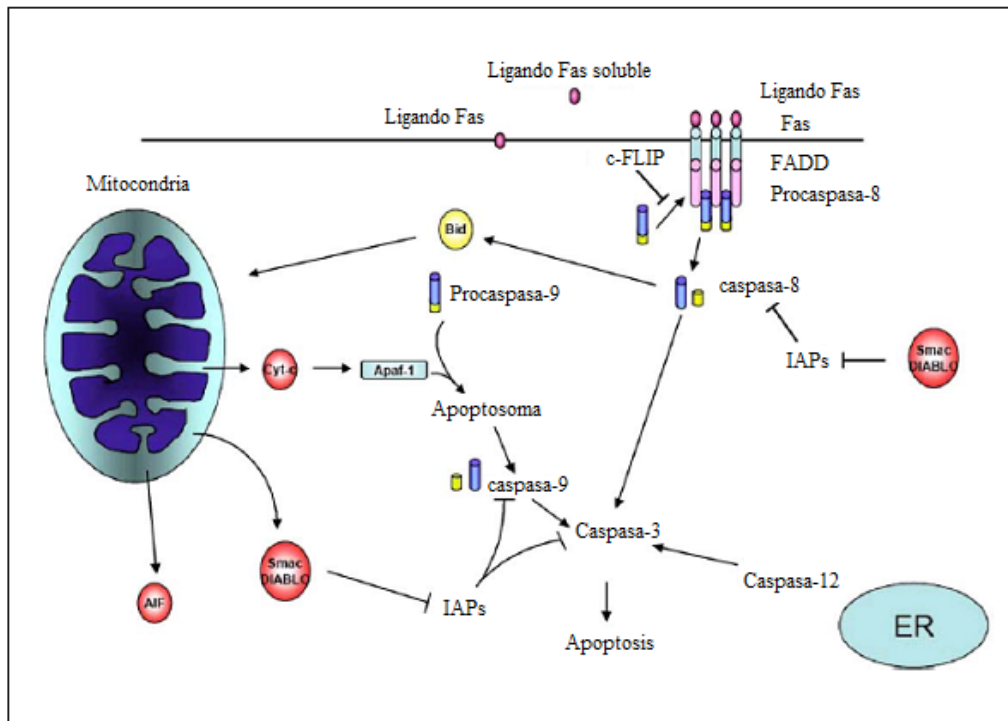


Figura 10. Esquema del mecanismo de señalización de la apoptosis por la vía extrínseca mitocondrial.

Modificada de Van Empel, Cardiovascular Research 2005

Una tercera vía, que también se ha encontrado involucrada en la apoptosis del miocito cardíaco es la iniciada por la caspasa- 12 (Okada, Minamino et al. 2004), la cual se supone es activada por estrés oxidativo en el retículo endoplasmático (RE). La implicancia directa de esta caspasa es bastante controversial debido a que no se ha demostrado que sea imprescindible para la iniciación de apoptosis por estresores del RE y además, puede ser activada por calpaína (Sriskandan and Altmann 2008).

En estudios tanto clínicos como experimentales en sepsis, se ha demostrado la activación de la apoptosis en el desarrollo de la disfunción miocárdica; estudios reportan un incremento de células apoptóticas aproximadamente entre el 30 y 40% en el caso específico de modelos LPC, tanto a las 6 horas (Ha, Hua et al. 2006) como a las 24 horas posteriores al procedimiento (Iwata, de Claro et al.).

Autofagia: Es un proceso dinámico por el cual se degradan y reciclan componentes citoplasmáticos, proteínas de larga vida y organelas celulares dañadas. Este proceso

participa en la respuesta a la privación de nutrientes, la diferenciación celular y el desarrollo. Los componentes son fagocitados por vacuolas de doble membrana denominadas autofagosomas, que posteriormente se fusionan a los lisosomas formando los autolisosomas, en donde son degradados.

La autofagia es un mecanismo homeostático permanente, con un nivel basal presente en casi todos los tipos celulares y juega un papel de mecanismo de supervivencia celular, como adaptación a la privación de nutrientes, limpieza y eliminación intracelular de proteínas y organelas como el retículo endoplasmático (reticulofagia), ribosomas (ribofagia), porciones de núcleo (nucleofagia), gotas lipídicas (lipofagia) y mitocondrias (mitofagia).

Uno de los principales marcadores de actividad autofágica es LC3, que se detecta como dos bandas en los ensayos de separación proteica: el LC3-I, el cual es citosólico, y el LC3-II, el cual es conjugado con la fosfatidiletanolamina y está presente sobre los autofagosomas y en menor cantidad en los autolisosomas. La conversión de LC3-I en LC3-II ocurre en los estadios tempranos de la formación del autofagosoma y no cesa hasta su degradación.

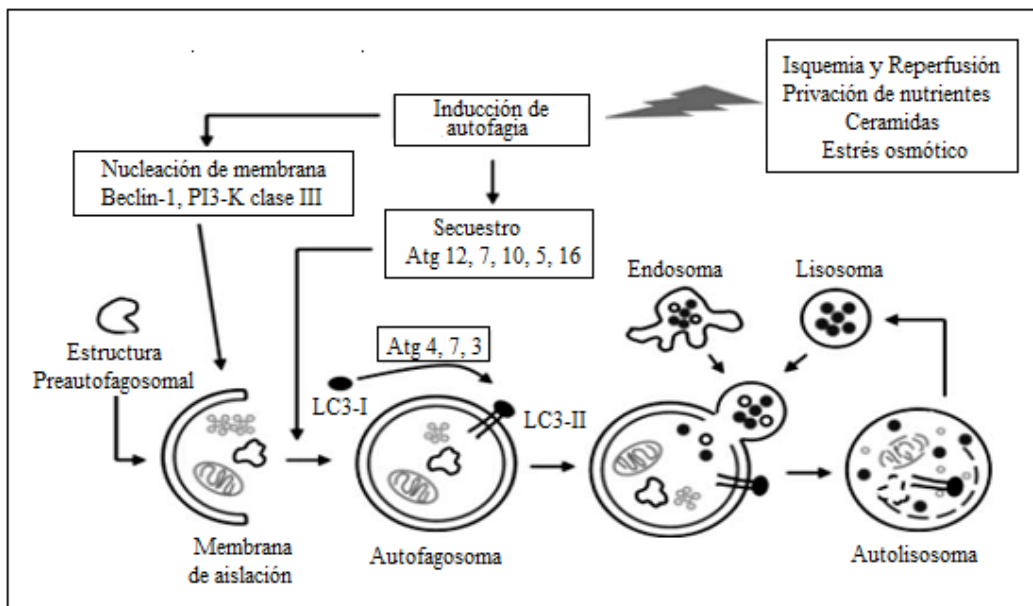


Figura 11. Esquema del proceso de autofagia en cardiomiocito. Adaptado de Aránguiz P, et al. *Autofagia del cardiomiocito: ¿un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular?*

La autofagia juega un papel importante en el corazón, en el cual regula la integridad de los cardiomiocitos y reduce la inflamación (Morales, Pedrozo et al. 2014). La autofagia es requerida para el control de calidad de las proteínas, la estructura celular normal y la protección de la acumulación de organelas anormales como la mitocondria, la que puede causar la disfunción cardíaca (Nishida, Kyoj et al. 2009). Alteraciones en el flujo son observados en respuesta a estrés (Kroemer, Marino et al. 2010) y se ha documentado en algunas patologías cardiovasculares, especialmente aquellas asociadas a procesos de isquemia/reperfusión (Hamacher-Brady, Brady et al. 2006).

Investigaciones sobre el proceso de autofagia en el miocardio de animales sépticos, han sido muy recientes. Los pocos estudios en los que se ha evaluado, tanto en endotoxemia por LPS (Vanasco, Saez et al. 2014) como en sepsis por LPC (Hsieh, Pai et al. 2011), han evidenciado la ocurrencia de autofagia con un incremento en la expresión de LC3-II, incluso tan temprano como 4 h post intervención. Estos estudios lo sugieren como un proceso con efecto cardioprotector.

2. SEPSIS

2.1. Generalidades

Conforme lo convenido por la ACCP/SCCM Consensus Conference de 1991 (Bone, Balk et al. 1992) y en conjunto con the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), the American Thoracic Society (ATS), and the Surgical Infection Society (SIS) en 2001 (Levy, Fink et al. 2003), la sepsis es definida como el estado de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) ante la presencia de una infección.

En el siguiente cuadro se define el espectro de esta patología y los criterios utilizados para su diagnóstico:

Criterios diagnósticos en sepsis. Adaptada de: Hunter JD. Sepsis and the Heart 2009.

Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)	Dos o más de las siguientes condiciones Temperatura > 38.5°C o < 35°C Frecuencia cardíaca > 90 latidos por minuto Frecuencia respiratoria > 20 /min o necesidad de ventilación mecánica Conteo de glóbulos blancos >12.000 o >10% presencia de formas inmaduras
Sepsis	SIRS y documentada infección (cultivo o coloración de Gram de sangre, esputo, orina o cualquier fluido estéril positivo para organismos patógenos) o foco de infección identificado visualmente.
Sepsis severa	Sepsis y al menos uno de los siguiente signos de hipoperfusión o disfunción orgánica: Áreas de piel manchada Llenado capilar superior a 3 seg Producción urinaria menor a 0.5 ml /kg por al menos 1 hora o terapia de reemplazo renal Lactato > 2 mmol / litro Conteo plaquetario <100.000 / ml o coagulación intravascular diseminada Daño pulmonar agudo/síndrome de distress respiratorio agudo. Disfunción cardíaca (ecocardiografía)
Shock séptico	Sepsis severa y una de las siguientes condiciones: Presión arterial <60 mmHg (<80 mmHg si hubo previa hipertension) Necesidad de dopamina > 5 µgr / kg . min
Shock séptico refractario	Necesidad de dopamina >15 µgr /kg.min o epinefrina o norepinefrina a 0,25 µg/kg.min para mantener la presión arterial media >60 mmHg

Como se puede apreciar en el cuadro anterior, la sepsis severa ocurre cuando la sepsis lleva a la disfunción orgánica o hipoperfusión; en ella se describe la presencia de la disfunción cardiovascular y específicamente la disfunción miocárdica (Mehta NJ, Int J

Cardiol 2004), la cual frecuentemente está asociada al incremento de la mortalidad en esta patología (Parrillo, Parker et al. 1990).

La disfunción cardiovascular durante la progresión de la sepsis se caracteriza por dos fases que han sido descritas tanto en humanos como en el modelo experimental LPC en ratones: una fase temprana (5 horas después LPC) o hiperdinámica y una fase tardía (24 horas después LPC) o hipodinámica (Yang, Chung et al. 2002). La primera fase se caracteriza por una incrementada actividad metabólica, un incremento en el transporte y consumo de oxígeno a nivel sistémico y una disminución en la resistencia vascular total; aquí actúa el sistema inmune innato reconociendo microorganismos por medio de TLRs (toll-like receptors) lo que estimula la transcripción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 y proinflamatorias como TNF- α e IL-1 y -6; éstas a su vez, activan neutrófilos los cuales liberan moléculas que incrementan la permeabilidad vascular y con ello la extravasación del fluido vascular a los órganos y tejidos. Esto ocasiona que las células endoteliales liberen óxido nítrico que se asocia a la reducción de la contractilidad miocárdica (Herbertson, Werner et al. 1996). En la fase tardía, el transporte y consumo de oxígeno decrece significativamente, así como también la tasa metabólica y aumenta la resistencia vascular; en ésta se ha establecido que la inmunosupresión y la apoptosis son los procesos principales.

2.2 Disfunción Miocárdica en sepsis

A pesar del conocimiento de estos mecanismos generales se desconoce puntalmente la fisiopatogénesis del daño multiorgánico inducido por sepsis y específicamente la relacionada a la disfunción miocárdica. Los múltiples factores relacionados que han sido ya corrientemente descritos, son: los cambios micro- y macro-circulatorios, la liberación de mediadores inflamatorios, el estrés oxidativo, el óxido nítrico y la disfunción mitocondrial (Andresen and Regueira 2010, Hunter and Doddi 2010) (Merx and Weber 2007).

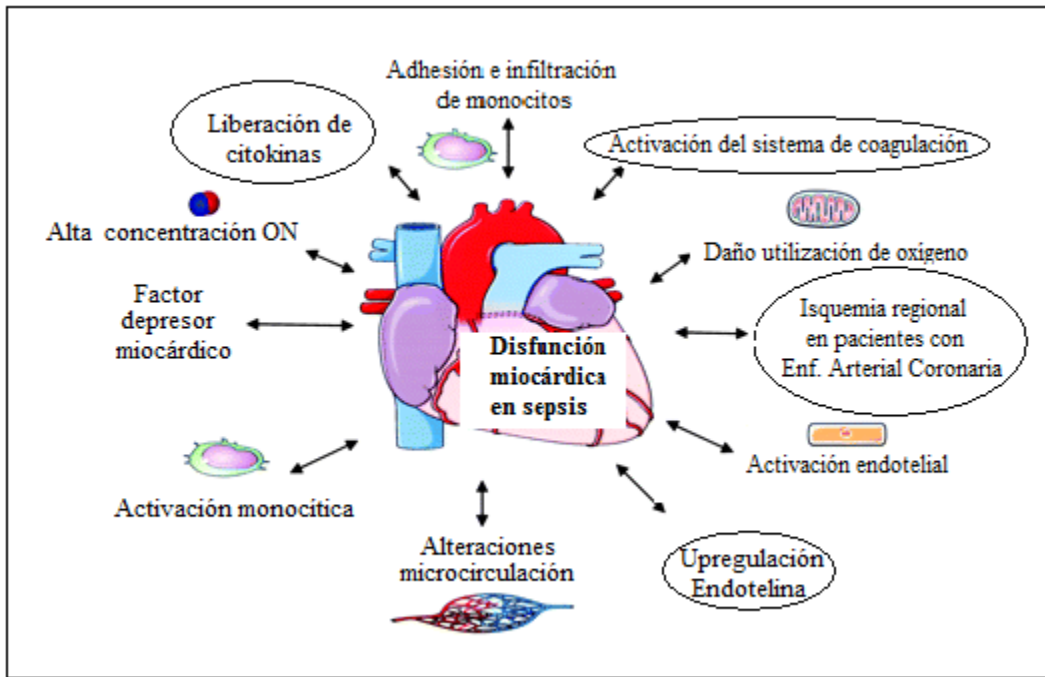


Figura 12. Sinopsis de los mecanismos subyacentes en Disfunción miocárdica por sepsis.

Adaptada de Merx, et al.

2.2.1 Mediadores Inflamatorios en sepsis

Como se mencionó anteriormente, durante la sepsis el organismo responde produciendo gran cantidad de citoquinas las cuales activan la respuesta del sistema inmune y estimulan diferentes vías de señalización intracelular. La activación del sistema inmune genera e incrementa la producción de ERO tales como el peróxido de hidrógeno y el superóxido que conjuntamente con la saturación del sistema antioxidante produce una alteración en el estado redox llamado estrés oxidativo. Este estado de estrés oxidativo aunado a la actividad de citoquinas es considerado clave en la generación de la disfunción orgánica, que para algunos autores podría ser más bien un proceso adaptativo y de protección celular (Rudiger, Stotz et al. 2008).

Las citoquinas provocan el aumento de kinasas como la piruvato deshidrogenasa kinasa (PDH kinasas) que inhibe su función provocando la reducción de sustratos para la fosforilación oxidativa y por tanto la reducción de ATP (Vary 1991). Citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α e IL-1 β son liberadas por los macrófagos e *in vitro* han

demostrado deprimir la contractilidad cardiaca (Atefi, Zetoune et al.), así como también las IL-6, -8 y -10 (Joulin, Petillot et al. 2007).

Además de la actividad de citoquinas, existen otros mecanismos celulares que explican la disfunción orgánica como la producción de óxido nítrico inducible, el desbalance oxidación-reducción generado por el estrés oxidativo y la disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial.

2.2.2 Especies activas del O₂ en miocardio durante la sepsis

Fuentes potenciales de especies reactivas en miocardio durante sepsis incluyen: mitocondria, NAD(P)H oxidasa, Xantina oxidasa, óxido nítrico sintasas desacopladas y células inflamatorias infiltrantes.

NAD(P)H oxidasa

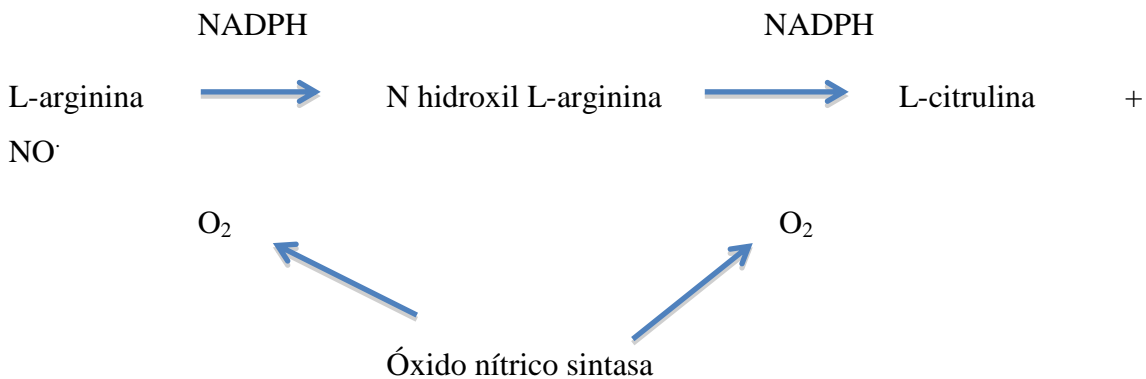
Se ha reportado la presencia de NADPH oxidasas en células cardiovasculares y entre ellas los cardiomiocitos; las isoformas presentes son NOX2 y NOX4 (Byrne, Grieve et al. 2003). A diferencia de las isoformas de los neutrófilos, éstas generan continuamente ERO intracelularmente a un bajo nivel y por diferentes estímulos, como en el caso de la sepsis, por la unión de TNF- α a la pared celular. Esta enzima cataliza la producción de anión superóxido por la reducción de un electrón de oxígeno usando como dador de electrones primarios el NADPH. Las ERO derivadas de esta oxidasa se han hallado implicadas en la inactivación del NO derivado del endotelio con la consecuente disfunción sistólica (MacCarthy, Grieve et al. 2001).

2.2.3 Óxido nítrico y especies activas relacionadas en miocardio durante la sepsis

El óxido nítrico es un gas que reacciona rápidamente con el O₂ para formar otros compuestos nitrogenados como NO₂, N₂O₃ y finalmente ser convertido a nitrito NO₂⁻ y nitrato NO₃⁻; es una molécula considerada radical libre porque tiene un electrón desapareado en su molécula; fisiológicamente actúa como mediadora en la

comunicación celular, en la respuesta inmune del huésped, en neurotransmisión y como potente vasodilatador.

El NO es sintetizado por tres distintas óxido nítrico sintasas: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS), que son expresadas en casi todos los tejidos y órganos. nNOS y eNOS son enzimas constitutivas Ca^{2+} dependientes que están expresadas a bajos niveles, y su expresión esta sujeta a regulación (Forstermann, Boissel et al. 1998). iNOS en una enzima calcio independiente, que si bien principalmente es expresada en macrófagos y tejidos en respuesta a mediadores proinflamatorios, también se sabe que se expresa en condiciones fisiológicas a bajos niveles en algunos tejidos (Park, Park et al. 1996). El NO se sintetiza a partir del sustrato L-arginina en presencia de calmodulina y 4 cofactores más: flavín mononucleótido (FMN), flavín adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (THB) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). La biodisponibilidad de L-arginina es uno de los mecanismos regulatorios de la producción de NO.



En el organismo, el NO puede reaccionar con el O_2^- y formar peroxinitrito ONOO^- que es un agente fuertemente oxidante capaz de modificar la estructura y función de aminoácidos, proteínas y enzimas. Puede inducir la nitración llevando a la formación de 3-nitrotirosina.

Diversas condiciones patológicas se asocian a una alterada o excesiva producción de NO y especies reactivas de nitrógeno, conocida como estrés nitrosativo. En el shock

séptico hay una elevada producción de NO asociada a la liberación de citoquinas proinflamatorias y alteraciones metabólicas. También se relaciona con la disminución de la contractilidad miocárdica durante la progresión de la sepsis.

El papel del óxido nítrico (NO) en la patogénesis de la disfunción miocárdica es poco claro. Desde hace más de una década se ha confirmado la inducción de liberación de NO, no sólo por la microvasculatura sino también por los cardiomiocitos (Ishiwata, Guo et al. 1997) y específicamente la incrementada producción de NO en el miocardio endotoxémico (Khadour, Panas et al. 2002). El aumento de niveles de NO a consecuencia de la mayor expresión de iNOS, incrementa su reacción con especies reactivas como el anión superóxido, generando radicales como el peroxinitrito; éste, finalmente bloquea la respiración mitocondrial.

2.2.4 Disfunción mitocondrial en miocardio durante la sepsis

La disfunción mitocondrial es un factor importante en la disfunción orgánica por sepsis (Fink 2001) y por tanto en la progresión del daño al miocardio y su función (Palaniyandi, Qi et al.). Aunque, tal como se ha documentado en previas revisiones (Crouser 2004) de estudios realizados tanto en humanos como en modelos animales de sepsis, el daño mitocondrial inducido por sepsis y su asociación con el fallo orgánico es controversial; puesto que, no se ha podido establecer si es la causa primaria o por el contrario el resultado de cambios fisiopatológicos orgánicos durante la sepsis, como por ejemplo la hipoxia citopática.

Datos de diversos estudios en el contexto de sepsis experimental, han evidenciado el detrimento en la estructura y función mitocondrial en corazones de animales sépticos; daño que ha sido variable conforme la inconstancia en el método de intervención utilizado (CLP o LPS), la severidad, la progresión a los tiempos de evaluación y el modelo animal usado. En general, las alteraciones observadas comprende la inhibición de los complejos mitocondriales (principalmente de complejos I y IV), la anormalidad en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, la disolución del gradiente

electroquímico, la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y depleción mitocondrial (Watts, Kline et al. 2004).

2.3 Estudios en disfunción miocárdica en sepsis

Teniendo en cuenta la relevante importancia del estrés oxidativo dentro de los múltiples factores involucrados en la disfunción miocárdica en sepsis, en los últimos 10 años se ha investigado la utilidad de la suplementación o potenciación con distintas terapias y agentes antioxidantes a nivel experimental. La evidencia es inconclusa debido a la gran variabilidad en varios aspectos entre los estudios.

Entre los estudios que han evaluado compuestos antioxidantes como el resveratrol, uno ha utilizado como modelo de sepsis endotoxemia por LPS en ratas (Sebai, Sani et al. 2011) y el otro LPC en ratón (Smeding, Leong-Poi et al. 2012). Igualmente, las mediciones realizadas fueron muy diferentes entre estos estudios; Sebai determinó los efectos sobre la lipoperoxidación y la actividad enzimática antioxidante, y Smeding los efectos sobre la integridad morfológica tisular, sobrevida y fracción de eyección ventricular. Estos últimos parámetros también se han determinado, pero evaluando como agente antioxidante la melatonina (Zhang, Liu et al. 2013).

La forma de intervención ha sido otro aspecto variable. Los anteriores estudios fueron realizados bajo un esquema de suplementación antioxidante y algunos otros en modelos de animales que sobreexpresan el antioxidante específicamente en corazón, como por ejemplo catalasa (Turdi, Han et al. 2012) y SOD1 (Baumgart, Simkova et al. 2009); estos estudios difieren también en el modelo de sepsis utilizado y parámetros valorados.

Al día de hoy, los resultados que apuntan tanto hacia la prevención como a la mitigación o reducción del estrés oxidativo mitocondrial y por consiguiente del daño miocárdico, sugieren potenciales beneficios, en especial de terapias mitocondriales (Dare, Phillips et al. 2009) (Galley). Con Trx1 se han realizado aproximaciones con el uso de terapia génica, donde se demostró contrarrestar el daño en la angiogénesis y la disfunción miocárdica (Samuel, Thirunavukkarasu et al. 2010).

3. Estrés oxidativo y Sistemas Antioxidantes celulares

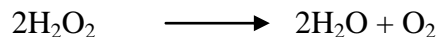
3.1 Generalidades

Los radicales libres tanto las especies reactivas del oxígeno como especies reactivas del nitrógeno, son fisiológicamente necesarios y desencadenan variedad de respuestas celulares tales como transducción de señales, proliferación, expresión de genes, diferenciación y apoptosis; sin embargo, a altos niveles ocasionan daño a componentes celulares como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.

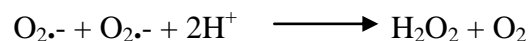
Para nivelar y contrarrestar el efecto nocivo del exceso de producción de estos radicales libres, el organismo cuenta con mecanismos como la defensa antioxidante que intercepta las especies reactivas del oxígeno evitando con ello la generación de nuevos radicales libres. Un desbalance ocasionado ya sea por producción excesiva de radicales libres o por reducción en la capacidad antioxidante, provoca la situación conocida como estrés oxidativo y/o nitrosativo.

En la célula existen diferentes sistemas antioxidantes que se clasifican en Enzimáticos y No-enzimáticos. Los antioxidantes No-enzimáticos son el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocopherol (vitamina E), glutatión, carotenoides, flavonoides, entre otros. Los sistemas antioxidantes Enzimáticos son la Catalasa, la Superóxido Dismutasa (SOD), el sistema Glutatión peroxidasa (GPx), y el sistema Tiorredoxina.

La catalasa se especializa en la conversión de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua.



Existen tres formas de la superóxido dismutasa, Mn-SOD (SOD2) que se localiza en la matriz mitocondrial, Cu,Zn-SOD (SOD1) que se localiza en el citoplasma celular y espacio intermembrana mitocondrial y la SOD extracelular que está en el espacio extracelular. Todas las superóxido dismutasas catalizan la reacción de conversión del $O_2\cdot^-$ a H_2O_2 :



El sistema GPx consiste del par glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG), glutatión reductasa, y glutarredoxina (GRX). No sólo intercepta directamente a especies reactivas del oxígeno sino que también regula el estado redox intracelular.

3.2 Sistema Tiorredoxina

El sistema tiorredoxina es una familia de proteínas que está compuesto por dos isoformas de tiorredoxina (Trx), Trx citosólica (Trx1) y Trx mitocondrial (Trx2), sus tiorredoxinas reductasas (TrxRs), su inhibidor -la proteína interactuante con tiorredoxina (TXNIP)- y NADPH. Este sistema antioxidante mantiene el ambiente fisiológico celular a través de la regulación oxidación/reducción (redox) celular, para ello pasa a un estado oxidado de Tiorredoxina (Trx-S₂) que es reversible, para luego ser reducida (Trx-(SH)₂) recibiendo electrones del NADPH en presencia de TrxR.

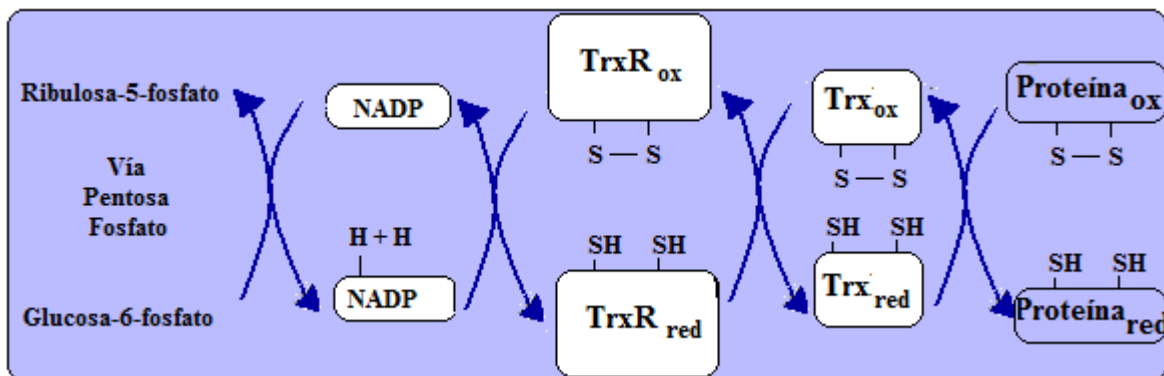
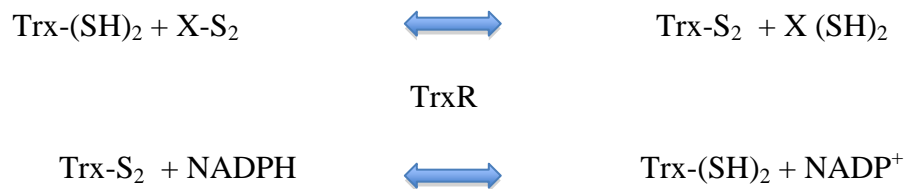


Figura 13. Cascada oxidación/reducción del sistema Tiorredoxina. Adaptado de Lee et al.

3.2.1 Estructura y función de Tiorredoxina-1

Tiorredoxina fue descubierta en 1964 como donante de hidrógeno para la ribonucleótido reductasa de *Escherichia coli* (Laurent, Moore et al. 1964). Es una pequeña proteína (12 kDa), antioxidante multifuncional con un centro redox activo que contiene dos residuos cisteína -³²Cys-Gly-Pro-³⁵Cys- que le confieren actividad disulfuro reductasa.

Su estructura tridimensional fue descubierta en 1975 (Holmgren, Soderberg et al. 1975) gracias a tempranos estudios con Trx de *E. coli* (Katti, LeMaster et al. 1990), los cuales mostraron que es una proteína compacta globular con 5 hebras beta plegadas formando un centro rodeado de cuatro hojas alfa hélice sobre la superficie externa.

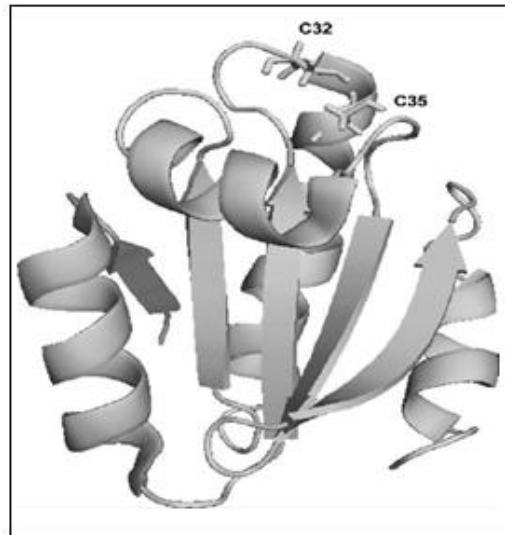


Figura 14. Estructura tridimensional de Tiorredoxina. Tomado de Lee 2012

Este sistema está relacionado a una gran variedad de procesos celulares dependiendo de su localización. Trx1 es principalmente citosólica y tiene un papel importante en el metabolismo celular facilitando la reducción de ERO, la regulación de la homeostasis de tioles proteicos y directamente reparando proteínas oxidativamente dañadas por

medio de su reducción, transfiriéndole los electrones desde sus cisteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro. Trx1 también regula un amplio rango de funciones celulares incluyendo el crecimiento celular (Yoshioka, Schreiter et al. 2006), proliferación y apoptosis (Nakamura, Nakamura et al. 1997).

La función antioxidante de Trx1 refiere a la remoción directa de H_2O_2 . Trx al igual que el sistema Grx, son los sistemas más versátiles en la detoxificación de H_2O_2 . En el plasma, donde existen altos niveles de glutatión reducido, se ha sugerido que Trx1, que se encuentra en concentraciones de hasta 6 nM, ejerce acción antioxidante poco significativa. En las células su acción la ejerce a través de tiorredoxina peroxidasa (Powis and Montfort 2001).

Trx1 puede ser secretada extracelularmente en donde muestra un efecto citoprotector y antiinflamatorio funcionando como citoquina (Nakamura 2005); puede ser traslocada del citoplasma al núcleo en donde interactúa con varios factores de transcripción y realiza transducción de señales intracelulares y síntesis de ADN (Mahmood, Abderrazak et al.); además, regula vías de señalización del NO (Sengupta and Holmgren 2011).

Trx1 se une a varias proteínas celulares, estando sólo en su forma reducida. Una de las proteínas más conocidas a las que se enlaza es la kinasa de señalización apoptótica (ASK1), inhibiendo la apoptosis.

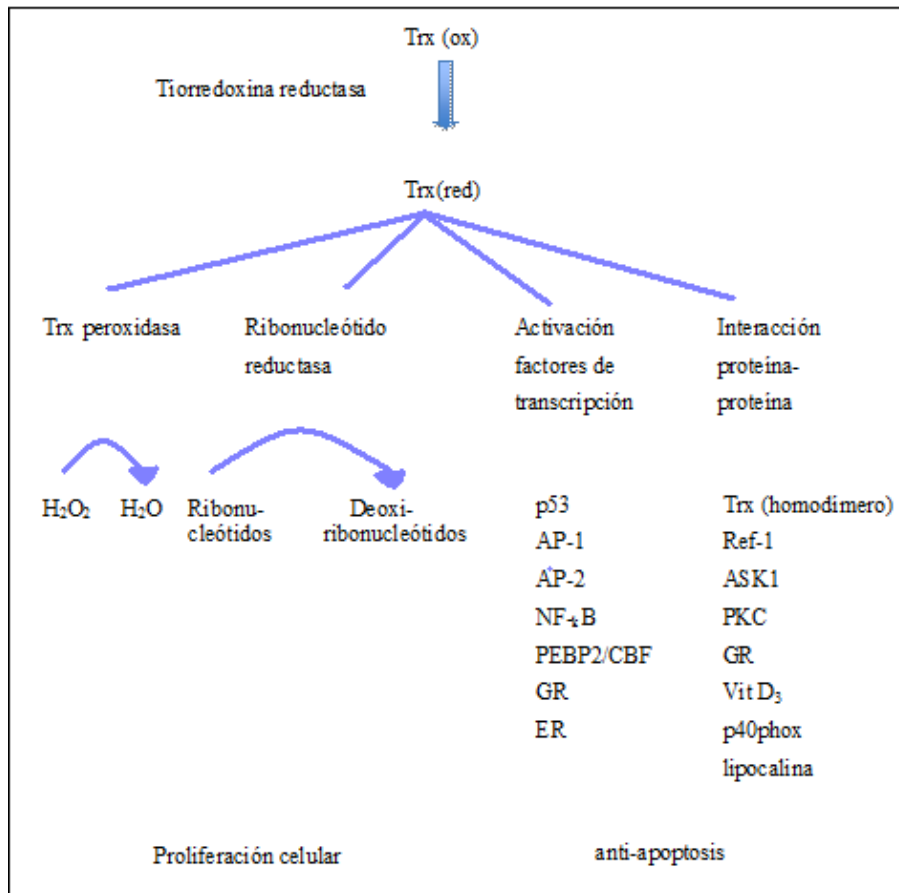


Figura 15. Acciones de Trx en la célula. Tomado de Powis G, 2001.

Trx2 se expresa específicamente en la mitocondria y ejerce un papel de vital importancia durante el desarrollo embrionario, hematopoiesis y función cardiaca; su ausencia genera temprana letalidad, acumulación de especies reactivas de oxígeno, masiva apoptosis y en ratones con deficiencia específica en corazón, cardiomiopatía dilatada y falla cardiaca congestiva (Kobayashi-Miura, Shioji et al. 2007). La sobreexpresión confiere resistencia a la apoptosis y prevención de la disfunción mitocondrial en condiciones similares al insulto séptico (Mahmood, Abderrazak et al. , Lowes and Galley 2011)

3.2.2 Regulación y modificaciones post-traduccionales de Tiorredoxina-1

La expresión y función de Trx1 está regulada por mecanismos transcripcionales, modificaciones post-traduccionales y cambios en la localización subcelular. Trx1 contiene en su sitio activo dos cisteínas activas C32 y C35 y en los mamíferos tres cisteínas adicionales no activas en las posiciones 62, 69 y 73. Las modificaciones post-traduccionales como la glutationilación, la oxidación de tioles e incluso la S-nitrosilación en las cisteínas no activas contribuyen a su regulación funcional.

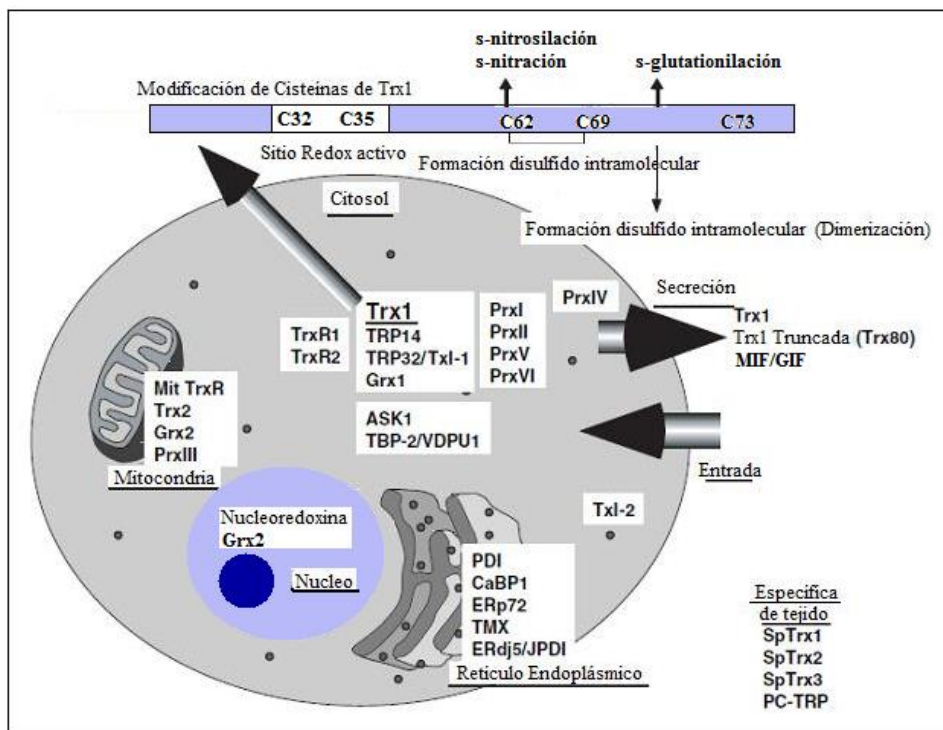


Figura 16. Modificaciones de las cisteínas y localización subcelular del sistema Tiorredoxina.

Modificada de Nakamura 2005

Trx1 es susceptible, y se inactiva su función disulfuro reductasa, ante la presencia de productos de lipoperoxidación como los aldehídos reactivos, función por medio de la cual, a su vez, modula la transnitrosilación y desnitrosilación de otras proteínas (Wu C, 2011).

La nitración es una modificación irreversible que ocurre primariamente en residuos de tirosina; el NO que es generado por las NOS no puede nitrosilar cisteínas directamente, por tanto, la S-nitrosilación tiene lugar por transnitrosilación (paso de NO de S-nitrosotioles al tiol cisteína); la nitración por peroxinitrito parece abolir las actividades disulfuro reductora y antiapoptótica de Trx1. La S-nitrosilación de Trx1 ocurre en C62, C69 o C73 y parece tener propiedades antiapoptóticas que son independientes de su actividad disulfuro reductasa.

3.2.3 Sistema Tiorredoxina en la enfermedad cardiovascular

El sistema Trx ha demostrado estar envuelto en la gran variedad de enfermedades humanas, incluyendo síndromes metabólicos, cancer y enfermedad cardiovascular, aunque su función es controversial puesto que se desconoce si sus niveles elevados actúan como estimulador o como respuesta ante el incremento del estrés oxidativo (Mahmood, Abderrazak et al. 2013).

En enfermedad cardiovascular parece jugar un papel antagonista benéfico debido a que en su desarrollo, la producción de ROS está implicada como componente integral. Estudios muestran el papel protector en patologías como angiogénesis cardíaca, aterosclerosis, hipertrofia cardíaca, disfunción contractil por desregulación de canales de potasio en isquemia-reperfusión, entre otras.

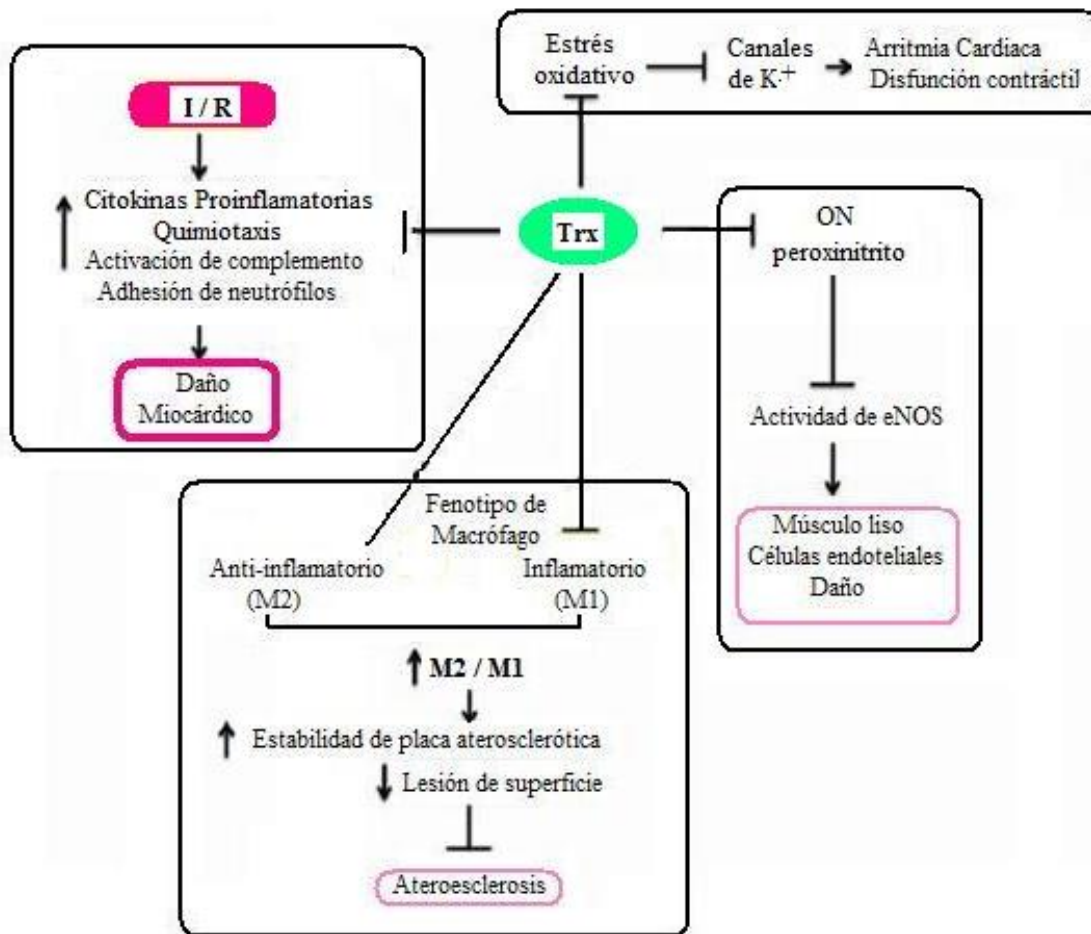


Figura 17. Papel protector de Trx1 en Enfermedad cardiovascular. Modificado de Mahmood 2012

El gráfico anterior resume el papel protector de Trx1 en la enfermedad cardiovascular. Por un lado, Trx1 ha demostrado proteger la actividad de eNOS de la acción del NO y del peroxinitrito, evitando así el daño endotelial. Trx1 también ha mostrado inhibir la expresión de las citoquinas proinflamatorias, la activación del complemento y la adhesión de neutrófilos, característicos de la isquemia-reperfusión.

Hipótesis y Objetivos

El presente estudio está dirigido a investigar la siguiente hipótesis: *“Durante la disfunción miocárdica en la sepsis, la tiorredoxina 1 (Trx1) protege al tejido cardiaco contra la disfunción miocárdica, la disfunción mitocondrial y la apoptosis por medio de la disminución de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. La regulación del estado redox celular determina un menor daño funcional y estructural del tejido miocárdico”*.

Objetivo General

Estudiar el mecanismo protector de la Trx1 contra la disfunción miocárdica y mitocondrial y la apoptosis en el miocardio, en el modelo de sepsis experimental inducido por la técnica de ligadura y punción cecal en ratones transgénicos sobre-expresando Trx1 en músculo cardíaco (Tg-Trx1).

Objetivos Específicos

1. Determinar el tiempo de sobrevida en los ratones Tg-Trx1 y compararla con los ratones control WT
2. Cuantificar marcadores bioquímicos específicos de lesión hepática, renal y muscular en sepsis
3. Determinar si los ratones Tg-Trx1 registran una mejor función contráctil durante el progreso de la sepsis
4. Investigar si Trx1 ayuda a preservar la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en miocardio

5. Determinar si Trx1 regula la expresión y actividad de otras enzimas antioxidantes y óxido nítrico sintasas, con la consecuente reducción del daño oxidativo y nitrosativo en el tejido miocárdico

6. Investigar el mecanismo de muerte celular en los cardiomiocitos durante la disfunción miocárdica en la sepsis y su regulación por Trx1

7. Investigar los mecanismos de dinámica y biogénesis mitocondrial y su modulación por Trx1 en el tejido miocárdico en la sepsis

Materiales y Métodos

1. Modelo animal de experimentación

Se utilizaron ratones machos entre las 14-20 semanas de vida y 25-35 g de peso, transgénicos Tg-trx1 (con sobreexpresión específica en corazón de tiorredoxina-1) y sus controles FVB wildtype, sobre los cuales fueron generados usando el promotor de la cadena pesada de alfa-miosina (Yamamoto, Yang et al. 2003). Estos ratones fueron criados en el Bioterio central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA y suministrados por el Instituto de Fisiopatología Cardiovascular de la Facultad de Medicina – UBA (por cortesía del Dr. Junichi Sadoshima (New Jersey Medical School, Newark, Rutgers University, New Jersey, USA).



Figura 18. Ratones transgénico Tg-trx1 (a la izquierda) y wildtype (a la derecha) FVB.

Los animales fueron mantenidos con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas con acceso a una dieta común y agua de grifo *ad libitum*. Se siguieron los criterios de cuidado y uso de animales de laboratorio para investigación bajo las normas éticas de la Directiva 86/609 del Consejo Europeo y los Lineamientos del National Health Institute (NHI) (Publicación N° 85-23, revisada en el año 1996, Oficina de Ciencias y Reportes de Salud, División de Recursos de Investigación, NHI, Bethesda, MD 20205).

El protocolo y diseño de experimentación fue aprobado por resolución N° 374 del Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio - CICUAL de la Facultad de Medicina de la UBA, de acuerdo a lo establecido en la resolución (CS) N° 4081/04.

1.1 Modelo de ligadura y doble punción cecal (LPC)

Los animales fueron mantenidos con libre acceso a comida y agua hasta el momento del estudio. Para inducir una sepsis abdominal polimicrobial, a los ratones se les suministró intraperitonealmente ketamina/xilacina ($100 \text{ mg kg}^{-1} / 5 \text{ mg kg}^{-1}$) para inducir anestesia general. Luego de previa asepsia de la región abdominal con yodopovidona, se realizó una incisión media de 1,5 a 2,0 cm para explorar la cavidad abdominal, identificar y exponer el ciego. La base del ciego fue firmemente ligada con lino quirúrgico 0/0 sin alterar la continuidad del tracto intestinal y se le realizaron dos punciones sobre su borde anti-mesentérico con aguja número 21. El ciego fue suavemente apretado para extraer una pequeña cantidad de heces por los sitios de punción y posteriormente recolocado dentro de la cavidad abdominal. La pared abdominal fue finalmente cerrada en dos planos.

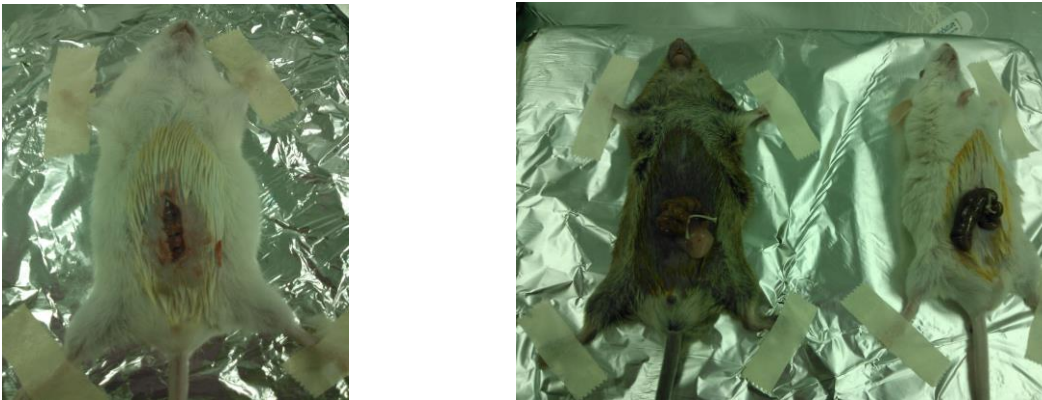


Figura 19. Modelo experimental de LPC. Incisión de 1,5 cm (a la izquierda) y exposición del ciego con ligadura y punción (a la derecha).

A los grupos control se les realizó una cirugía sham (laparotomía y exposición cecal sin ninguna otra manipulación) y cierre de la pared. Los animales fueron resucitados con solución salina normal (NaCl 0.9%, 1 ml vía subcutánea) y medicación analgésica por única vez (tramadol $20 \mu\text{gr/g}$ peso) inmediatamente después de LPC. Los animales fueron sacrificados 6, 18 y 24 h después y el corazón aislado para análisis posteriores.

2. Procedimientos de experimentación en órgano entero

2.1 Técnica de Langendorff (corazones aislados y perfundidos)

Para este experimento a los animales con 0 (sham) 6 y 24 h de sepsis, se les indujo anestesia general con una dosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (150 mg/kg peso). Una vez anestesiados, se realizó una incisión media desde el abdomen hasta el cuello, retirándose el esternón por completo, quedando expuesta la cavidad torácica y el corazón; la aorta fue inmediatamente canulada con una aguja número 21 y fijada con un clamp arterial en la oliva de la cánula. Seguidamente, el corazón fue montado y perfundido conforme a la técnica de Langendorff con buffer Krebs-Henseleit conteniendo (mM): NaCl, 118,5; KCl, 4,7; NaHCO₃, 24,8; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄, 1,2; CaCl₂, 2,5; y glucosa, 10. El buffer a 37°C con pH 7,2-7,4 y con oxigenación 95% de O₂ y 5% de CO₂ (rango fisiológico).

En el corazón ya perfundido, dos electrodos fueron suturados en la aurícula derecha y conectados a un marcapaso produciendo una frecuencia cardiaca constante de 470 latidos/min. En el ventrículo izquierdo (VI) y a través de la aurícula izquierda se introdujo un balón de látex delgado y distensible unido por un tubo de polietileno (diámetro interno: 2 mm; diámetro externo: 3,7 mm) a un transductor de presión (Deltram II, Utah Medical System, Midvale, UT, USA) para registrar la presión del VI. La presión desarrollada por el VI (PDVI) fue calculada como la diferencia entre el pico de presión sistólica y la presión ventricular de fin de diástole. La reserva contráctil fue evaluada como la PDVI a t50, comparando el PDVI antes y después del estímulo β-adrenérgico por medio del agregado de isoproterenol (ISO) (1 μM) a la línea de perfusión.

2.2 Determinación del tiempo de sobrevida

La sobrevida fue evaluada en siete animales por grupo, sujetos a LPC. Los animales se evaluaron cada 6 h y durante un tiempo máximo de 60 horas, teniendo en cuenta la movilidad, letargia, piloerección y secreción ocular.

3. Procedimientos de obtención y cuantificación de muestras

3.1 Obtención de homogenizados

El corazón fue extraído e inmediatamente colocado en buffer MSHE a 4°C [0,22 M manitol, 70 mM sacarosa, 0,5 mM EGTA, 2 mM K-HEPES pH 7,4 con 5 µg/ml de aprotinina y leupeptina, 100 µg/ml PMSF, 10 µg/ml pepstatina]. El órgano fue cortado en pequeños trozos y homogeneizados en un Potter Evelheim.

El homogenato del tejido fue centrifugado a 2300 rpm a 4°C para descartar el tejido no disgregado, células enteras y núcleos. Parte del sobrenadante se fraccionó en alícuotas (corresponde a la fracción: Homogenato), y el resto fue utilizado para obtener fracción mitocondrial.

3.2 Aislamiento de mitocondrias

La obtención de las mitocondrias se realizó por gradiente de centrifugación en una centrifuga Sorvall; para ello, el homogenato fue centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos para precipitar las mitocondrias. Luego de la centrifugación el sobrenadante (corresponde a la fracción: Citosol) se centrifugó a 14.000 rpm con el fin de eliminar los restos de mitocondria y fue conservado a -80°C; y el pellet (corresponde a la fracción: Mitocondria) fue resuspendido en 3 ml de MSHE con 0,1% seroalbúmina bovina (BSA) y centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Finalmente, los pellets fueron resuspendidos dos veces consecutivas en 3 ml MSHE (lavados) y centrifugados a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

Mitocondrias frescas fueron usadas para la evaluación del potencial de membrana. La fracción restante fue conservada a -80°C y en un tiempo no mayor a 24 h utilizada para determinar producción de peróxido de hidrógeno. Para determinar la actividad de complejos mitocondriales, actividad de MnSOD y western blotting, la mitocondria fue sujeta a tres ciclos de congelación-descongelación seguido por un paso de homogenización a través de una aguja hipodérmica 29 G.

3.3 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas fue utilizado el método de Bradford descrito a continuación:

- Preparación del reactivo: Una dilución 1:5 de reactivo de Bradford con agua destilada fue preparada en la oscuridad y luego se filtró y se guardó en frasco color caramelo hasta su uso.
- Curva de calibración: Se utilizó una solución madre de 1 µg/µl BSA y la curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones de BSA: 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 µg/µl y un blanco de agua destilada.
- Ensayo de muestras, controles y pooles: En microplaca de 96 pocillos con base plana se realizó por duplicado cada determinación. Previa dilución, 5 µl de la muestra se colocaron en cada pocillo, luego se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford. Se incubó durante 10 minutos e inmediatamente se leyó la absorbancia a 620 nm y se calculó la concentración de proteínas interpolando en la curva de calibración.

4. Procedimientos bioquímicos

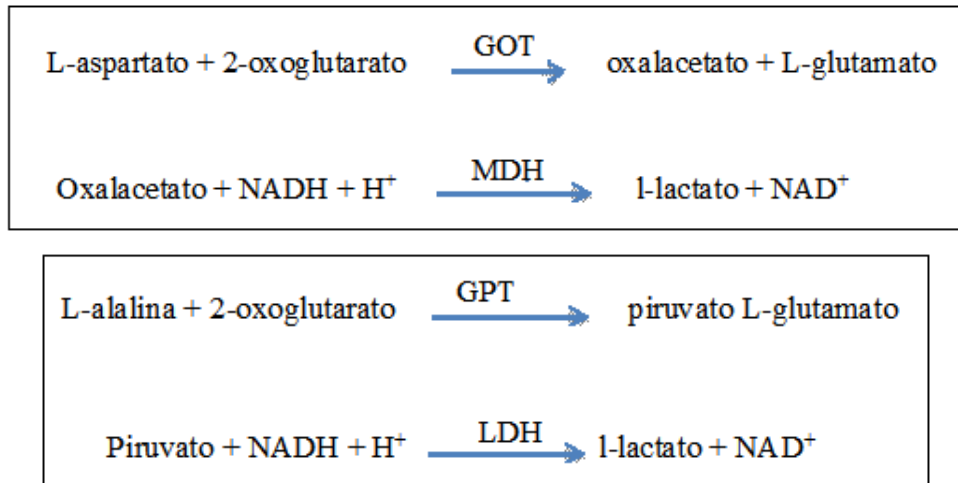
4.1 Evaluación de marcadores bioquímicos en suero

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la arteria mamaria en eppendorfs de 1 ml, sin anticoagulante. Después de media hora a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm x 10 minutos y el suero libre de hemólisis inmediatamente separado; los sueros se guardaron a -20 °C por un tiempo no superior a 15 días, hasta su uso para examinar la actividad de principales enzimas a nivel sistémico, como control del proceso séptico: transaminasas (AST y ALT), creatina quinasa total (CK), la isoenzima miocárdica (CK-MB), lactato deshidrogenasa (LDH) y urea. La medición se realizó en un autoanalizador Hitachi 902.

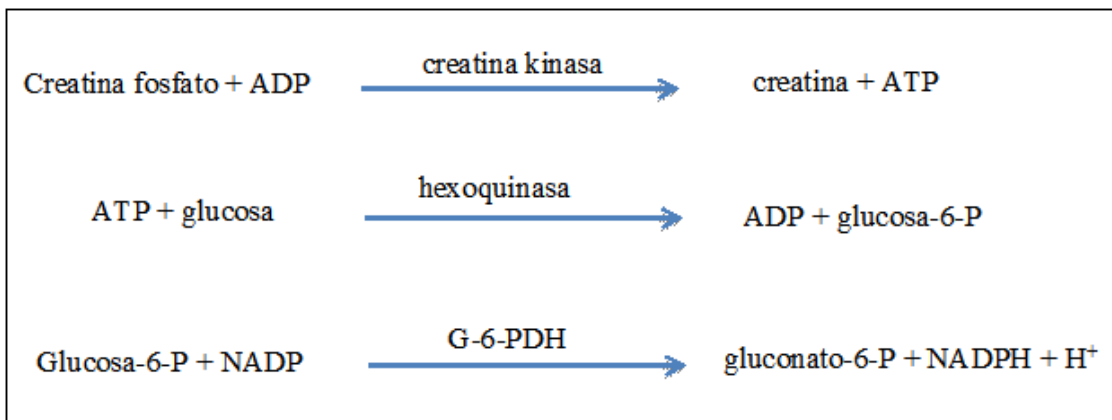
La actividad catalítica de la aspartato aminotransaminasa (AST) y la alanina aminotransaminase (ALT) fue determinada espectrofotométricamente por la medición en la reducción de NADH a 340 nm por la malato deshidrogenasa (MDH) para la AST y por la

lactato deshidrogenasa (LDH) para la ALT (Reitman and Frankel 1957). Los resultados son dados en U/l.

Los sistemas de reacción fueron los siguientes:



La actividad de CK total se determinó midiendo la oxidación de NADP a NADPH a 340 nm, conforme el siguiente esquema de reacción:

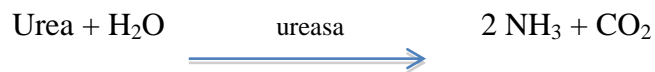


La isoenzima CK-MB se determinó por medio de la inhibición específica de las subunidades CK-M con anticuerpos anti CK-M; luego, las subunidades B se determinan mediante el empleo del sistema de reacción anteriormente mencionado (CK-MB_{NAC UV}, diagnostic kit Wiener lab.).

La actividad de LDH fue determinada espectrofotométricamente por la medición en la reducción de NADH a 340 nm directamente por la LDH. El esquema de reacción es el siguiente:



La concentración de Urea se determinó espectrofotométricamente por la medición en la reducción de NADH a 340 nm por la glutamato deshidrogenasa (GDH), conforme la siguiente reacción:



4.2 Evaluación de la actividad de Tiorredoxina-1 por el método de reducción de la Insulina

Principio. La actividad de Tiorredoxina después de su reducción por Tiorredoxin Reductasa ($\text{Trx}(\text{SH})_2$) es detectada por su habilidad de reducir los puentes disulfuro en la insulina.

1. $\text{Trx-S}_2 + \text{DTT}_{\text{red}} \longrightarrow \text{Trx}(\text{SH})_2 + \text{DTT}_{\text{ox}}$
2. $\text{Trx}(\text{SH})_2 + \text{Insulina-S}_2 \longrightarrow \text{Trx}(\text{SH})_2 + \text{Insulina}(\text{SH})_2$
3. $\text{Trx-S}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{TrxR}} \text{Trx}(\text{SH})_2 + \text{NADP}^+$
4. $\text{Insulina}(\text{SH})_2 + \text{DNTB} \longrightarrow \text{Insulina-S}_2 + 2\text{TNB (amarillo brillante)}$

Tiorredoxina (Trx) endógena en los homogenizados de tejido fue primero reducida por ditioneitol (DTT, “red” para la forma reducida y “ox” para la oxidada) (reacción 1). Después de la adición de NADPH, Insulina y Tiorredoxin Reductasa (TrxR), Trx reduce disulfuros de insulina (reacción 2). En la presencia de TrxR y a expensas de NADPH, Trx puede ser reducida y retorna nuevamente al sistema (reacción 3). Cuando la reacción es detenida, los grupos sulfhidrilos son derivatizados a TNB (reacción 4), el cual genera un intenso color amarillo.

Muestra: Se realizaron homogenatos de corazón en buffer fosfato 30 mM, KCl 120 mM

Reactivos: Buffer DTT de activación: 50 mM HEPES pH 7,6 + 1 mM EDTA (Se prepararon 10 ml); A los 10 ml se les adicionó 0,01g BSA (1 mg/ml) y 0,003086g ditioneitol (2 mM).

Buffer de Reacción: 200 µl de 1 M HEPES pH 7,6, 40 µl 0.2M EDTA, 40 µl NADPH 40 mg/ml y 500 µl de insulina 10 mg/ml.

Reactivo Stop: 6 M clorhidrato de guanidina + 0,4 mgr/ml DTNB ó 1 mM en 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0.

Procedimiento

- a. Se prepararon 100 µl de muestra de una concentración de 0,89 µg/µl (25 µg proteína contenida en 28 µl de buffer en el que fue homogenizado el tejido)
- b. A 28 µl de muestra se adicionaron 2 µl del buffer DTT de activación
- c. Se incubó a 37 °C por 15 minutos
- d. Se adicionaron 20 µl de buffer de reacción
- e. Se adicionó 5 µM ó 0,5 U de TrxReductasa (6,7 µl TrxR, SIGMA)
- f. Se incubó a 37 °C por 20 minutos
- g. Se adicionaron 250 µl de Reactivo Stop
- h. Se transfirieron 200 µl a la placa y se leyó la absorbancia a 405-412 nm

Cálculo: De la absorbancia de cada muestra se substrajo la absorbancia del respectivo control de la muestra a la cual no se le adicionó Trx reductasa.

$$\text{Actividad} = \frac{(\text{Abs mtra} - \text{Abs ctrol}) * V \text{ final}}{13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} * V \text{ mtra} * [\text{Proteína}]}$$

5. Determinación de la función mitocondrial

5.1 Consumo de oxígeno (O₂) en cortes de tejido miocárdico

Para este experimento, a los animales sham, 6 y 24 h de sepsis, se les indujo anestesia general nuevamente con ketamina/xilacina (100 mg kg⁻¹ / 5 mg kg⁻¹) y el corazón aún activo, fue extraído e inmediatamente inmerso en buffer Robinson a 4°C (118 mM Na Cl, 5

mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 2,5 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3). El tejido cardiaco fue cortado en cubos de 1 mm^3 mediante el uso de un escalpelo y $50 \pm 10 \text{ mg}$ fueron utilizados posteriormente para el experimento.

El consumo de O_2 tisular se determinó polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark. Los cortes se incubaron en una cámara de vidrio con 3 ml de buffer Robinson saturado con aire ($225 \mu\text{M O}_2$), en agitación magnética constante a 30°C y adicionando glucosa al buffer para una concentración final de 5,5 mM. Los resultados fueron expresados en nmoles de $\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg tejido}^{-1}$. Con la intención de registrar el consumo de O_2 de fuente no mitocondrial, 4 mM de KCN fue adicionado al medio para inhibir la citocromo oxidasa mitocondrial (Villani and Attardi 2007).

5.2 Estudio de la actividad de los complejos mitocondriales

La actividad de los complejos I, II-III y IV fue medida espectrofotométricamente (Hitachi U-3000, Tokyo, Japan). Preparaciones mitocondriales ($0,025 \text{ mg/mL}$) fueron incubadas en buffer KPi (Fosfato de potasio 100 mM a pH 7,2) a 30°C y luego se realizaron las respectivas mediciones.

5.2.1 Medición de la actividad del complejo I (NADH-ubiquinona reductasa)

Para la determinación de la actividad del complejo I se utilizaron mitocondrias recién purificadas, debido a que el proceso de congelamiento-descongelamiento produce la pérdida de la integridad de las membranas mitocondriales con la subsecuente liberación de la enzima malato-deshidrogenasa. Se midió la reducción sensible a la inhibición por rotenona de $50 \mu\text{M}$ 2,3-dimetoxi-6-metil-1,4-benzoquinona con 1 mM KCN como inhibidor de la citocromo oxidasa ($\epsilon_{550\text{nm}}=21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y malato-glutamato 6 mM como sustrato, a 340 nm durante 120 segundos.

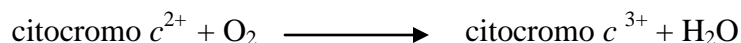
5.2.2 Medición de la actividad de Succinato-ubiquinona-citocromo c reductasa (Complejos II-III)

La reducción de citocromo c^{3+} a c^{2+} se midió a 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}}=21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en presencia de $50 \mu\text{M}$ cit c^{3+} , inhibiendo su oxidación con 1 mM KCN (como inhibidor de la citocromo

oxidasa), y 10 mM succinato como dador de electrones. Los resultados se expresaron en nmoles succinato.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

5.2.3. Medición de la actividad de Citocromo *c* oxidasa (Complejo IV)

La actividad de citocromo oxidasa fue monitoreada espectrofotométricamente por la oxidación de 50 μM de citocromo *c* reducido a 550 nm ($\epsilon_{550\text{nm}}=21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La reacción que se fundamenta en la medida de la velocidad de oxidación aeróbica de citocromo *c*²⁺ se llevó a cabo con 50 μg de proteína mitocondrial en buffer KPi 100 mM pH 7,2 a 30°C. La velocidad de la reacción fue determinada como la pseudoconstante de primer orden *k'* y expresada como *k'*.min⁻¹.mg de prot⁻¹.



Para la preparación de citocromo *c* reducido se disolvieron 24,8 mg de citocromo *c* en 2 ml de buffer KPi 10 mM, pH 7,2 y se añadieron 10 mg de ácido ascórbico (reductor). Luego se pasó por una columna de Sephadex G25 para eliminar el ácido ascórbico en exceso, eluyendo con KPi 10 mM. Se tituló espectrofotométricamente a 550 nm haciendo una dilución previa 1:20 en buffer KPi 10 mM, pH 7,2. $\epsilon_{550\text{nm}}=21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

5.3 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Principio: El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$) se determinó por citometría de flujo (FACScalibur) utilizando el fluorocromo catiónico DiOC₆ (3,3'-dihexiloxacarbocianina), el cual atraviesa la membrana mitocondrial y se acumula en la matriz debido al potencial eléctrico negativo que allí existe.

Procedimiento: Mitocondrias cardiacas frescas (50 μg proteína/ml) fueron suspendidas en 0,5 ml de buffer de reacción [120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 3 mM HEPES y 1 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos (pH 7,4)] y se les adicionó DiOC₆ (200 nM). Este ensayo fue realizado en la oscuridad a 37°C por 15 min. Posteriormente, el contenido de la cubeta fue centrifugado 5 min a 10,000 g para obtener el pellet mitocondrial, el cual se

resuspendió en 200 μ l y luego la fluorescencia fue registrada. Con el objetivo de cuantificar cambios en el potencial de membrana debidos a la utilización de succinato como sustrato energizante, la señal de DiOC₆ signal fue analizada en el estado 4 de respiración mitocondrial en presencia y ausencia de 6 mM de succinato. Como control positivo la despolarización total fue inducida por 2 μ M Carbonil Cianuro p-Trifluorometoxifenil Hidrazona (FCCP).

6 Determinación de estrés oxidativo

6.1 Producción mitocondrial de especies reactivas del O₂

6.1.1 Producción de H₂O₂ mitocondrial

La producción de H₂O₂ fue determinada espectrofluorométricamente en un Hitachi F-3010 a 365 nm (excitación) y 450 nm (emisión) a 30 °C (Boveris 1984) siguiendo el incremento en la intensidad de fluorescencia debida a la producción de ácido 2-2'-dihidroxi- bifenil-5,5'-diacetico, un producto de reacción de ácido p-hidroxifenilacético (HPA) acoplado a la reducción enzimática de H₂O₂ por la peroxidasa de rábano (HRP). 0,05 mg/ml de proteína mitocondrial fue incubada en medio de reacción conteniendo buffer fosfato 50 mM, L-valine 50 mM, a pH 7,4, suplementado con 12,5 U/ ml de HRP, 250 μ M HPA, 0,3 μ M Cu,Zn-SOD and 6 mM de malato-glutamato como sustrato. Los resultados fueron expresados como nmol H₂O₂/min. mg proteína.

6.2 Evaluación de la actividad enzimática antioxidante

6.2.1 Actividad de Superóxido dismutase Mangánica (MnSOD)

La actividad de MnSOD fue examinada mediante detección enzimática, descrita por Spitz y Oberley (Spitz and Oberley 1989). El ensayo se realizó con 0,1 mg de proteína mitocondrial a 25°C y pH 7,8 en 3,0 ml de buffer de reacción [50 mM fosfato de potasio, 0,1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0,02 mM citocromo c, 1 mM cianuro de potasio (KCN), 0,05 mM xantina y 3,5 mU/ml xantina oxidasa] usando un sistema xantina y xantina oxidasa acoplado, como generador de radical superóxido para reducir el citocromo c.

Una unidad de SOD inhibe la reducción de citocromo *c* en un 50% compitiendo por el radical superóxido. La tasa de reducción fue evaluada espectrofotométricamente a 550 nm y los resultados expresados como pmoles SOD/mg prot.

6.2.2 Actividad de Catalasa (CAT)

Se evaluó en fracción citosólica conforme Cohen (Cohen, Dembiec et al. 1970), con algunas modificaciones. La curva de calibración fue realizada en concentraciones crecientes de H₂O₂ al 30% (w/w) (E240= 39,4 M⁻¹cm⁻¹).

Una unidad de CAT descompone 1,0 μmol de H₂O₂ por minuto. La tasa de desaparición de H₂O₂ fue seguida detectando la tasa de disminución en la absorbancia a 240 nm durante 100 seg a 25°C en 50 mM de buffer fosfato potasio a pH 6,8, con el agregado de 0,025, 0,05 y 0,1 mg de proteína. Para cada concentración de proteína fue calculada una constante (k') de reacción de pseudo-primer orden expresada como k'/mg proteína y luego se utilizó la siguiente fórmula para así obtener pmol H₂O₂/mg proteína.

$$\text{Concentración de catalasa} = \frac{k' * V \text{ final}}{V_{\text{mtra}} * 1000 * [\text{proteína}]}$$

$$k = 4,6 * 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

6.3 Evaluación de la oxidación de proteínas: determinación de grupos carbonilos

La oxidación proteica fue determinada por *Oxyblot kit* (Millipore). Homogenatos de tejido cardíaco fueron llevados a una concentración de 3 mg/mL e inmediatamente preservados a -80 °C hasta su determinación. 15 μg de proteína fueron sembradas en un gel para la realización de Western blot utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), la cual forma un producto estable dinitrofenilhidrazina (DNP) con proteínas con grupos carbonilos. Luego se realiza la incubación con un primer anticuerpo dirigido contra DNP. El anticuerpo secundario es un HRP-conjugado que permite la visualización por quimioluminiscencia de las bandas de las proteínas oxidadas a través de la exposición en una placa fotográfica.

7. Determinación de estrés nitrosativo

7.1 Medición de la producción de óxido nítrico (NO) por conversión de la [³H]L-arginina a [3H]L-citrulina

La actividad de NOS se midió en homogenatos de tejido cardiaco y se determinó midiendo la conversión de [³H]L-arginina a [3H]L-citrulina, como fue previamente descrito por Knowles y col., con modificaciones menores. Cada preparación (100 µg de proteína) fue incubada con 100 µM L-Arg, 5 µl/ml [3H]L-arginina (Ae 53,4 Ci/mmol, 5 µCi.ml⁻¹), 100 µM NADPH, 0,1 µM calmodulina, 0,5 mM CaCl₂, 1 µM FAD, 1 µM FMN y 1 µM tetrahidrobiopterina en un volumen final de 100 µl. Luego de 30 minutos de incubación a 37°C la reacción fue detenida por el agregado de 300 µl de buffer HEPES (HEPES 15 mM, H-EDTA 1,5 mM, pH 5,5). La [3H]L-arginina no consumida fue separada de la mezcla de reacción por agregado de una suspensión 1:2 de resina de intercambio catiónico Dowex AG 50WX-8. Esta mezcla fue agitada vigorosamente, para favorecer el pegado de la [3H]L-arginina a la resina y luego centrifugada 30 segundos a máxima velocidad. Se tomaron 400 µl del sobrenadante que fueron mezclados con 1 ml de líquido de centelleo. Las muestras se midieron durante 1 minuto en un contador de centelleo líquido para partículas beta (Wallac, 1414 Liquid centillation counter). Las cuentas por minuto (cpm) se convirtieron a nmoles [³H]L-citrulina.min⁻¹.mg proteína⁻¹ utilizando totales (muestras sin resina) y blancos (sin proteína). La actividad específica de NOS se determinó luego de restarse las cpm obtenidas en presencia del inhibidor competitivo L-NMMA en una concentración 50 veces mayor (5 mM) que el sustrato (L-Arg).

7.2 Evaluación de la expresión de óxido nítrico sintasas

La expresión fue evaluada en homogenatos de tejido cardiaco por medio de la realización de western blot y RT/PCR real time.

7.3 Determinación de nitración en tirosina de homogenato de tejido cardiaco

La detección de proteínas nitradas en tirosina se realizó mediante la técnica de *Western Blot* y la utilización de un anticuerpo específico anti-3-nitrotirosina.

8. Determinación de la expresión de proteínas por Western Blot

Las proteínas cardíacas (mitocondrias, citosoles y homogenatos) se prepararon en condiciones desnaturizantes y se corrieron en geles de poliacrilamida según el método descrito por Laemmli y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se lavaron en 20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0,1%, Tween- 20, pH 7,4 (TTBS), se bloquearon en TTBS con 5% de leche en polvo descremada, y luego se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios, ajustando las diluciones de los mismos para cada sistema . Luego se lavaron e incubaron con segundos anticuerpos anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra conjugados con peroxidasa de rábano. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia usando ECL o ECL Advance kits de Amersham.

Anticuerpo	Marca	Peso Molecular (kDa)	Dilución anticuerpo primario	Dilución anticuerpo secundario	Tipo anticuerpo secundario
Tiorredoxina 1	Cell Signaling (C63C6) rabbit mAb	15	1:1000	1:5000	Anti-conejo
Tiorredoxina 2	Santa Cruz Biotechnology Trx-2 [H-75] sc-50336	18	1:3000	1:10000	Anti-conejo
MnSOD	Stress Gen	25	1:15000	1:30000	Anti-conejo
nNOS	Santa Cruz Biotechnology NOS1 [H-299] sc-8309	155	1:500	1:3000	Anti-conejo
iNOS	Santa Cruz Biotechnology NOS2 (M19) sc-650	130	1:500	1:3000	Anti-conejo
eNOS	Santa Cruz Biotechnology NOS3 (C-20) sc-654	140	1:500	1:3000	Anti-conejo
β -actina	Santa Cruz Biotechnology	42	1:3000	1:15000	Anti-cabra

VDAC1	Santa Cruz Biotechnology	35	1:4000	1:15000	Anti-cabra
DNML1	Cell Signaling	60-80	1:1000	1:5000	Anti-ratón
pDRP1 (Ser616)	Cell Signaling	78 - 82	1:1000	1:5000	Anti-conejo
OPA1	Cell Signaling	86 - 92	1:1000	1:10000	Anti-ratón
Anti-nitrotirosina	EMD Millipore	---	1:1000	1:10000	Anti-ratón
LC3B	Cell Signaling #2775	14 - 16	1:1000	1:5000	Anti-conejo

9. Procedimientos moleculares

9.1 Extracción de ARN Total

Para estimar semicuantitativamente los niveles de ARNm, ARN total de tejido cardíaco fue extraído con TRIzol (Invitrogen Corp.) –25 mg de tejido en 1 ml trizol y homogenizado. Luego se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos. El sobrenadante se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se le agregaron 0,2 ml de cloroformo. Se mezcló vigorosamente y luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifugó a 11.500 x g por 15 minutos (2-8°C). Se tomó con cuidado la fase acuosa, a la cual se le agregaron 0,5 ml de isopropanol. Se mezcló con vortex y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se volvió a centrifugar a 11.500 x g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó un 1 ml de etanol 75% para lavar el pellet. Se vortexeó y se centrifugó a 7.500 x g durante 5 minutos. Se secó bien el pellet y luego se lo disolvió en H₂O DEPC.

Se midió la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) y a 280 nm (proteínas con aminoácidos aromáticos) para las muestras (10 µl muestra + 490 µl de H₂O destilada o 2 µl muestra + 180 µl de H₂O destilada si se tiene poco volumen final de ARN) y se calculó la relación:

- A260/A280 (índice de contaminación de ARN con proteínas. Se espera un índice en el rango de 1-2).

- A260 x 40 (factor de absortividad) x 50 (factor de dilución) = µg ARN/m

Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento.

9.2 Transcripción reversa (RT)

Para realizar la RT se usaron 2 μg de ARN con previo tratamiento con DNAsa y se le realizó una transcripción reversa en duplicado. Se preparó la mezcla de reacción para RT usando el kit de Promega (por muestra un volumen final de reacción de 25 μl): 5 μl Buffer 5X, 1 μl dNTPs mix (1 mM), 0.25 μl OligodT (25 nM), 15 μl siARN, 1 μl de retrotranscriptasa (200U) y 2,75 μl de H_2O DEPC.

Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

9.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

La reacción se preparó en frío en 25 μl de mezcla de reacción (5 μl Buffer 5X, 0,2 mM dNTPs mix, 2,5 mM MgCl_2 , 25 U/ml Taq polimerasa, 25 mM Sybgreen, 1 μM Primer sentido, 1 μM Primer antisentido y H_2O DEPC para llevar a volumen final), cada muestra por duplicado. Se usaron secuencias de primers específicas de ratón (Trx2, UCP2, UCP3) o comunes a ratón, rata y humano (SOD2, PGC1, NOS).

La integridad del DNA amplificado fue confirmada usando la determinación de la temperatura de fusión. Los datos fueron normalizados en relación a la expresión de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y expresados como razón de cambio para cada tiempo de sepsis en ambos grupos respecto al sham WT

Primers	sentido	antisentido
Trx2	5'-GTGGACTTTCATGCACAGTGG-3'	5'-GTTCTTGATGGCTAGCACGG-3'
SOD2	5'-CAGATCATGCAGCTGCACCAC-3'	5'-TTCAGTGCAGGCTGAAGAGC-3'
UCP2	5'-CAGCCTGAGACCTCAAAGCA-3'	5'-GACCTTGGCGGTATCCAGAG-3'
UCP3	5'- ATGCCTACAGAACCATCGCC-3'	5'- CTTTGTAGAAGGCCGTGGGT-3'
NOS1	5'- ATGTCCTCAAAGCCATCCAGCG-3'	5'-GGACTCAGATCTAAGGCGGTTGG-3'
NOS2	5'-GCGCTACAACATCCTGGAGGAAG-3'	5'-GGTCCATGATGGTCACATTCTGC-3'
NOS3	5'- CCCAGAGCTACGCACAGC-3'	5'- GCAAAGCTCTCTCCATTCTCCG-3'
PGC1-alfa	5'-CACAAACCGCAGTCGCAAC-3'	5'-TGGCTTTATGAGGAGGAGTCG-3'
NRF1	5'-GCCACATTGGCTGATGCTTCAG-3'	5'-GCTTGCGTCGTCTGGATGGTC-3'
TFAM/M	5'-CCCGGCAGAGACGGTTAAAA-3'	5'-TCCCTGAGCCGAATCATCCT-3'
MFN2	5'-AGGAGTGGTGTGGAAGGCAG-3'	5'-ACAAACTGGCGCTTGAAGG-3'
OPA1	5'-CTGGAAGAATCGGACCCAAG-3'	5'-AGGTTCTTCCGGACTGTGGT-3'
DNM1L	5'-TGGAACAAAGTATCTTGCTAGG-3'	5'-GAAGAGACTGATACTGAGCAGC-3'
GADPH	5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'

10. Procedimientos histológicos

10.1 Estudio de la ultraestructura tisular y mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión

Cortes frescos de tejido ventricular miocárdico fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% (25% de grado biológico) en buffer de fosfato 0,1M pH 7,5 durante 4 horas. Posteriormente, se realizó un lavado en sacarosa fosfato al 10% y posterior fijación en tetróxido de osmio al 1,25% en buffer fosfato durante 2 horas. Se deshidrató en alcoholes crecientes y se realizó la inclusión en resina spurr. Las secciones finas se levantaron en grillas de 300 mesh y se contrastaron con acetato de Uranilo al 1% y solución de Reynolds. Las imágenes fueron obtenidas en Microscopio de Transmisión de 80KV marca Zeiss 109T equipado con cámara digital ES 1000W y analizadas en el software Image J.

10.2 Estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL

La técnica de TUNEL (TdT-mediated by dTUP nick end labeling) es un método para la detección de fragmentos de DNA identificados por la deoxinucleotidil transferasa o TdT, quien cataliza la adición de dUTPSs que son detectados por posterior marcación.

Se utilizó para su realización el kit comercial Apoptag Plus Fluorescein In situ, Apoptosis Detection kit S7111 (Chemicon).

Se prepararon secciones de tejido de 5 mm de grosor y se realizó el siguiente protocolo:

- Desparafinización
 - o Tres cambios de xileno de 5 minutos cada uno
 - o 2 cambios de etanol absoluto de 5 minutos cada uno
 - o 1 lavado con etanol de 95% de 3 minutos
 - o 1 lavado con etanol de 70% de 3 minutos
 - o 1 lavado en PBS de 5 minutos
- Pretratamiento del espécimen. Se agregaron 60 µl de Proteinasa K (20 µg/ml) de forma directa por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Aplicación del Buffer de equilibrio. Se incubó por 10 segundos a T° ambiente
- Aplicación de la enzima TdT. Se incubó en cámara humidificada a 37°C por 1 hora.
- Aplicación Buffer Stop
- Aplicación del anticuerpo conjugado con Diogoxigenina. Se incubó en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavados con PBS. Se adicionó montaje con DAPI

10.3 Estudio histopatológico mediante el método de tinción hematoxilina-eosina

Posterior a la realización de la técnica de Langendorff, tejido cardiaco ventricular correspondiente a animales sham, 6 y 24 hs de sepsis de ambos grupos y fueron inmediatamente cortados y puestos en solución fijadora de formalina neutral-tamponada al 10% y embebido en parafina líquida. Se prepararon secciones de tejido de 5 mm de grosor y se realizó tinción de hematoxilina-eosina (HE), conforme el siguiente procedimiento:

- Se realizó el proceso de desparafinado, para lo cual se sumergieron los preparados histológicos en xilol 2 veces por 10 minutos cada vez.
- Se realizaron pasajes por una serie de alcoholes en concentración decreciente para rehidratar la muestra (2 veces 100%, y una vez en 96%) seguido de un lavado en agua para eliminar exceso de alcohol.
- Se sumergieron los preparados en hematoxilina de Harris por 2 minutos y se procedió a lavar en agua común para realizar el proceso de virado y eliminar los excesos de la tinción; posteriormente, se pasó rápidamente por alcohol 96% 2 minutos.
- Se lavaron nuevamente los preparados y se sumergieron 5 minutos en eosina.
- Se pasaron por otra serie de alcoholes, esta vez en orden creciente (una vez 96% y 2 veces al 100%) para deshidratar la muestra y finalmente xilol.
- Se realizó el montaje final en una resina sintética (DPX).

Las preparaciones histológicas se evaluaron por un patólogo experimentado, teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Miocardio: Fibras miocárdicas (cambios en núcleo – apoptosis)
- Intersticio: Infiltración leucocitaria
- Vasos: Cambios en el endotelio y perivasculares

11. Estadística

Los datos de variables continuas fueron expresados como medias \pm error estándar de la media (ESM). Las diferencias de medias entre los grupos y tiempos de progresión de sepsis fueron analizados con test estadísticos de observaciones independientes: análisis de varianza (ANOVA). Se realizó test de Dunnett para múltiples comparaciones post hoc entre las medias de cada tiempo de sepsis y el valor sham y test de Bonferroni para comparar tiempos específicos entre grupos. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN GENERAL Y ANÁLISIS DE SOBREVIVENCIA

1.1. Caracterización de parámetros físicos

A cada uno de los ratones intervenidos se les registró edad y peso corporal, con el fin de verificar y mantener comparabilidad entre los grupos. Sepsis por ligadura-punción cecal (LPC) no afectó estos parámetros en WT así como tampoco en Tg-trx1.

Tabla 1. Evaluación de parámetros físicos.

	WT	Tg-trx1	n
Edad (semanas)	15 ± 2	16 ± 3	33
Peso corporal PB (g)	28 ± 4	26 ± 4	33
Peso tejido (mg)			
Corazón (PC)			
sham	145 ± 20	151 ± 30	10
6 h	161 ± 23	152 ± 42	10
24 h	146 ± 19	147 ± 19	10
Diafragma (PD)			
sham	134 ± 12	116 ± 40	5
6 h	143 ± 27	141 ± 38	5
24 h	128 ± 28	120 ± 20	5
Razón PC/PB (mg/g)			
sham	4,6 ± 0,7	5,0 ± 0,7	10
6 h	5,1 ± 1,0	5,4 ± 1,7	10
24 h	4,9 ± 0,8	5,3 ± 0,7	10

Valores expresados como medias ± DE.

Se obtuvieron datos del peso de diafragma, como órgano de similares características estructurales y funcionales al corazón, con el objetivo de validar y tener un patrón de

referencia en la medición. Se observó que a las 6 hs hubo un ligero incremento no significativo en el peso de los órganos característico de la respuesta inflamatoria celular en la sepsis y que fue reversible a las 24 hs de sepsis.

1.2. Evaluación de parámetros bioquímicos sistémicos de injuria tisular

Con el propósito de verificar el modelo de LPC, se observaron signos físicos y se analizaron parámetros sistémicos indicadores de compromiso orgánico relacionado al proceso séptico.

Los ratones sometidos al modelo de LPC evidenciaron visibles signos de sepsis: piloerección, disminución en la percepción cognitiva frente a estímulos externos, letargia y drenaje ocular.

Se realizó recuento leucocitario como marcador de la presencia de infección, ya que el estrés oxidativo durante la progresión de la sepsis puede causar un aumento o una disminución en el porcentaje de neutrófilos debido a la infección bacteriana generalizada. Estos resultados muestran una importante reducción en el recuento leucocitario en más del 50% en cada tiempo de progresión de la sepsis, para ambos grupos.

Se observó deterioro funcional hepático, renal y muscular reflejado en la alteración de parámetros bioquímicos, cuyos resultados son mostrados a continuación. Ambos grupos mostraron una sustancial elevación en los niveles plasmáticos de todos los parámetros.

Como indicadores de daño funcional hepático se analizaron las enzimas aspartato-transaminasa (AST) y alanino-transaminasa. Se observó un incremento significativo en ambas enzimas en el ratón séptico WT desde las 6 hs posteriores a LPC; mientras que, en ratones Tg-trx1 fue significativo el aumento sólo a las 24 hs. A las 24 hs los niveles de ambas enzimas fueron mayores en WT en comparación con Tg-trx1 ($p=0,002$).

El daño muscular fue evaluado por la medición de las enzimas: creatinfosfoquinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH). Tanto para CK total (marcador muscular) como para CKMB (marcador cardíaco) se encontraron niveles en ascenso conforme avanzaba el tiempo de sepsis, indicando creciente daño muscular esquelético y cardíaco. En el caso

particular de CKMB, se observó que en ratones WT los niveles de actividad a las 6 hs post LPC fue 6 veces superior a la del sham; y en Tg-trx1 fue de 2,3 veces mayor respecto de su sham. A las 24 hs, fue 29 veces mayor en WT y 15 veces mayor en Tg-trx1. La razón CKMB / CK total fue significativamente mayor en WT a las 24 hs post LPC.

La actividad enzimática de LDH tuvo un aumento abrupto desde las 6 hs post LPC pero fue estadísticamente significativo a las 24 hs en ambos grupos, donde el valor fue un 45% mayor en WT respecto a Tg-trx1.

La urea como marcador de función renal, mostró un aumento transitorio y significativo a las 24 hs.

Tabla 2. Evaluación de parámetros sistémicos indicadores de daño tisular.

	Wildtype			Tg-trx1		
	SHAM	LPC 6 h	LPC 24 h	SHAM	LPC 6 h	LPC 24 h
Recuento leucocitario	4817 ± 1521	2016 ± 595 *	2683 ± 822	4493 ± 1675	2594 ± 151	1850 ± 636 *
AST	63 ± 7	292 ± 21 *	1142 ± 259 *	62 ± 10	220 ± 20	633 ± 55 *#
ALT	34 ± 3	122 ± 7 *	292 ± 12 *	36 ± 3	73 ± 9	370 ± 56 *#
CK	480 ± 160	3018 ± 626	4537 ± 1315 *	428 ± 96	2003 ± 566	5551 ± 1627 *
CK-MB	90 ± 16	540 ± 88	2607 ± 338 *	155 ± 35	356 ± 125	2451 ± 545*
CK-MB/CK	13 ± 1	27 ± 3	78 ± 8 *	30 ± 2	30 ± 7	50 ± 7 #
LDH	714 ± 68	1512 ± 210	6671 ± 1194 *	673 ± 48	1354 ± 268	4589 ± 467 *#
Urea	71 ± 3	83 ± 5	159 ± 11 *	76 ± 4	82 ± 3	152 ± 12 *

Los valores corresponden a la media ± ESM del recuento leucocitario expresado en leucocitos/mm³, de la actividad enzimática en UI/L y la urea en mg/dL. n=7-10. * p<0,05 comparado con WT sham. # p<0,05 comparación entre grupos en el mismo punto en el tiempo de sepsis.

1.3. Evaluación de la sobrevida en el modelo de LPC

La probabilidad de supervivencia fue evaluada por el método de Kaplan-Meier. La curva de sobrevida representada por la Figura 20 permite observar que en los grupos sham (laparotomía) en WT y Tg-trx1, no se presentó mortalidad. En la curva de sobrevida, el tiempo medio de vida para un ratón séptico fue de 28 horas para WT y de 36 horas para Tg-trx1. Las diferencias entre las curvas fueron estadísticamente significativas.

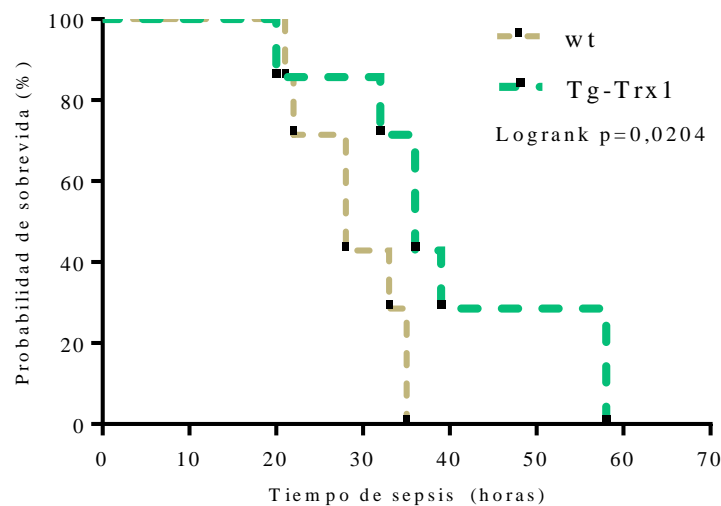


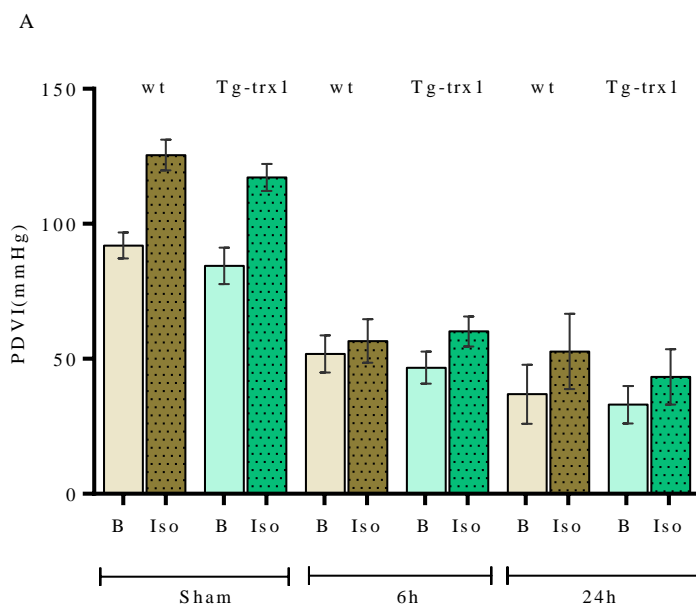
Figura 20. Curva de sobrevida en ratones sépticos. n= 7 por grupo

2. EFECTO DE TRX-1 SOBRE LA CONTRACTILIDAD CARDIACA EN LA DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA POR SEPSIS

La sepsis e inflamación causan depresión miocárdica. Con el propósito de determinar si la protección antioxidante de Trx1 impacta sobre la función cardiaca se evaluó la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PVDI), indicativa de la fuerza contráctil. Para ello, se utilizó la técnica de perfusión de órgano aislado desarrollada por Langendorff y se

realizaron mediciones en condiciones basales y posterior a estímulo β -adrenérgico inducido por isoproterenol en sham, 6 y 24 h post LPC.

El inotropismo se evaluó por medio de la PVDI, observándose una disminución en la función contráctil similar entre los grupos (Fig 21A). Cuando se analizó la reserva contráctil, se evidenció un incremento normal en la contractilidad cardiaca en respuesta al estímulo β -agonista expresado como Δ PVDI, en WT y Tg-trx1 sham (29,4 y 32,4%, respectivamente). Interesantemente, en ratones sépticos a las 6 h post LPC, la reserva contráctil fue 15 puntos porcentuales mayor en Tg-trx1 comparado con WT (22,8 vs 7,8%, medias de las diferencias relativas expresadas en porcentaje, respectivamente); y con un descenso significativo en WT, comparado al sham ($p = 0,0441$) (Fig 21B).



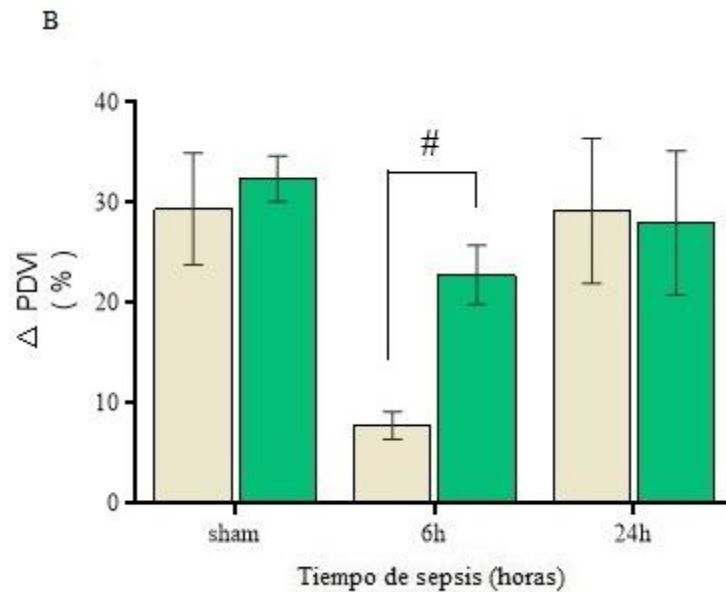


Figura 21. Evaluación de la función contráctil cardiaca de acuerdo a la técnica Langendorff. Las mediciones fueron realizadas a sham, 6 y 24 h post LPC, en condiciones basales (barras lisas) y posterior a la adición de isoproterenol - Iso 1 μ M - (barras con tramas). Los valores son medias \pm ESM de 5 experimentos independientes. (A) presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) de corazones aislados perfundidos de ratones WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). (B) Incremento en la PDVI (Δ PDVI) expresado como la diferencia porcentual entre la PVDI en condiciones basales y luego del estímulo β -adrenérgico. * $p < 0,05$ comparado con WT sham; # $p < 0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis.

Trx1 incrementa la esperanza de vida media en ratones sépticos y a las 6 hs post LPC atenúa la caída en la respuesta β -adrenérgica que acompaña el decaimiento en la funcionalidad contráctil en estadios tempranos de la sepsis.

3. EFECTO DE TRX1 SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA POR SEPSIS

Durante la progresión de la sepsis es característico el marcado incremento del estrés oxidativo. Las ERO no neutralizadas por defensas antioxidantes reaccionan con ADN, proteínas y lípidos conduciendo a daño orgánico sistémico. Con el objetivo de evaluar

posibles beneficios de la sobreexpresión de Trx1 sobre la regulación en la expresión y actividad de otras enzimas antioxidantes y el daño oxidativo, se determinó en primera instancia el patrón de expresión y actividad del sistema Trx.

3.1. Ensayo de la expresión y actividad antioxidante del sistema Trx

La sobreexpresión de Trx1 en Tg-trx1 fue validada por análisis de *Western blot* usando anticuerpo anti-tiorredoxina 1 (C63C6), el cual no detectó los niveles endógenos de la proteína de los ratones, aunque sí la Trx1 humana sobreexpresada en los ratones Tg-trx1

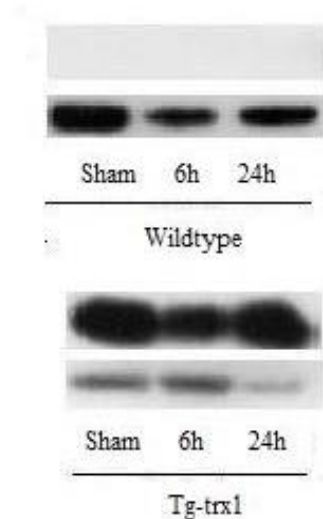


Figura 22. Caracterización de la sobreexpresión de Trx1 específica en miocardio por Western Blot en homogeneizados de tejido miocárdico. Trx1 endógena de ratón no es detectada por el anticuerpo

La actividad de Trx en el corazón fue determinada por el método de reducción de la insulina. Se observó que en el grupo Tg-trx1 hubo un incremento significativo en la actividad total de Trx (Trx1 + Trx2) durante la progresión de la sepsis. En el grupo WT hubo una reducción de ~ 50% en las primeras 6 h con un posterior ascenso a las 24 h de ~ 70%. La actividad de Trx durante la sepsis fue significativamente mayor en ratones Tg-trx1 respecto de WT desde las 6 h post LPC.

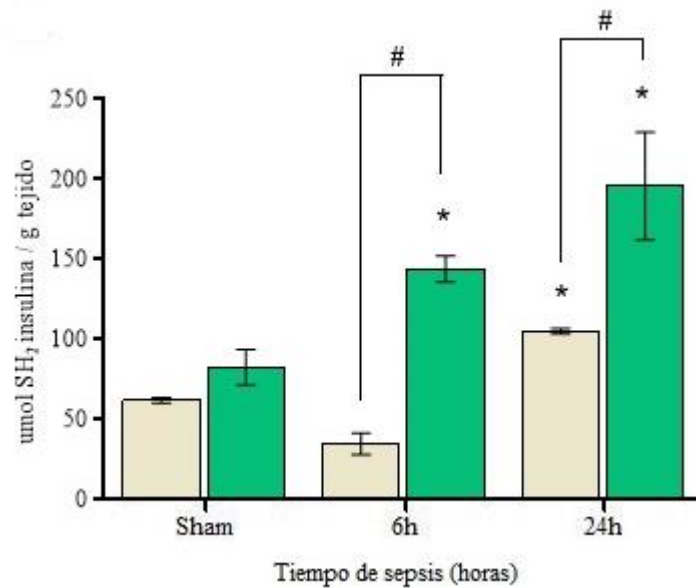


Figura 23. Medición de la actividad de Trx, determinada por ensayo de reducción de insulina. Homogeneizados de tejido miocárdico de ratones WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). Los valores están expresados como medias \pm ESM; $n=3$ por cada tiempo de sepsis post LPC. * $p<0,05$ comparado con WT sham. # $p<0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis.

Con respecto a Trx2, se evaluó su expresión por western blot y qRT/PCR. En condiciones basales, se observó mayor expresión proteica en el grupo de ratones Tg-Trx1, sin mostrar modificaciones con la progresión del cuadro séptico. Por el contrario, en ratones WT se observó un aumento progresivo en su expresión proteica desde las 6 hs post LPC, con un pico a las 18 h el cual retornó a niveles basales a las 24 h.

Los resultados de niveles de ARNm mostraron que si bien no hubo cambios significativos en ningún grupo durante la progresión de la sepsis, en el grupo WT se observó una tendencia ascendente progresiva totalmente similar a lo observado en la expresión proteica, haciendo que sus niveles de transcripción fueran significativamente mayores a los de Tg-trx1 a las 18 hs post LPC. Tanto la expresión proteica como los niveles de ARNm fueron significativamente mayores en WT a las 18 h post LPC.

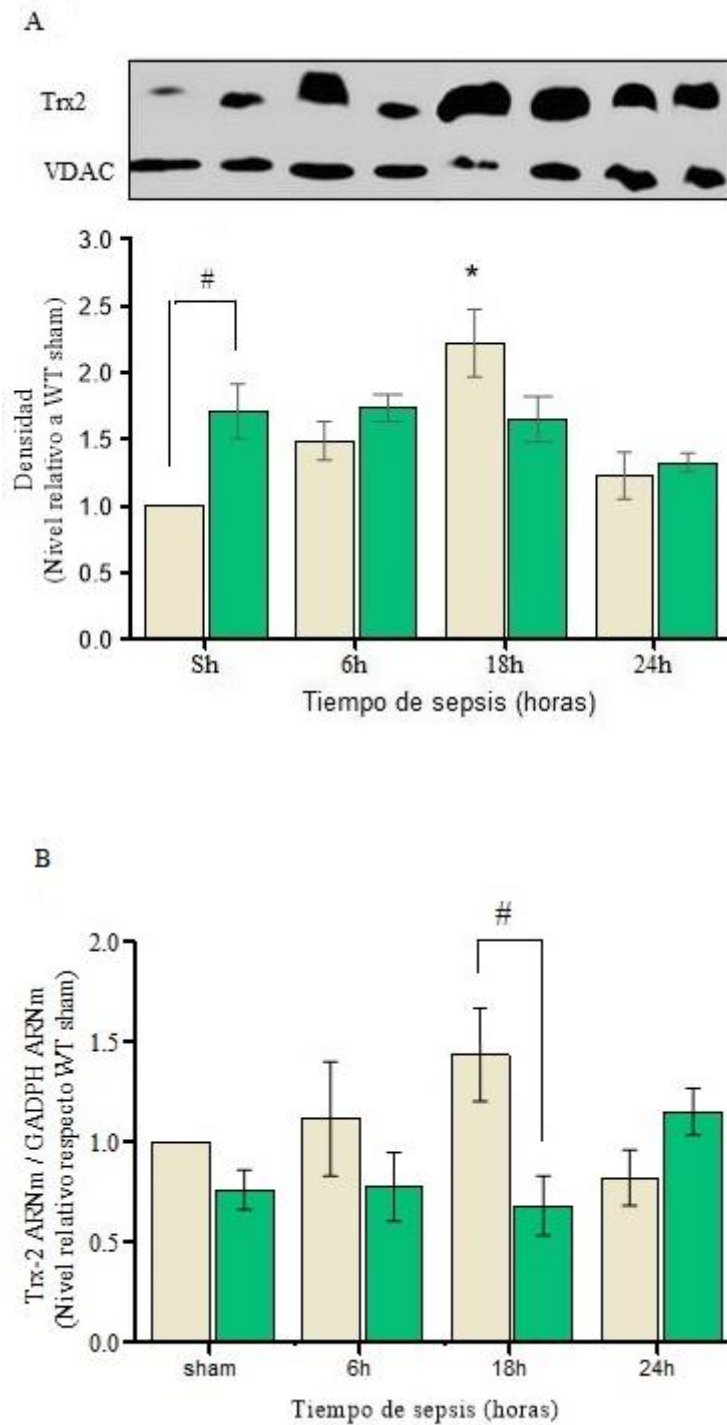


Figura 24. Caracterización de la expresión de Trx2 por (A) Western Blot en fracción mitocondrial y (B) Análisis de ARNm/RT-PCR. WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). $p < 0,05$ comparado con sham del mismo grupo, ANOVA-test de Dunnett; # $p < 0,05$ comparación entre grupos al mismo tiempo de sepsis, ANOVA-test de Bonferroni. Los datos representan 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

3.2. Actividad de otros sistemas antioxidantes

El estrés oxidativo acciona los mecanismos de defensa antioxidante con el objeto de controlar la producción de radicales y proteger del daño oxidativo. Una de las actividades de Trx1 es la de regenerar otros sistemas de defensa antioxidante celular.

Con el fin de evaluar la actividad de enzimas antioxidantes importantes en tejido cardiaco, presentes tanto en citosol como en mitocondria y la posible acción de Trx1 sobre ellos, las actividades enzimáticas de catalasa y superóxido dismutasa mangánica (MnSOD) fueron determinadas.

La MnSOD está encargada de detoxificar el superóxido generado por el metabolismo mitocondrial; y la catalasa protege del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno. Durante la sepsis, ambas participan en la protección de los tejidos afectados.

Se encontró que la sobreexpresión de Trx1 no modificó el descenso de la actividad de catalasa en músculo cardiaco durante la sepsis, siendo significativa la reducción de actividad en ambos grupos.

Por el contrario, MnSOD exhibió un progresivo incremento en su actividad, que a las 24 h se mantuvo en Tg-trx1 pero que declinó en WT.

Tabla 3. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

Grupos		MnSOD pmol SOD / mg proteína	Catalasa pmol H ₂ O ₂ / mg proteína
Wildtype	Sham	366 ± 23	0,45 ± 0,04
	6 h	437 ± 64	0,38 ± 0,05
	18 h	504 ± 33 *	0,24 ± 0,06
	24 h	270 ± 21 *	0,29 ± 0,03 #
Tg-trx1	Sham	319 ± 65	0,45 ± 0,02
	6 h	362 ± 53	0,34 ± 0,03
	18 h	473 ± 24	0,33 ± 0,03
	24 h	494 ± 83	0,24 ± 0,02 #

Los valores están expresados como medias ± ESM. * $p < 0,05$ vs sham del mismo grupo, ANOVA- test de Dunnett; # $p < 0,05$ comparación entre grupos al mismo tiempo de sepsis, ANOVA- test de Bonferroni

Cuando se evaluó la expresión de MnSOD en tejido miocárdico, no se observaron modificaciones en los niveles de la enzima durante el transcurso del proceso séptico, lo que sugiere modificaciones postraduccionales relacionadas con la reducción de la actividad de la enzima en los ratones sometidos a LCP luego de 24 hs de la cirugía.

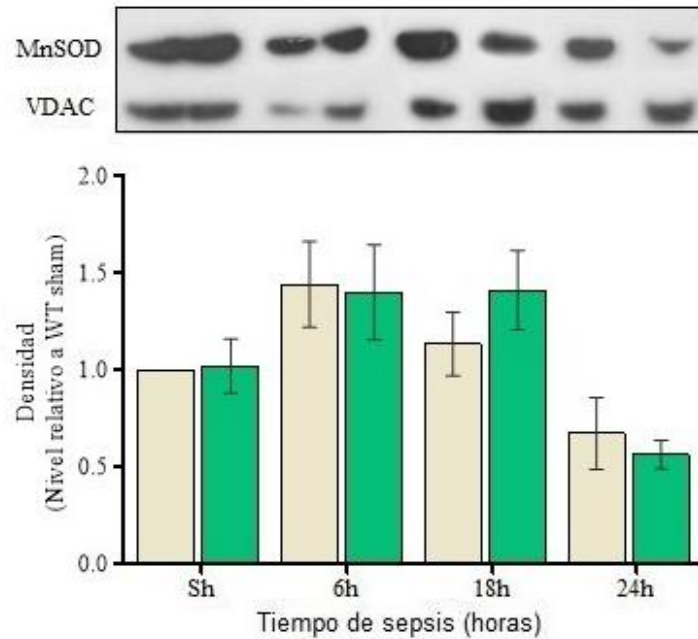


Figura 25. Caracterización de la expresión de la enzima antioxidante MnSOD por Western Blot en fracción mitocondrial. WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). * $p < 0,05$ comparado con sham del mismo grupo, ANOVA- test de Dunnett; # $p < 0,05$ comparación entre grupos al mismo tiempo de sepsis, ANOVA- test de Bonferroni.

Por otro lado, tampoco se observaron modificaciones en los niveles de transcripción génica de MnSOD en el transcurso del proceso séptico ni diferencias con el grupo que sobreexpresa Trx1 en corazón.

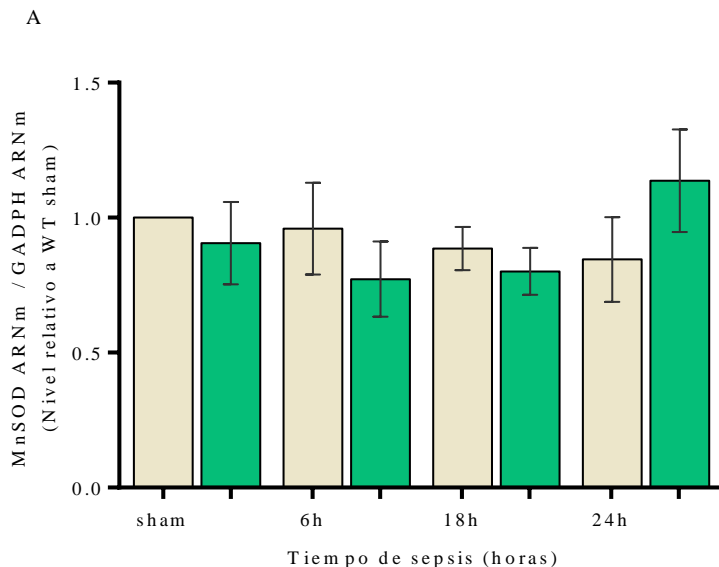
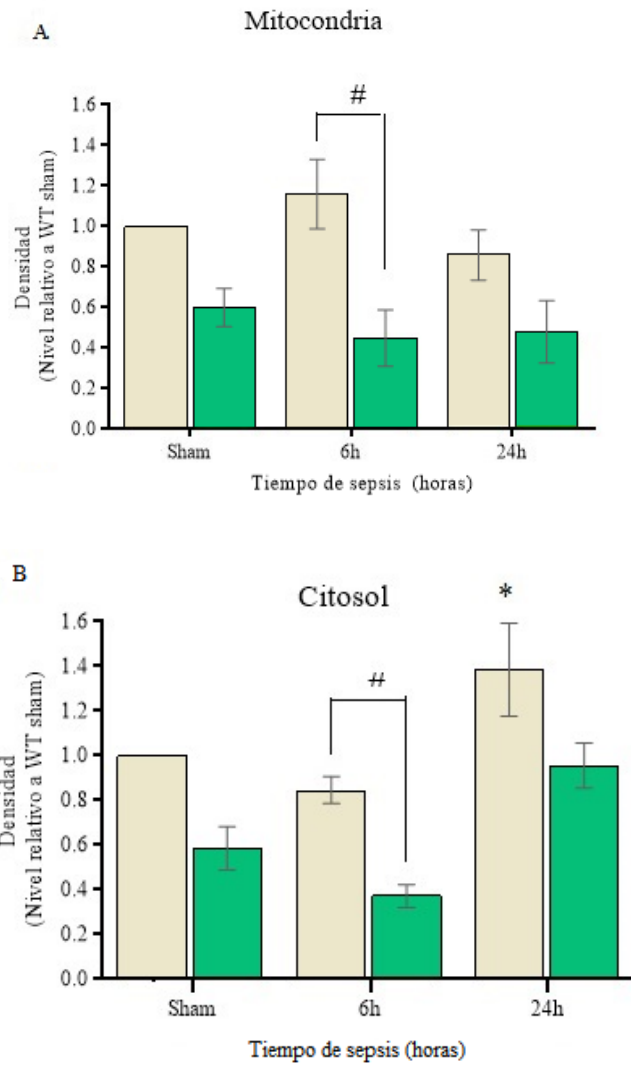


Figura 26. Análisis de ARNm/RT-PCR de MnSOD WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). Datos representan 3 experimentos independientes realizados por triplicado. ; # $p < 0,05$ comparación entre grupos al mismo tiempo de sepsis, ANOVA-Bonferroni test.

3.3 Oxidación de proteínas en mitocondria y citosol de tejido cardiaco

Con el fin de evaluar el daño oxidativo durante el transcurso de la sepsis y el efecto de Trx1 sobre éste, se realizó la determinación de carbonilos proteicos discriminando entre proteínas mitocondriales y citosólicas. Se encontró que tanto en ratones WT como Tg-trx1, a las 6 hs post LPC (sepsis temprana) se mantuvo el nivel de oxidación observado en estado basal en los ratones sham. Sin embargo, se evidenció mayor oxidación proteica tanto en mitocondria como en citosol en el grupo WT en estado basal y a las 6 hs post LPC respecto de Tg-trx1. A las 24 hs post LPC (sepsis tardía), si bien se observó un ligero incremento en la oxidación de proteínas citosólicas, éste no fue significativo y tampoco diferente entre WT y Tg-trx1.



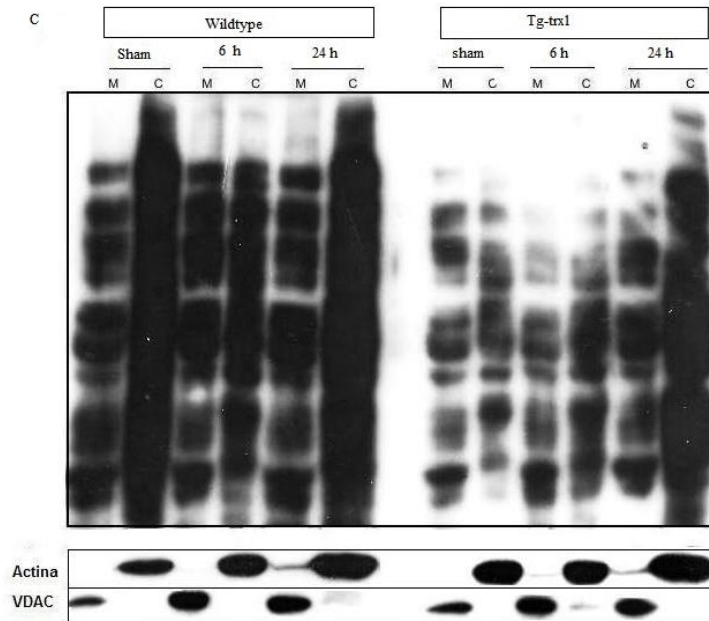


Figura 27. Carbonilación proteica en LPC-inducida por sepsis. (A) Análisis de carbonilos en proteína mitocondrial y (B) citosólica. WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). Los valores están expresados como medias \pm ESM. * $p < 0,05$ vs sham del mismo grupo, ANOVA-test de Dunnett; # $p < 0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis, ANOVA- test de Bonferroni. (C) Anti-DNP Oxyblot (15 μ g proteína); se muestra western blot representativo de 4 a 5 experimentos independientes; las proteínas no tratadas con inductor de carbonilación no mostraron bandas.

La evaluación del estrés oxidativo en tejido cardíaco durante la sepsis por LPC evidencia, un aumento progresivo en la actividad antioxidante mitocondrial con posterior y abrupto agotamiento. Tanto el incremento transcripcional y de la expresión proteica como la activación de enzimas antioxidantes mitocondriales, se observaron en el estadio tardío de la sepsis.

La sobreexpresión de Trx1 mantuvo un menor nivel oxidativo celular, regulando y retardando el agotamiento de la capacidad antioxidante mitocondrial.

4. EFECTO DE TRX-1 SOBRE EL ESTRÉS NITROSATIVO EN LA DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA POR SEPSIS

El óxido nítrico regula de manera importante el sistema cardiovascular y específicamente en el corazón modula la función y ritmo cardíacos, el mecanismo de contracción-relajación, crecimiento celular y supervivencia (Massion, Feron et al. 2003). En disfunción miocárdica por sepsis, las alteraciones en la producción de NO y sus enzimas generadoras constituyen un factor reconocidamente involucrado tanto en el detrimento como en la protección de la función cardíaca. Con el propósito de evaluar modificaciones en este aspecto debidas a la sobreexpresión de Trx1, procedimos a analizar la expresión y actividad de las NOS.

4.1 Evaluación de la expresión proteica de óxido nítrico sintasas

Se analizó la presencia y comportamiento de las sintasas generadoras de NO (NOS) por medio de las técnicas de *Western Blot* y qRT-PCR en tiempo real.

Al evaluar los cambios en la expresión para cada una de las isoformas de NOS, se halló que en el caso de eNOS e iNOS no se observó aumento en los niveles de ARNm así como tampoco en los niveles de expresión proteica por western blot durante la progresión de la sepsis. Por el contrario, se vió una reducción en la expresión, que para iNOS se hizo no detectable tanto por PCR en tiempo real como por PCR cualitativa (RT-PCR).

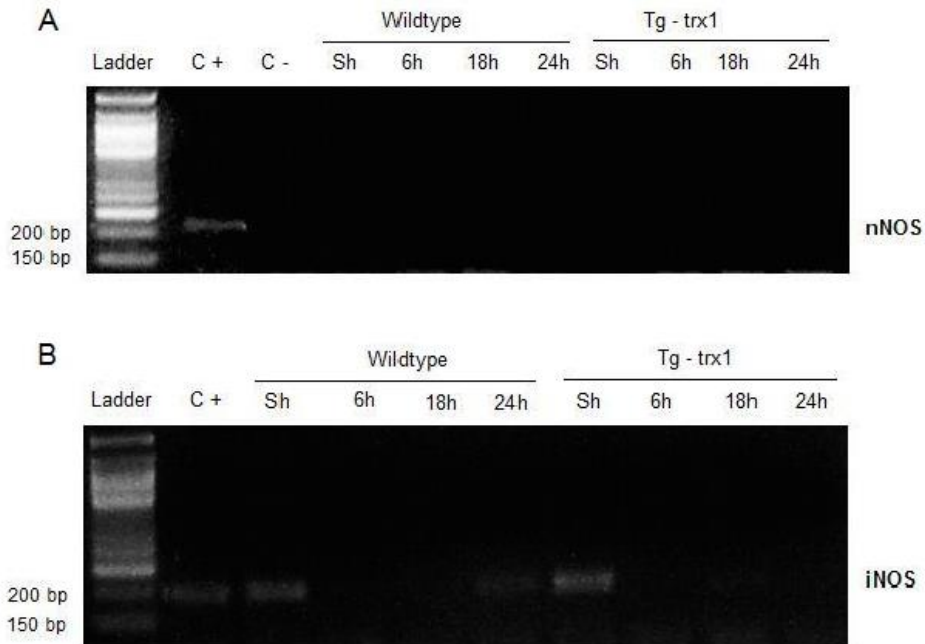


Figura 28. Expresión cardíaca de (A) nNOS e (B) iNOS por RT-PCR

En el corazón, la forma endotelial (eNOS) está presente en células endoteliales regulando la función vascular y en células del endocardio, cardiomiocitos y células especializadas del sistema conductor del sinus y nodo atrio-ventricular, regulando el mecanismo contracción-relajación (Kojda and Kottenberg 1999). Se observó una reducción en su expresión a las 6 hs post LPC en WT, que fue reversible en los tiempos de sepsis tardía; mientras que en los ratones Tg-trx1 se observaron valores basales significativamente menores al WT que disminuyeron a las 6 h y luego recuperaron los niveles iniciales.

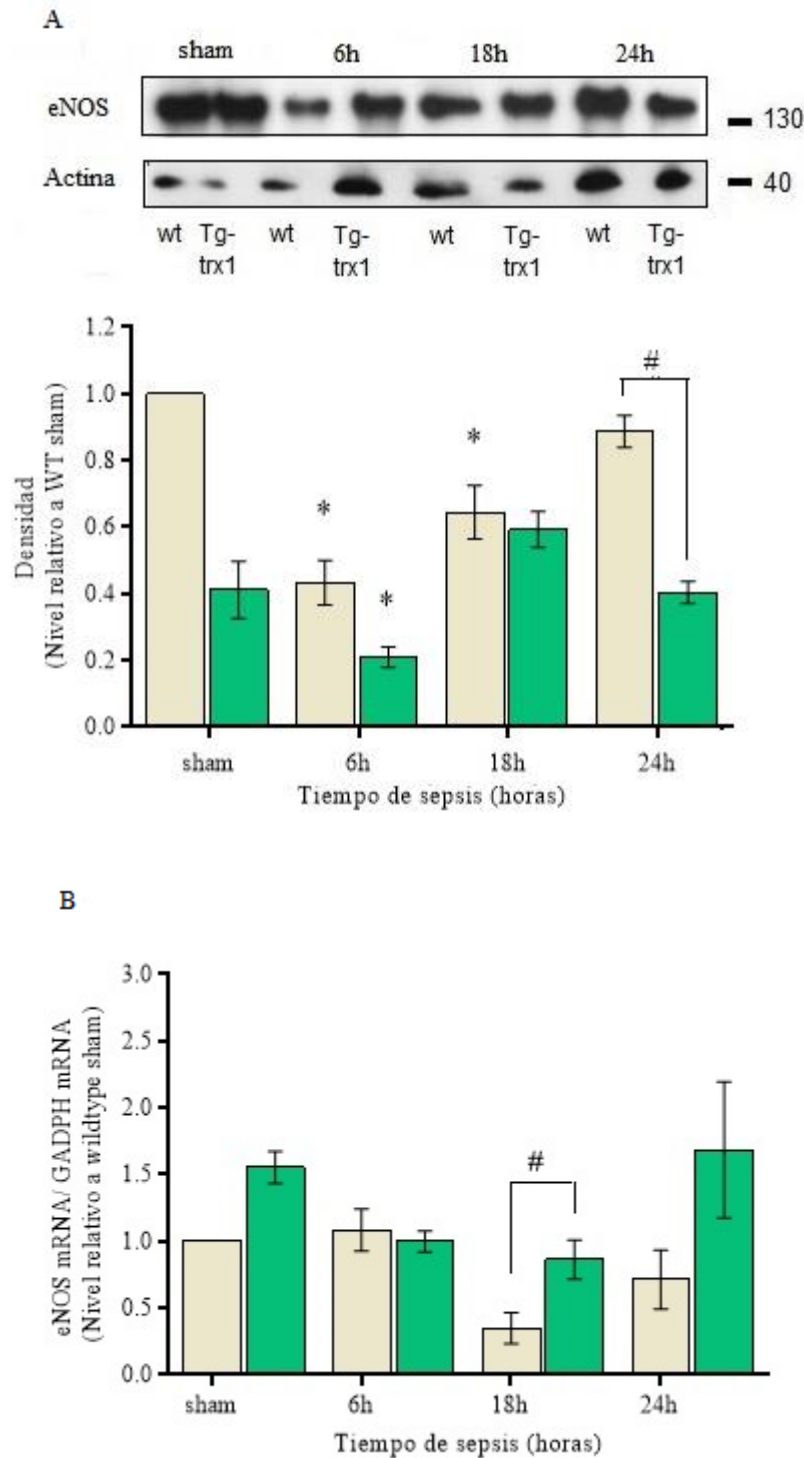


Figura 29. Caracterización de la expresión de eNOS. (A) Análisis de la expresión de eNOS por western blot (40 μ gr proteína/calle) representativo de 4 a 5 experimentos independientes. (B) Análisis de los niveles de ARNm/RT-PCR Real Time. Los datos representan 3 experimentos independientes realizados por triplicado. ; # $p < 0,05$ comparación entre grupos al mismo tiempo de sepsis, ANOVA- test de Bonferroni.

La expresión de la forma constitutiva NOS neuronal (nNOS) no fue detectable por western blot ni por PCR.

4.2 Evaluación de la actividad enzimática de óxido nítrico sintasas

Teniendo en cuenta que no sólo la expresión sino que también la actividad de las óxido nítrico sintasas modula los niveles de NO presente en los tejidos, determinamos la producción de NO y evaluamos posibles diferencias entre los grupos que pudieran evidenciarse debido a la acción de Trx1. Para esto, se utilizó el método de conversión de citrulina en homogenatos frescos de corazón. En concordancia con los resultados de expresión, se observó que la actividad enzimática en homogenato de tejido cardiaco se mantuvo estable en ambos grupos.

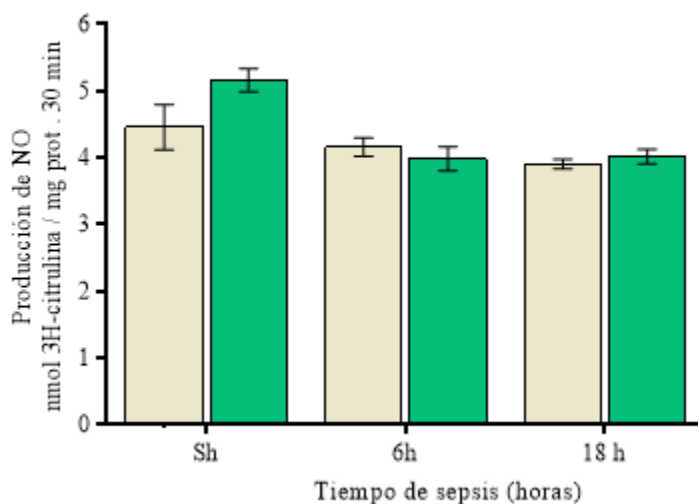


Figura 30. Actividad máxima de NOS determinada en homogenatos de corazón por el método de conversión de ^3H -L-arginina a ^3H -L-citrulina. WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). $n= 4$.

4.3 Nitración en tirosina de homogenato de músculo cardiaco

Los efectos deletéreos del NO son mediados por el peroxinitrito ONOO^- (producto de la reacción entre el NO y el O_2^-). Con el ánimo de detectar alguna alteración causada por su

presencia sobre tejido cardiaco, se estudió la presencia de nitración de tirosina por *Western Blot*.

Los resultados evidenciaron una reducción en los niveles de 3-nitro-tirosina durante la progresión del proceso séptico, que fue significativa a partir de las 18 hs en Tg-trx1 y a las 24 hs en ratones WT, en coincidencia con los estudios sobre expresión y actividad de las NOS. La gráfica muestra la reducción de nitración en proteínas de una muestra aleatoria de Western blot de pesos moleculares mayores a 70 kDa.

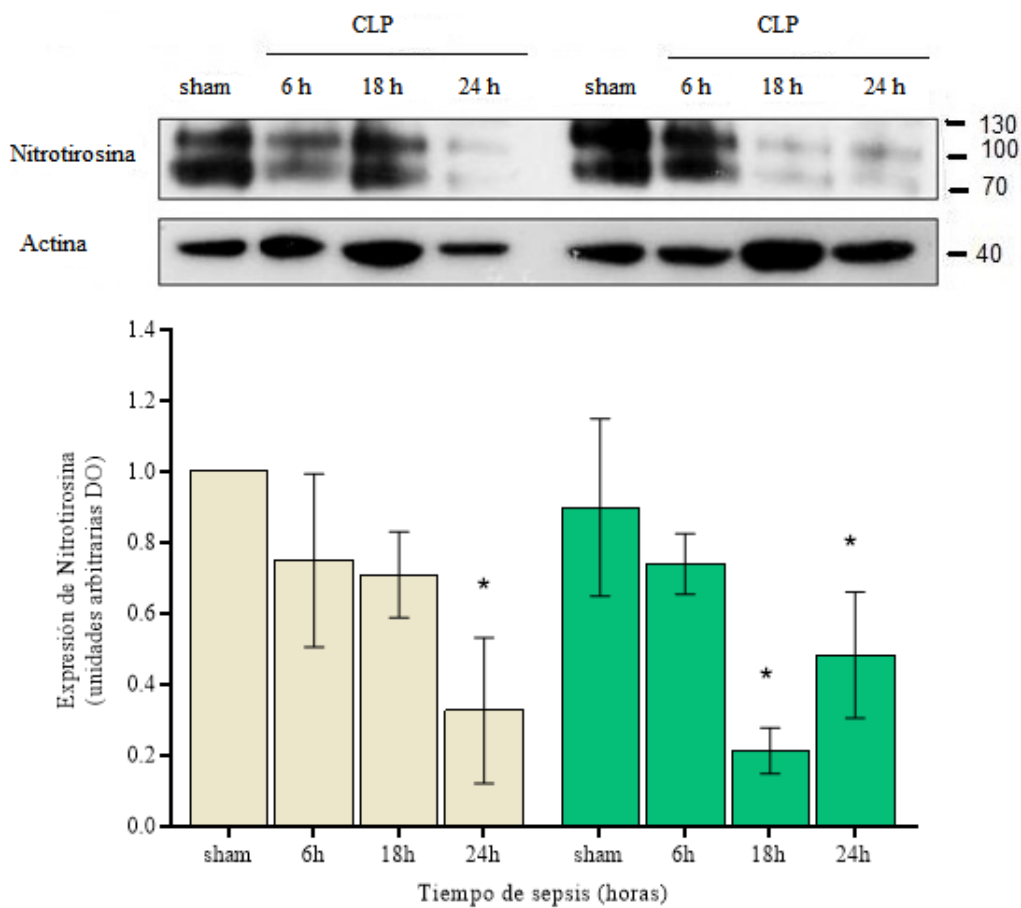


Figura 31. Nitración de proteínas en homogenatos de tejido cardiaco. Western blot representativo muestra la nitración de proteínas en tirosina (30 µg de proteína/calle). WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes).n=3. * $p < 0,05$ vs sham del mismo grupo, ANOVA- test de Dunnett

En el modelo de sepsis por LPC, no se detecta aumento en la expresión ni actividad de las NOS en tejido cardiaco, coincidente con la reducida nitración proteica.

5. EFECTO DE TRX-1 SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA POR SEPSIS

5.1 Evaluación del consumo de oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno en cubos de tejido cardiaco en ratones WT sépticos no mostró cambios significativos respecto de su mismo grupo sham. Por el contrario, en Tg-trx1 se halló una tasa total de consumo de oxígeno significativamente incrementada a las 6 hs post-LPC (Fig 32A).

Con el fin de precisar la utilización del oxígeno por parte de la mitocondria, se evaluó adicionalmente el consumo en presencia de KCN. El cianuro (CN⁻) inhibe de manera competitiva el metabolismo aeróbico al unirse a la citocromo oxidasa *c*. Se evidenció entonces que, a las 6 hs post-LPC en los corazones de ratones Tg-trx1, se incrementaba tanto el consumo de oxígeno mitocondrial como el proveniente de otras fuentes; llegando a ser la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial significativamente mayor a la del WT ($p = 0,0339$). (Fig. 32B)

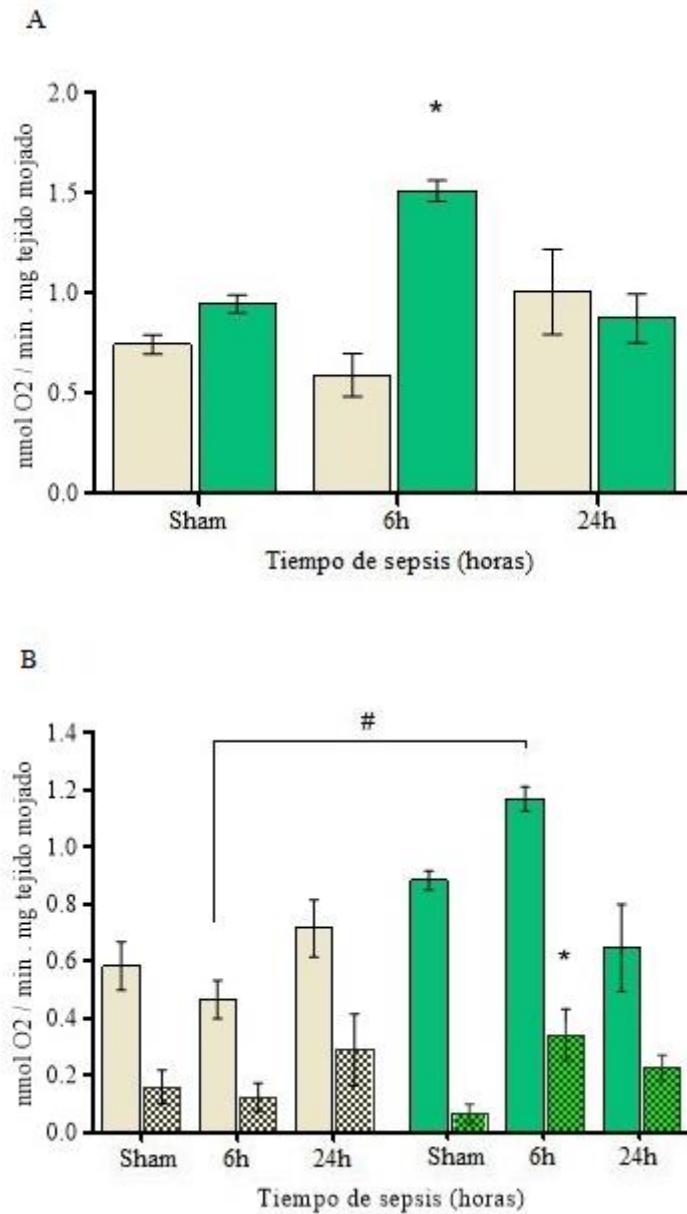


Figura 32 Consumo de oxígeno en cubos de tejido cardiaco de 1 mm². (A) Tasa de consumo de oxígeno total. (B) Tasa de consumo de oxígeno de fuente mitocondrial (barras plenas) y otras fuentes no mitocondriales en presencia de KCN (Barras con tramas); WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). Los resultados están expresados como medias ± ESM. * $p < 0,05$ vs sham, ANOVA-test de Dunnett, $n = 6$. # $p < 0,05$ comparando entre grupos en el mismo tiempo de sepsis, ANOVA-test de Bonferroni, $n = 6$.

5.2 Evaluación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria

Con el fin de caracterizar la función mitocondrial, la actividad de los complejos de la cadena respiratoria fue realizada en mitocondria aislada de tejido cardiaco. Durante la etapa temprana de la sepsis, a las 6 hs post LPC, en las mitocondrias tanto de ratones Tg-trx1 como WT se observó una ligera tendencia al incremento de la actividad de los complejos sin exhibirse cambios significativos. Por el contrario, en etapa tardía se observó paulatina reducción en la actividad de toda la cadena respiratoria. El descenso en la actividad del complejo I fue significativo solo en el grupo WT a las 24 hs post LPC. La actividad del complejo IV se redujo en ambos grupos también sólo hasta las 24 hs post LPC. La actividad del complejo II-III se mantuvo invariable.

Tabla 4. Actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones

		Complejo I (nmol/min.mg proteína)	Complejo II-III (nmol/min.mg proteína)	Complejo IV [k (min ⁻¹) /mg proteína]
Wildtype	Sham	341 ± 32	225 ± 23	39 ± 2
	6 h	344 ± 38	236 ± 32	43 ± 2
	18 h	231 ± 13	194 ± 15	35 ± 4
	24 h	130 ± 22 *	146 ± 20	30 ± 1 *
Tg-trx1	Sham	346 ± 35	168 ± 33	40 ± 2
	6 h	318 ± 45	219 ± 27	37 ± 1
	18 h	216 ± 28	207 ± 28	38 ± 4
	24 h	198 ± 26	137 ± 23	30 ± 1 *

Las actividades de los complejos se determinaron utilizando NADH como sustrato del complejo I y succinato 6 mM como sustrato del complejo II y citocromo c reducido como dador de electrones del complejo IV. Los datos se expresan como medias ± ESM. * $p < 0,05$ comparado con su sham; prueba ANOVA-Dunnnett test, $n = 6$.

5.3 Producción de especies reactivas del oxígeno

Para examinar la capacidad de generación de ERO por la mitocondria, se evaluó la tasa de producción máxima de H₂O₂ usando antimicina A como inhibidor de la transferencia de electrones en el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial.

Los datos evidenciaron que, en mitocondrias cardiacas durante la oxidación de malato-glutamato, la tasa de producción de H₂O₂ en Tg-Trx1 se mantuvo constante conforme la progresión de la sepsis. En ratones WT y contrario a lo esperado se redujo en un 33% a las 6 hs post LPC, retornando a valores basales a las 18 hs en comparación con el grupo sham. Datos se correlacionaron con las mediciones control realizadas en un tejido de similares características estructurales y funcionales como el diafragma, evidenciándose un comportamiento similar en la tasa de producción.

Tabla 5. Máxima capacidad de producción de peróxido de hidrógeno por la mitocondria.

		CORAZÓN nmol H ₂ O ₂ /min. mg proteína		DIAFRAGMA nmol H ₂ O ₂ /min. mg proteína
		+ Malato-glutamato	+ L-Arginina (NO dependiente)	+ Malato-glutamato
Wildtype	sham	0,42 ± 0,05	0,50 ± 0,06	0,38 ± 0,06
	6 h	0,28 ± 0,03 *	0,25 ± 0,04 *	0,33 ± 0,04
	18 h	0,40 ± 0,03	0,56 ± 0,09	0,47 ± 0,11
Tg-trx1	sham	0,36 ± 0,04	0,26 ± 0,02 #	0,35 ± 0,03
	6 h	0,35 ± 0,04	0,33 ± 0,03	0,31 ± 0,07
	18 h	0,37 ± 0,01	0,48 ± 0,05 *	0,54 ± 0,04

Los valores están expresados como medias ± ESM. *p <0,05 diferencias estadísticamente significativas comparado con sham. # p <0,05 comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis.

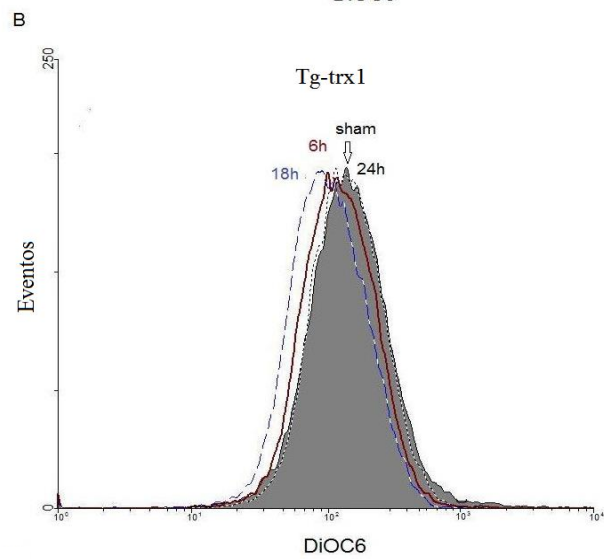
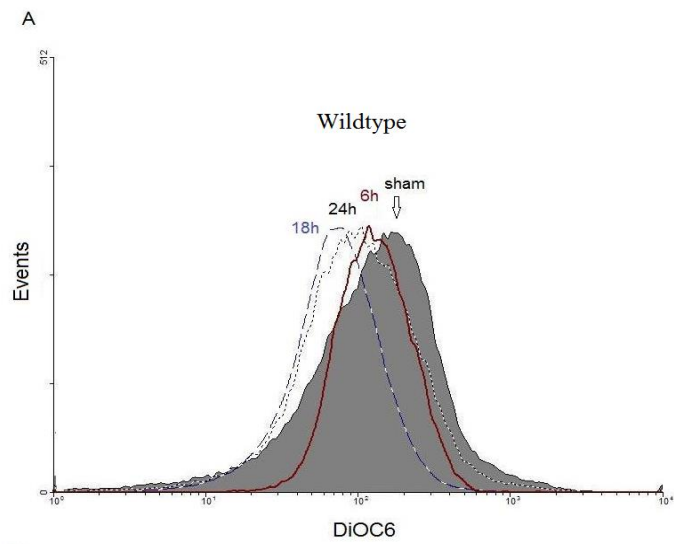
El experimento se realizó también con la adición de L-arginina al buffer de reacción en presencia de malato-glutamato como sustrato, para evaluar la producción en condiciones dependientes de NO. Nuevamente, en WT se observó una reducción en la tasa de producción, esta vez en un 51% a las 6 hs post LPC. En etapa tardía de sepsis, la tasa de producción mostró tendencia al incremento llegando a ser significativo el incremento a las 18 hs post LPC en el grupo Tg-trx1.

5.4 Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Un gran número de factores fisiológicos regulan o modulan la generación mitocondrial de ERO; entre ellos el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). Un alto $\Delta\psi$ favorece su producción, particularmente en el complejo III.

Cuando el potencial de membrana fue evaluado a las 6 hs post LPC, se pudo evidenciar significativa despolarización sólo en mitocondrias de ratones WT, con una reducción del 30% en comparación con su sham. En Tg-trx1 no se observaron cambios. A las 24 hs post LPC se observó reversión a valores basales de la polarización mitocondrial.

La medición del potencial de membrana en presencia de succinato 6 mM y sin adición de ADP (estado 4 o respiración) detecta cambios debido al flujo reverso en el complejo I y III. Se observó inducción de una mayor despolarización a las 6 y 18 hs en WT y a las 18 hs en Tg-trx1.



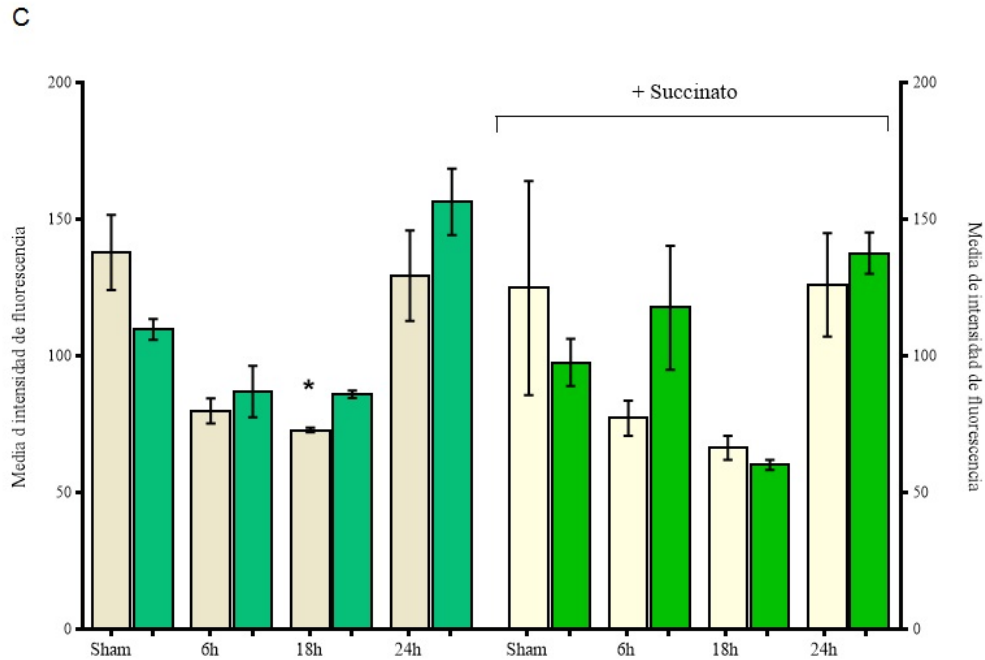


Figura 33. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en corazón por citometría de flujo. (A y B) Panel superior y medio que muestran los histogramas representativos de eventos mitocondriales (R1) versus intensidad de fluorescencia por DiOC₆ por tiempo de sepsis (líneas de color), en ratones WT y en ratones Tg-trx1 respectivamente. (C) Gráfico de barras representando cuantificación de fluorescencia por DiOC₆ en ausencia (barras tono oscuro) y presencia de succinato 6 mM (barras tono claro); en WT (barras beige) y Tg-Trx1 (barras verdes). Los resultados son expresados como medias \pm EE, de al menos 4 experimentos independientes * $p < 0,05$ comparado con su sham; prueba ANOVA- test de Dunnett.

En la membrana interna mitocondrial se localizan las proteínas desacoplantes (UCPs) que facilitan el transporte de protones desde el citosol hacia la matriz mitocondrial, evitando el paso a través del complejo V y con ello un parcial desacoplamiento entre la reducción del oxígeno y la producción de ATP. El incremento en su expresión y transcripción ha sido uno de los mecanismos asociados a la reducción en la producción de ERO así como también la reducción de la eficiencia cardíaca en patología cardíaca (Boudina and Abel 2006, Murray, Cole et al. 2008).

Por lo tanto, se evaluaron los niveles de transcripción de UCP-2 y UCP-3, quienes se expresan específicamente en corazón, observándose que por el contrario hubo una reducción significativa en los niveles de transcripción en tejido cardiaco. En ratones Tg-trx1 se observó el mismo resultado; sin embargo, a 24 horas los niveles de ARNm de UCP2 fueron significativamente mayores en los animales transgénicos.

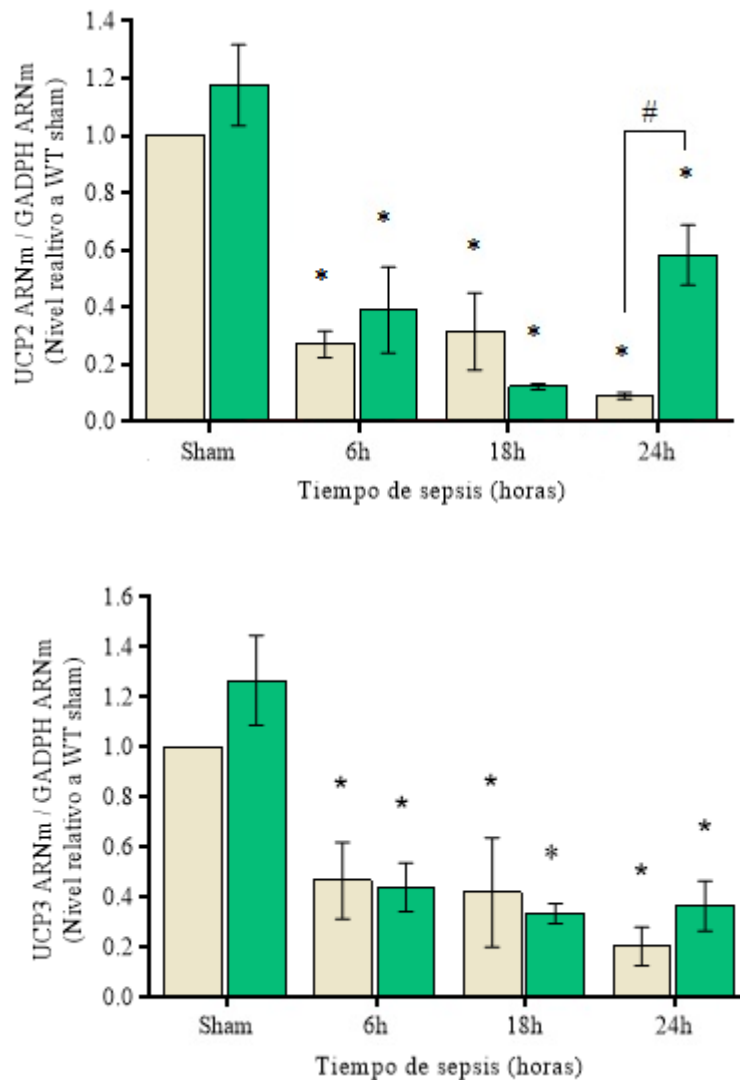


Figura 34. Análisis de niveles de ARNm por RT-PCR Real Time de Uncoupling protein 2 (UCP2) y 3 (UCP3). Datos representan al menos 4 experimentos independientes por duplicado. WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). * $p < 0,05$ comparado con su sham; prueba ANOVA- test de Dunnett # $p < 0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis; prueba ANOVA- test de Bonferroni

El estudio de la función mitocondrial señaló que, en un estadio temprano del proceso séptico la actividad de la cadena respiratoria de la mitocondria cardiaca no se afecta y que tal vez como un efecto protector o adaptativo la mitocondria se despolariza reduciendo la producción de H₂O₂, por un mecanismo no asociado a las proteínas desacoplantes mitocondriales.

En estadio tardío se observó pérdida de la actividad de complejos mitocondriales, correspondiente con la aparición de estrés oxidativo. La sobreexpresión de Trx1 atenuó y retardó estos efectos en la función mitocondrial.

6. EFECTO DE TRX-1 SOBRE EL PROCESO DE MUERTE CELULAR APOPTOSIS/AUTOFAGIA EN DM POR SEPSIS

6.1 Evaluación de apoptosis

Una de las principales funciones de Trx1 es la de inhibir la apoptosis. Por tanto, para evaluar la presencia de apoptosis y modificaciones debido a la sobreexpresión de Trx1 en tejido cardiaco, se utilizó el método de TUNEL como método directo para la detección de puntos de rotura del DNA.

No se observaron núcleos sugestivos de apoptosis en la progresión de la sepsis en los grupos estudiados.

La siguiente figura muestra resultados representativos obtenidos a las 24 hs post LPC.

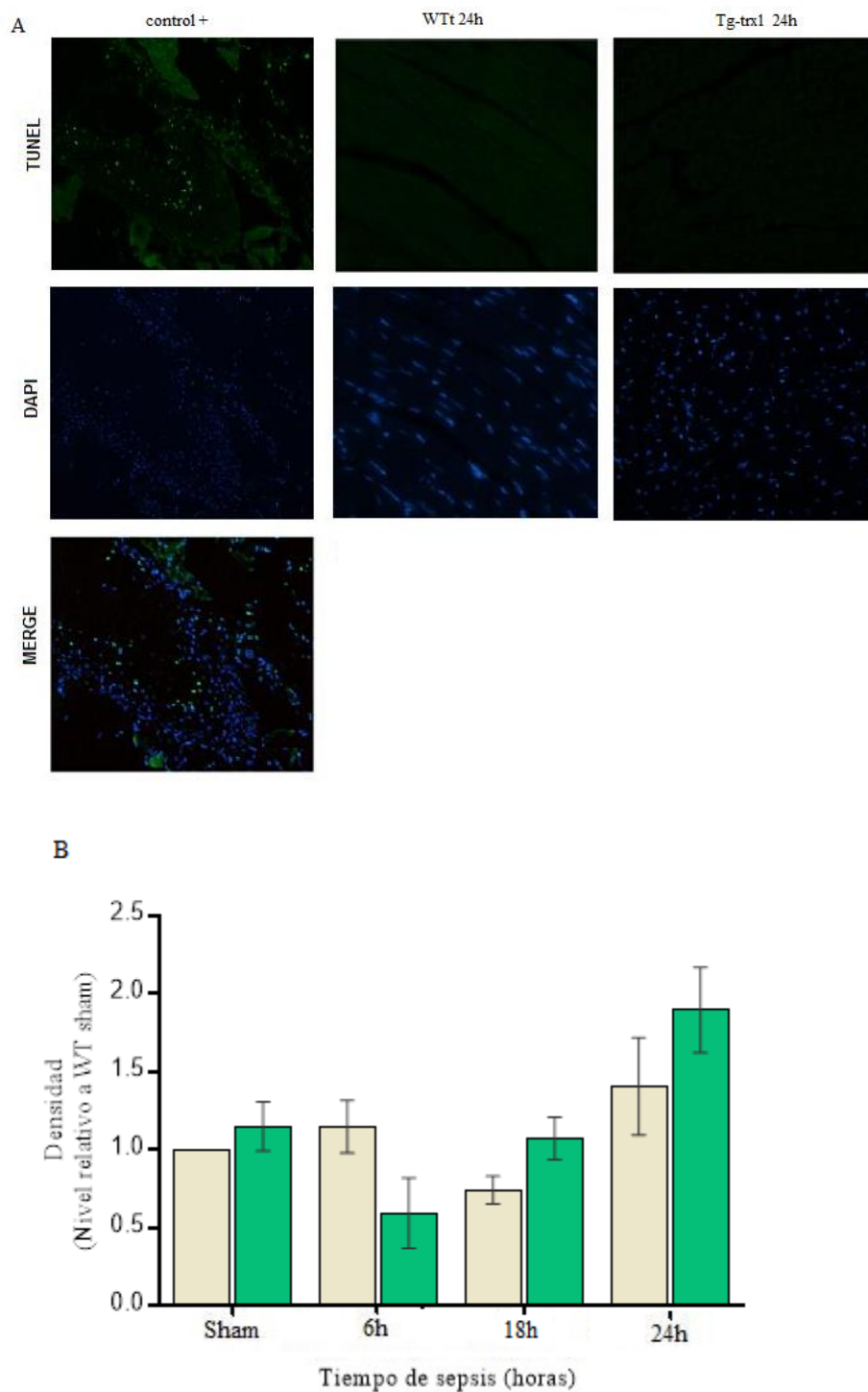


Figura 35. Evaluación de apoptosis. (A) Imágenes de Microscopía de fluorescencia de análisis en cortes de tejido por el método de TUNEL. (B) Análisis de expresión de Western blot de Citocromo c en proteína mitocondrial (25 µg proteína/calle). WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). Los datos están expresados como medias \pm EE, representan al menos 3 experimentos independientes.

Como método indirecto de evaluación de apoptosis, se analizó la expresión de citocromo *c* en proteína mitocondrial. La activación de proteínas pro-apoptóticas producen la apertura de la membrana externa de las mitocondrias permitiendo la liberación de proteínas del espacio intermembrana como el citocromo *c*. Si bien se observó una ligera reducción en la sepsis temprana, a 6 h en ratones Tg-trx1 y 18 h en WT, y luego un ligero incremento hacia las 24 hs, estos cambios en la expresión mitocondrial de citocromo *c* no fueron significativos (Fig. 35B).

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se realizó complementariamente un estudio histopatológico, mediante el método de tinción hematoxilina-eosina a las 6 y 24 hs post LPC. Al examinarse las láminas, se evaluaron las características de las fibras miocárdicas, intersticio y vasos capilares y no se hallaron cambios nucleares sugestivos de apoptosis en las fibras miocárdicas, así como tampoco daño estructural aparente e importante. En algunos especímenes de 24 hs post LPC se observó reactividad en el endotelio vascular en ambos grupos.

A continuación, se evaluó ultraestructuralmente el tejido miocárdico por microscopía electrónica. Indistintamente entre WT y Tg-trx1, los resultados revelaron evidencia de daño en la estructura mitocondrial, principalmente. Cambios en la organización de las fibras miocárdicas se observaron en áreas delimitadas y sólo después de las 24 hs post LPC.

Tejidos de ratones sham mostraron típica organización mitocondrial con membranas bien definidas y con crestas comprimidas.

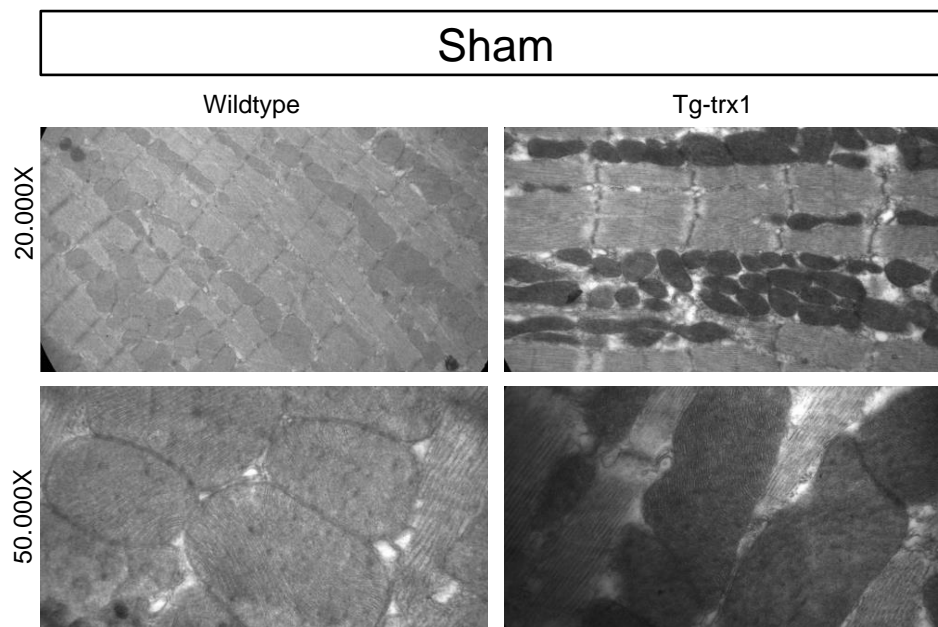
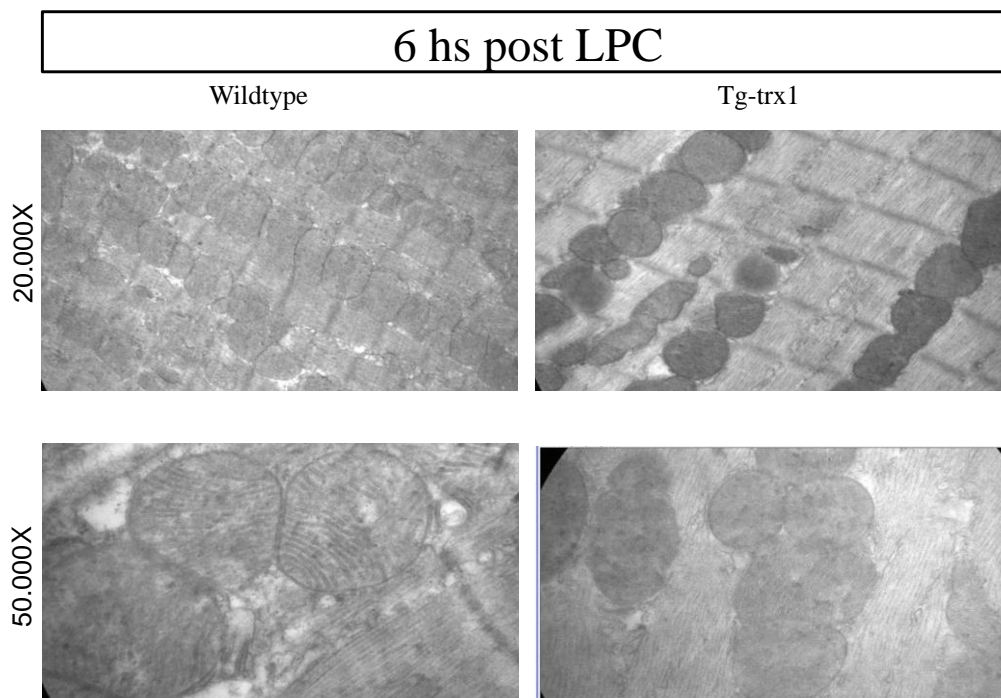


Figura 36. Micrografías de transmisión electrónica representativas del tejido ventricular de ratones sham



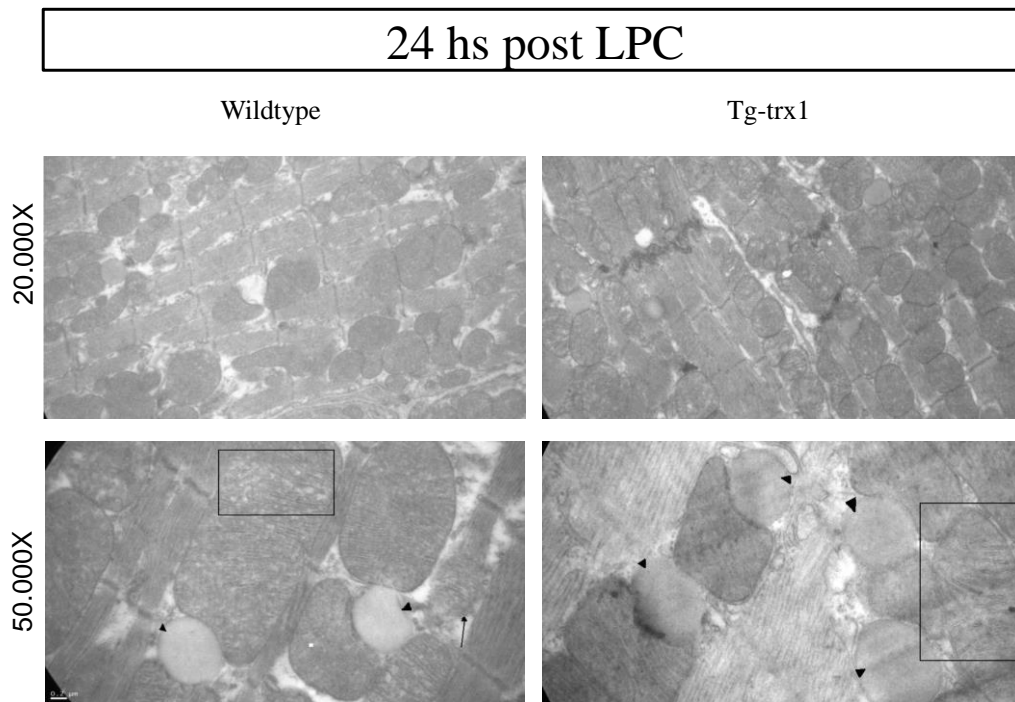


Figura 37. Micrografías de transmisión electrónica representativas del tejido ventricular de ratones sometidos a sepsis por LPC. Las cabezas de flecha, señalan gotas lipídicas; la flecha, disrupción de la membrana mitocondrial externa; y los recuadros, la disrupción de las crestas mitocondriales con claridad en la matriz mitocondrial y swelling.

A 6 y 24 hs post LPC, se evidenciaron anomalías estructurales en las mitocondrias para ambos grupos, que incrementaron conforme avanzó el tiempo de sepsis. A las 6 hs post LPC, sólo algunas mitocondrias presentaron pérdida y/o disrupción de las crestas y morfológicamente se observó la aparición de mitocondrias agrupadas de forma más redondeada sin cambios en la longitud del eje mayor (longitud promedio shams WT: 1,3 Tg-trx1: 1,1 μm ; vs 6 h WT: 1,2 Tg-trx1:1,1 μm), compatible con mayor interconexión mitocondrial y sugestivo de cambios en fusión/fisión.

A las 24 hs, ultraestructuralmente se observó desorganización miofibrilar. Las mitocondrias presentaron mayores alteraciones debido a la formación de vesículas internas, mayor grado de disrupción en las crestas y en la membrana externa mitocondrial. También

se observó la aparición de gotas lipídicas (cabezas de flechas) junto a las mitocondrias, las cuales se han encontrado asociadas a la pérdida de integridad mitocondrial y como estrategia de supervivencia celular.

Debido a que cualitativamente no se apreciaron diferencias entre los grupos, se decidió valorar cuantitativamente los cambios morfológicos ultraestructurales y diferencias entre los grupos, para lo cual se determinó el porcentaje de mitocondrias por tipo de alteración, presente en un total de 10 campos aleatorios en tres tejidos de ratones y experimentos diferentes para sham, 6 y 24 h post LPC. Los resultados mostraron una total alteración en la ultraestructura del tejido cardiaco hacia las 24 h en ambos grupos; pero que significativamente hubo un mayor porcentaje de alteración en las crestas y en la membrana externa mitocondrial en los ratones WT a diferencia de Tg-trx1.

Tabla 6. Caracterización de cambios estructurales mitocondriales

GRUPO	Wildtype			Tg-Trx1		
	sham	6 h	24 h	sham	6 h	24 h
DESORGANIZACIÓN CELULAR Y MIOFIBRILAR	0,0	2 (0-6)	31 (0-63)*	0,0	0,0	31 (10-53) *
VACUOLACIÓN	0,0	4 (3-5)	17 (8-26) *	0,0	0,0	12 (6-18) *
ALTERACIÓN CRESTAS MITOCONDRIALES	0,0	17 (3-31)*	68 (48-87) *	0,0	9 (1-18)	57 (32-82) * #
DAÑO MEMBRANA MITOCONDRIAL EXTERNA	12 (0-25)	19 (9-29)	35 (27-44)*	12 (6-18)	14 (2-25)	28 (19-37)#

Valores expresados como promedio de porcentajes (%. IC 95%) obtenidos en 10 campos aleatorios de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ comparado con sham y # $p < 0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis.

Adicionalmente se determinó el área mitocondrial con el objetivo de corroborar alteraciones en el tamaño por *swelling* o fraccionamiento mitocondrial y se evidenció que a las 6 h efectivamente hay un aumento de tamaño en algunas mitocondrias, pero a las 24 h,

por el contrario, se observa mayoritariamente mitocondrias un poco más pequeñas, muy probablemente relacionado a la activación del proceso de biogénesis mitocondrial y/o activación del proceso de fisión sobretodo en ratones WT, tal como se muestra más adelante.

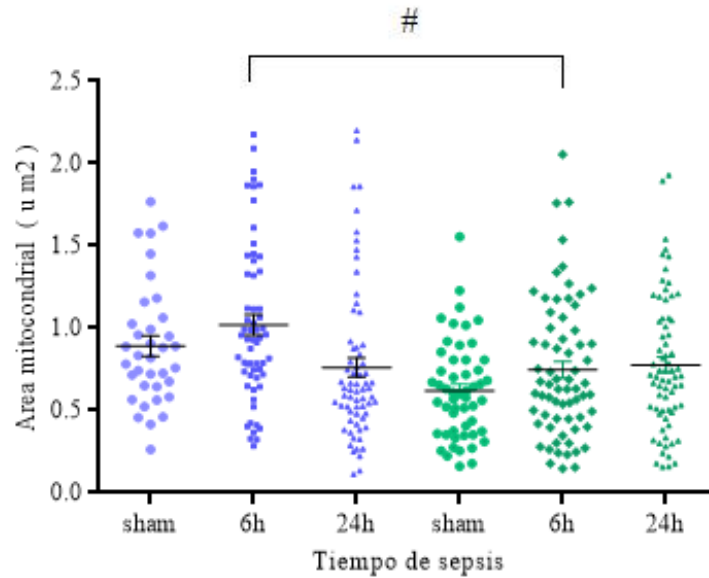


Figura 38. Gráfico del área mitocondrial, donde la línea central muestra la media de los valores de área en cada grupo. $n = 50 - 70$ mediciones). WT (puntos azules) y Tg-trx1 (puntos verdes). # $p < 0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis.

6.2 Evaluación de autofagia

El estudio de las imágenes por microscopía electrónica permitió además la identificación de zonas de vacuolización autofágica y la presencia de estructuras compatibles con una selectiva eliminación de mitocondria o mitofagia (Fig 16).

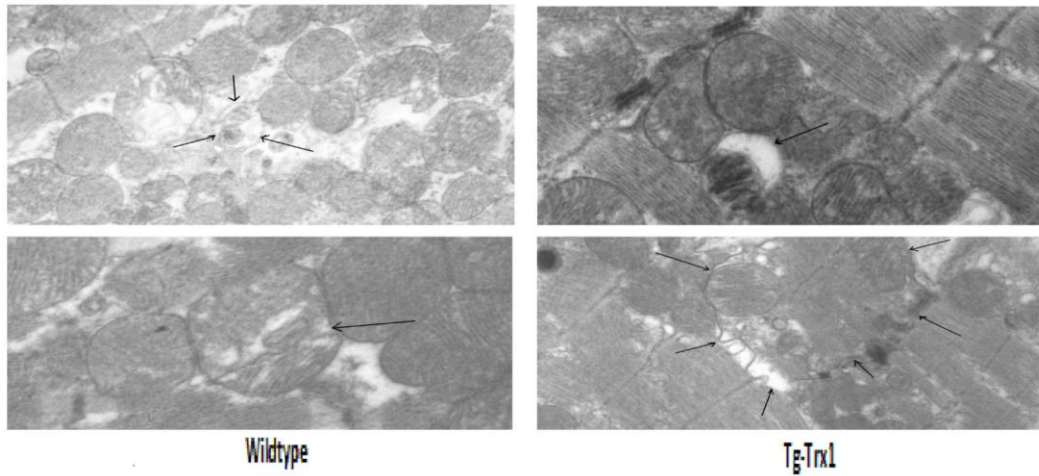


Figura 39. Imágenes de Microscopía Electrónica. Evidencia microscópica de autofagia y mitofagia.

Microscópicamente no fue evidente una mayor o anticipada aparición de estas estructuras compatibles con mitofagia, por lo que con el objeto de confirmar las observaciones por microscopia electrónica, se analizó la razón de expresión de LC3-II /LC3-I como indicador de presencia e incremento de autofagia.

Los resultados evidenciaron un rápido incremento en los niveles de LC3-II. Hubo una significativa conversión de LC3-I a LC3-II a partir de las 6 hs post LPC en Tg-trx1 y desde las 18 hs en WT.

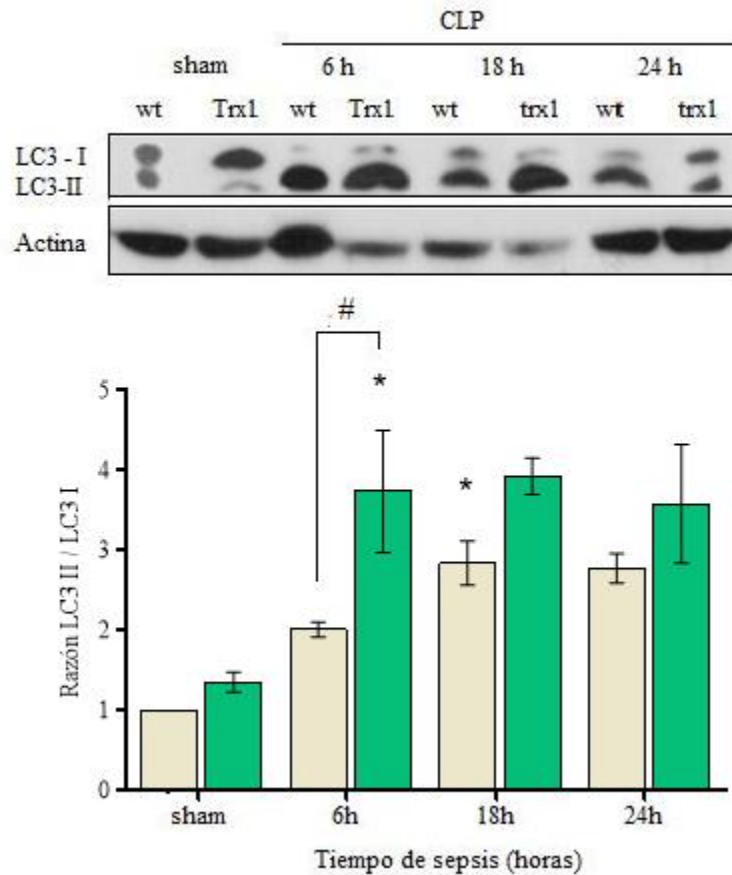


Figura 40. Expresión de LC3 en homogenatos de corazón WT (barras beige) y Tg-trx1 (barras verdes). El panel superior muestra Western blot representativo de las muestras de homogenatos. La actina fue usada como control de carga. Barras en el panel inferior representan análisis densitométrico de la razón LC3-II / LC3-I. * $p < 0,05$ comparado con sham; prueba ANOVA- test de Dunnett

En este capítulo, los datos indicaron que no existe un desencadenamiento del mecanismo de apoptosis y que, por el contrario, hay aparición temprana de autofagia. En concordancia con la progresión del daño mitocondrial, la autofagia se mostró como un mecanismo compensatorio envuelto en el proceso de reciclaje mitocondrial. La sobreexpresión de Trx1 activó anticipadamente este proceso reduciendo el porcentaje de mitocondrias con alteraciones tanto en la membrana interna como externa.

7. EFECTO DE TRX-1 SOBRE LOS PROCESOS DE DINÁMICA Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA EN LA SEPSIS

Con el objetivo de evaluar efectos de la sobre-expresión de Trx1 sobre la asociación entre la progresión en la alteración morfológica mitocondrial y la autofagia con las modificaciones en la dinámica mitocondrial, se analizaron los niveles de transcripción de los principales factores envueltos en los procesos de dinámica y biogénesis mitocondrial.

7.1 Dinámica mitocondrial

Fusión y fisión mitocondrial son procesos necesarios para mantener intacta la funcionalidad de la mitocondria; el desbalance de los mismos está asociado a una gran variedad de situaciones patológicas. Dado que la mitocondria es un compartimento celular clave en el deterioro del tejido y del organismo durante el desarrollo de la sepsis, nos propusimos estudiar la dinámica mitocondrial a lo largo de la de la misma.

La dinámica mitocondrial fue evaluada por medición de ARNm de las proteínas de fusión Mfn2 y OPA-1 y la proteína de fisión Drp1, por qRT-PCR y *Western blot*.

La expresión de Mfn2 se regula a nivel transcripcional; en este modelo no observamos modificaciones significativas en la cuantificación del ARNm en ninguno de los grupos.

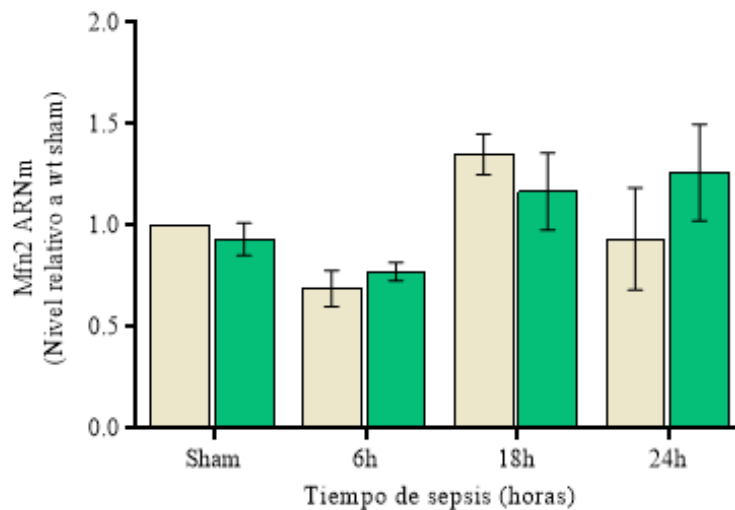
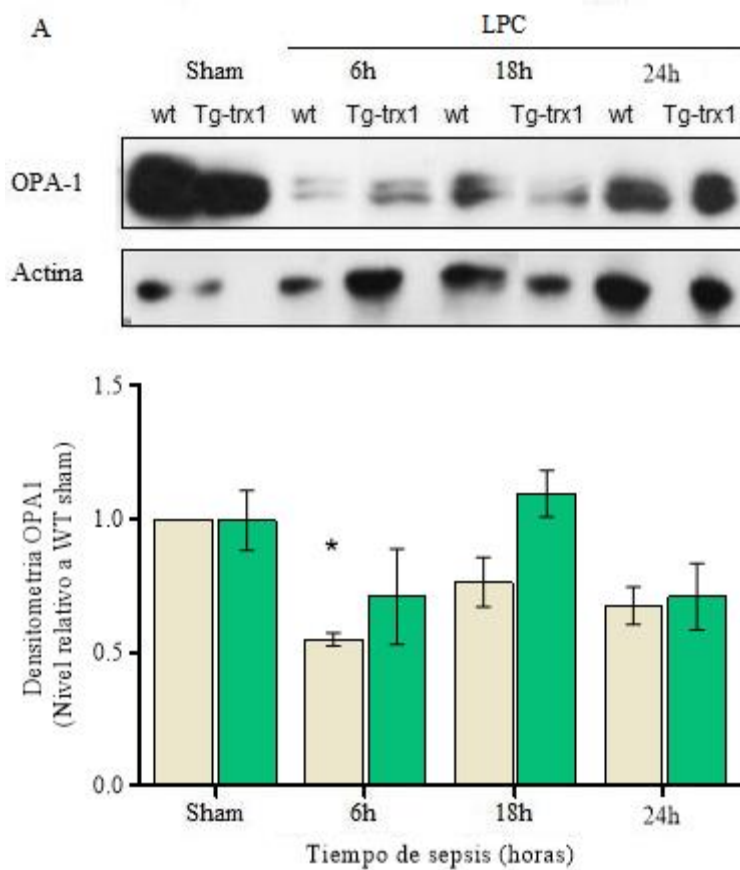


Figura 41. Expresión transcripcional de *Mfn2* en homogenatos de corazón. WT (barras beige) y *Tg-trx1* (barras verdes).



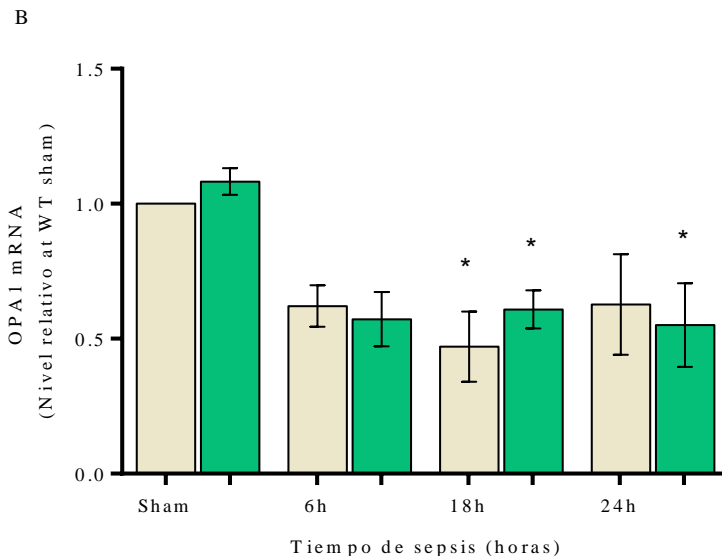


Figura 42. Fusión mitocondrial. (A) Expresión proteica de OPA-1. por Western blot y (B) la expresión transcripcional por ARNm/RT-PCR. Datos representan 4 experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$ comparado con sham. # $p < 0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis.

Por otro lado, se observó una disminución en la expresión proteica de OPA-1 a las 6 hs sólo en WT; y en los niveles de ARNm de OPA-1 después de las 18 hs post LPC, tanto en corazón WT como Tg-trx1. Estos resultados se muestran concordantes con la alteración progresiva de la estructura de las crestas mitocondriales e incremento del área mitocondrial, observada por microscopía electrónica.

Dado que Drp1 es modulada a nivel postraduccional, la actividad de Drp1 fue cuantificada como la relación entre la expresión de pDrp1 Ser 616 (forma activa) respecto de Drp1 total. Esta relación se observó significativamente aumentada en WT a las 24 hs post LPC y no se modificó en Tg-trx1.

Por otro lado, se observó una disminución significativa del ARNm de DRP1 en corazón Tg-trx1 a las 6 y 24 hs post LPC.

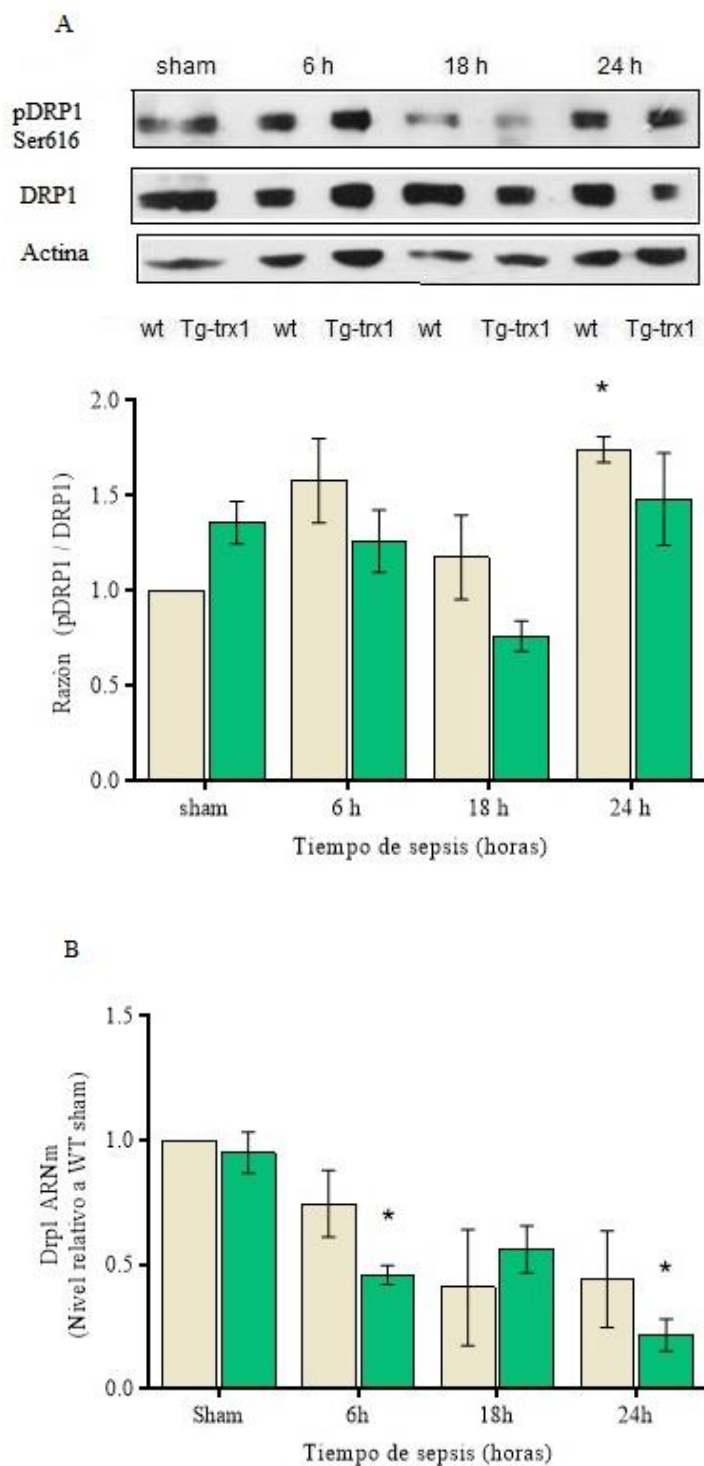


Figura 43. Fisión mitocondrial - DRP1. (A) Razón de la expresión proteica pDRP1 ser 616 / DRP1 por Western blot y (B) expresión transcripcional por ARNm/RT-PCR. Los datos representan 4 experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$ comparado con sham.

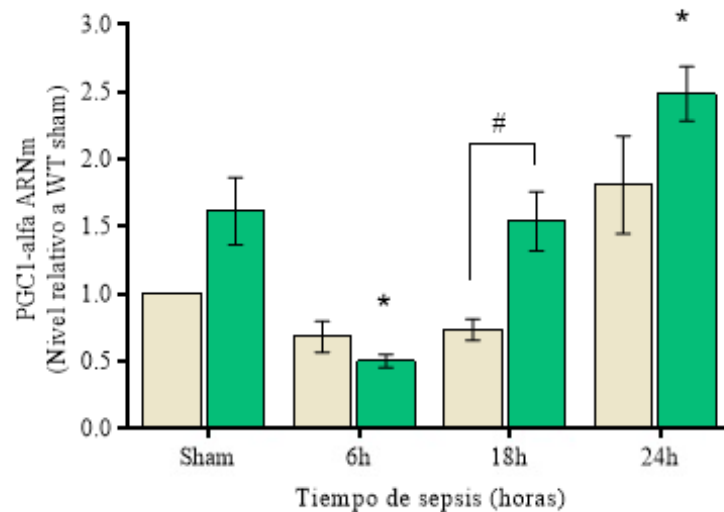
7.2 Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial fue estudiada mediante la cuantificación del coactivador PGC-1 α y los factores de transcripción Nrf1 y TFAM por la técnica de PCR en tiempo real.

Durante la progresión de la sepsis, se observó disminución de PGC-1 α a 6 hs que revierte en forma significativa a 24 hs sólo en Tg-trx1.

El factor de transcripción mitocondrial TFAM disminuyó significativamente a 18 hs post LPC en WT mientras que se mantuvo en Tg-trx1.

A las 18 hs, las diferencias significativas entre WT y Tg-trx1 evidencian un proceso activo de biogénesis mitocondrial con mayor transcripción y replicación de DNA mitocondrial en Tg-trx1.



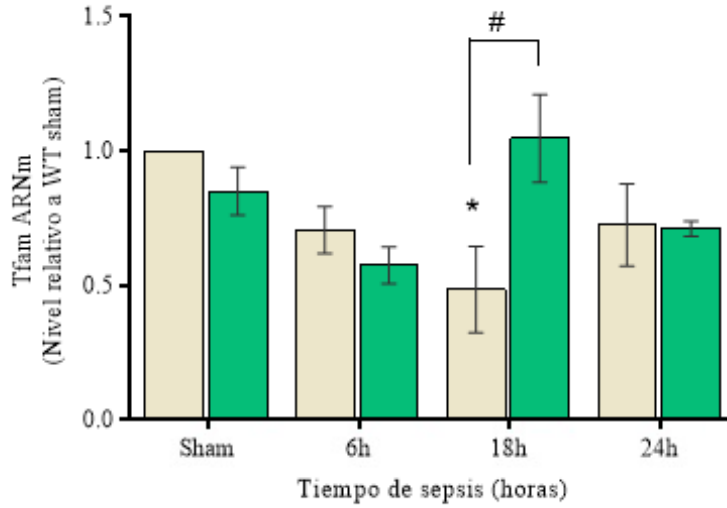


Figura 44. Biogénesis mitocondrial. Análisis por ARNm/RT-PCR. Los datos representan 3-5 experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$ comparado con sham. # $p < 0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis.

Diversos factores de transcripción nuclear pueden ser activados mediante PGC-1 α , entre ellos NRF-1, importante eslabón en la activación de la biogénesis mitocondrial. En este modelo, no fue modulado transcripcionalmente en ninguno de los grupos en los tiempos estudiados.

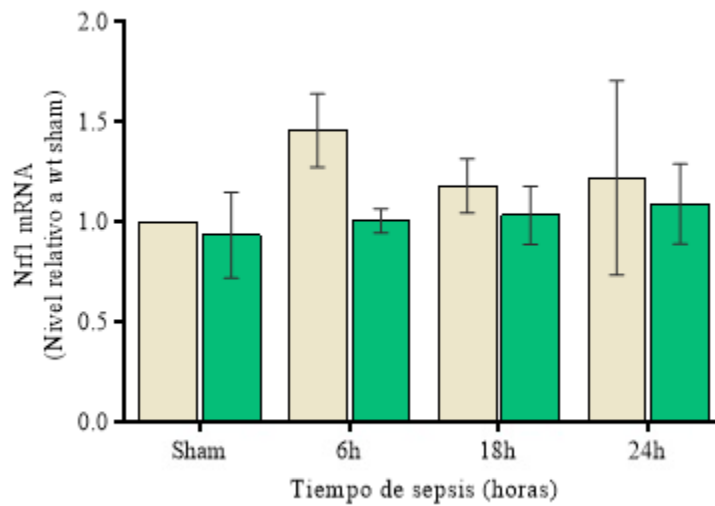


Figura 45. Análisis de la expresión transcripcional de *Nrf1*. Análisis por ARNm/RT-PCR. Los datos representan 3-5 experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$ comparado con sham. # $p < 0,05$ comparación entre grupos en el mismo tiempo de sepsis.

*De estos resultados, se concluye que en los corazones de los animales sépticos se produce una disminución de la biogénesis mitocondrial, un aumento en la fisión mitocondrial por activación de *Drp1* y alteración de la ultraestructura mitocondrial por disminución de *OPA-1*. Este proceso es parcialmente prevenido y retardado por la sobreexpresión de *Trx1* que disminuye el daño oxidativo y activa los mecanismos de recuperación como la biogénesis mitocondrial y la mitofagia.*

Discusión

Aspectos generales

La evidencia actual demuestra la existencia de diversos mecanismos involucrados en la disfunción miocárdica, incluyendo la respuesta inflamatoria, las alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular y la cascada de señalamiento adrenérgico, la desregulación autonómica, la alteración en la función mitocondrial y el consumo mitocondrial de oxígeno, el estrés oxidativo y la apoptosis (Flynn, Chokkalingam Mani et al. 1007, Rudiger and Singer 2007, Flierl, Rittirsch et al. 2008). El estrés oxidativo parece ser un factor subyacente a algunos de los mecanismos fisiopatológicos postulados y tiene un papel importante en el desarrollo y progresión de la falla orgánica en la sepsis. Este concepto es sustentado por la correlación positiva hallada entre el daño oxidativo y el consecuente daño orgánico (Ritter, Andrades et al. 2003, Huet, Dupic et al. 2011, Wheeler 2011) y, al mismo tiempo, con resultados que demuestran la reversión de eventos patológicos en la sepsis como consecuencia de la suplementación y refuerzo de defensas antioxidantes endógenas (Korshunov, Skulachev et al. 1997, Baumgart, Simkova et al. 2009, Ceylan-Isik, Zhao et al. 2010, Lowes and Galley 2011).

En modelos experimentales de sepsis, ya ha sido evaluado el impacto de terapias antioxidantes; sin embargo, en la disfunción miocárdica por sepsis existe poca información que, además, es inconclusa debido a las diferentes aproximaciones experimentales concernientes al modelo de sepsis utilizado, variabilidad en los eventos medidos y el tipo, vía y cantidad de antioxidante administrado. Como ejemplo de ello, se ha podido observar que la sobreexpresión de metalotioneína atenúa la generación de especies reactivas del oxígeno, recobra la función contráctil cardíaca inducida por los lipopolisacáridos (LPS) y la disfunción homeostática intracelular del Ca^{2+} (Ceylan-Isik, Zhao et al. 2010). La sobreexpresión de SOD-1 (Cu-Zn-SOD) no mostró recuperar la respuesta normal ante el estímulo por norepinefrina (Baumgart, Simkova et al. 2009), mientras que la catalasa demostró protección, reduciendo la mortalidad y la disfunción cardíaca inducida por LPS (Turdi, Han et al. 2012).

El miocardio tiene dos grandes sistemas de defensa antioxidante para mantener el equilibrio entre la oxidación/reducción celular: el sistema tiorredoxina (Trx) y el sistema glutarredoxina (Grx) (Berndt, Lillig et al. 2007). Respecto al estudio de la función antioxidante de Trx1 en el tejido cardiaco, se han llevado a cabo investigaciones a nivel molecular en el modelo de sobreexpresión específica de Trx1 en el corazón, demostrando un incremento en el nivel de proteínas asociadas al poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y un mantenimiento adecuado del aparato contráctil (Fu, Wu et al. 2009) e, incluso, regulación positiva de proteínas mitocondriales y de su función (Ago, Yeh et al. 2006). Adicionalmente, más evidencia ha indicado la importancia de Trx1 en las enfermedades cardiovasculares incluyendo daño por isquemia-reperfusión, disfunción contráctil, aterosclerosis y falla cardiaca (Mahmood, Abderrazak et al. , Ahsan, Lekli et al. 2009, Sengupta and Holmgren 2011, Nicholson, Lambert et al. 2013).

A la fecha, no hay evidencia científica que reporte la importancia o los posibles beneficios de Trx1 en la sepsis o específicamente en la disfunción miocárdica por sepsis. Por tanto, el objetivo de la presente tesis doctoral ha sido estudiar los efectos de la sobreexpresión cardiaca de Trx1 ante el estrés oxidativo generado durante la disfunción miocárdica séptica.

En resumen, los principales hallazgos de la presente investigación fueron que la sobreexpresión cardiaca de Trx1: 1) prolonga el tiempo de supervivencia en los animales sépticos; 2) retrasa la aparición de marcadores sistémicos de daño en otros órganos comprometidos en la sepsis; 3) atenúa la caída temprana en la reserva contráctil cardiaca; 4) previene o retarda el agotamiento de las defensas antioxidantes en mitocondrias de corazón; y 5) atenúa y retarda el daño en la función mitocondrial y en la estructura miofibrillar del ventrículo izquierdo. Por otro lado, durante el proceso séptico hay activación del proceso de autofagia en el miocardio que permite la captura, degradación y reciclaje de la población mitocondrial disfuncional, evitando la apoptosis, que aparece más tempranamente en ratones Tg-trx1 y que se asocia con una activación significativa de la biogénesis mitocondrial en el corazón.

Trx1 prolonga el tiempo de sobrevida en animales sépticos

Previamente se había demostrado que la sobreexpresión sistémica de Trx1 prolonga el tiempo de vida media en el ratón transgénico (Mitsui, Hamuro et al. 2002) y que, además, los hace más resistentes al estrés oxidativo (Takagi, Mitsui et al. 1999, Yamamoto, Yang et al. 2003, Perez, Cortez et al. 2011). Los resultados de esta Tesis señalan que la sobreexpresión de Trx1 en el tejido miocárdico produce un incremento en el tiempo medio de sobrevida del ratón séptico (Figura 20), lo que concuerda con los datos de esas investigaciones y enfatiza la importancia de esta proteína como factor protector y de resistencia ante el daño oxidativo producido por las especies reactivas del oxígeno en estados patológicos como la sepsis y su impacto sobre aspectos críticos como el tiempo de sobrevida.

Una explicación para este primer hallazgo podría estar en que la sobreexpresión de Trx1 en el tejido cardíaco esté ejerciendo protección local y además sistémica. Si bien tanto los ratones WT como los Tg-trx1 sufrieron alteraciones irreversibles de los marcadores sistémicos de daño orgánico (Tabla 2), también observamos que la actividad de enzimas marcadoras de daño hepático (ALT y AST) en los ratones WT se incrementó primero y de forma significativa desde fases tempranas, mientras que en el Tg-trx1 sólo se vio en las fases tardías de la sepsis.

En estudios previos se ha reportado que Trx1 es liberada extracelularmente y ejerce funciones sinérgicas con las citoquinas (Rubartelli, Bajetto et al. 1992), y que sus niveles plasmáticos se incrementan en respuesta a condiciones de inflamación y estrés oxidativo (Callister, Burke-Gaffney et al. 2006). Específicamente en la sepsis, Hofer *et al.* encontraron que los niveles plasmáticos de Trx1 se encuentran aumentados y que la administración de Trx1 recombinante promueve la sobrevida, mientras que su neutralización incrementa la mortalidad en el shock séptico (Hofer, Rosenhagen et al. 2009).

En Tg-trx1 la actividad de Trx1 se incrementó conforme avanzaba el proceso séptico; por el contrario, en el ratón WT se evidenció una reducción en la sepsis temprana. Al respecto, Yamamoto *et al* mostraron que la Trx1 endógena podría estar siendo

modificada postraduccionalmente como respuesta al estrés oxidativo, a través de la interacción con otros agentes antioxidantes como el glutatión, sufriendo así una S-glutathionilación reversible que causaría su inactivación (Yamamoto, Yang et al. 2003). Por otro lado, en la sepsis tardía, el NO exógeno o circulante podría S-nitrosilar la cisteína-69 de Trx1, lo cual estimularía su actividad (Laurent, Moore et al. 1964).

Trx1 atenúa la caída temprana en la reserva contráctil cardiaca

La depresión miocárdica es reconocida como una importante manifestación de la alteración fisiopatológica cardiovascular en la sepsis. Previa investigación han evidenciado la alteración de parámetros de funcionalidad contráctil (Vincent, Gris et al. 1992, Tao, Deyo et al. 2004) y de forma similar, hemos hallado una reducción en la PDVI y caída de la reserva contráctil en la fase temprana, tanto en ratones WT como transgénicos Tg-trx1 (Figura 21). La sobreexpresión de Trx1 logró atenuar la reducción en la respuesta al estímulo β -adrenérgico con isoproterenol.

En trabajos previos, ya se había reportado la ocurrencia de una marcada caída de la respuesta inotrópica al isoproterenol en la sepsis (Mitsui, Hamuro et al. 2002, Callister, Burke-Gaffney et al. 2006). Múltiples factores han sido señalados, pero la explicación más sugerida por los autores radica en la alteración del señalamiento río abajo de la cascada en la estimulación de los receptores β -adrenérgicos (BAR) y del flujo de calcio sarcoplásmico producida por la hiperestimulación adrenérgica desarrollada durante la sepsis. Varios estudios exhiben una liberación excesiva y sostenida de catecolaminas desde la fase temprana de la sepsis (Hahn, Wang et al. 1995, Bernardin, Strosberg et al. 1998).

En la etiopatogénesis de la disfunción miocárdica en la sepsis interactúan múltiples mecanismos (Romero-Bermejo, Ruiz-Bailen et al. , Rudiger and Singer 2007). El estado contráctil, uno de los parámetros determinantes de la función miocárdica, depende del transporte y la concentración intracelular de calcio donde participan la bomba SERCA ATPasa y su proteína reguladora fosfolamban, los receptores rianodínicos (RyR2), la reserva contráctil regulada por el señalamiento adrenérgico, y la maquinaria contráctil (miosina-actina).

Frente al estado hiperadrenérgico, el miocardio responde a través de la modulación de los receptores adrenérgicos, como mecanismo de protección, lo que afecta la función contráctil (Bernstein, Fajardo et al. , Rubartelli, Bajetto et al. 1992, de Montmollin, Aboab et al. 2009). La reserva contráctil disminuye precisamente por la alteración del señalamiento adrenérgico; la modulación se realiza por la desensibilización de los BAR ya sea por reducción en la densidad o por regulación de proteínas y kinasas del señalamiento de las proteínas G acopladas al receptor, con consecuente disminución de la actividad adenilatociclasa y reducidos niveles de AMPc (Vatner, Asai et al. 1999) lo que reduce la contractilidad y restringe el desgaste energético y la muerte celular (Chesley, Lundberg et al. 2000).

Como ya ha sido demostrado, en corazón, Trx1 reduce una gran cantidad de proteínas sarcoméricas tales como la actina y la miosina, que intervienen en la contractilidad y la dinámica energética (Fu, Wu et al. 2009). Esto supone un mejor control redox y función de los componentes proteicos que regulan el flujo de calcio, esencial para el desarrollo de la contracción miocárdica como el receptor de rianodina y la ATPasa de calcio (Reyes-Juarez and Zarain-Herzberg 2006). Un estudio realizado en un modelo de sepsis severa inducida por endotoxemia, reportó que sólo la reducción de la sensibilidad de la fibra miocárdica al Ca^{+2} contribuye a la depresión en la contractilidad cardíaca (Tavernier, Mebazaa et al. 2001). Por consiguiente, si la capacidad contráctil de los miofilamentos depende del calcio disponible localmente y de la sensibilidad al Ca^{+2} de las proteínas reguladoras, la acción reductora de Trx1 sobre las proteínas sarcoméricas y reguladoras del flujo de calcio podría estar favoreciendo una menor alteración en la movilidad intracelular del calcio y con ello la atenuación en la caída de la reserva contráctil observada a las 6 hs post LPC.

Otro factor, que podría estar involucrado en la atenuación de la caída de la reserva contráctil, podría ser la inhibición de citoquinas por parte de Trx1. MIF (factor inhibitorio de la migración de macrófagos) es una citoquina pro-inflamatoria que se ha encontrado involucrada en la disfunción contráctil, por medio de la inducción de apoptosis vía mitocondrial y la activación de kinasas como p38MAPK y JNK (Dhanantwari, Nadaraj et al. 2008), siendo su expresión y liberación inhibida por Trx1 (Ahsan, Lekli et al. 2009).

Aunado a los factores asociados a la disfunción contráctil aquí descritos, las investigaciones señalan adicionalmente otros factores como el incremento en la producción de NO y los defectos en los niveles de ATP (Watts, Kline et al. 2004) y la inhibición de los complejos mitocondriales. Los resultados aquí obtenidos no concuerdan con esos hallazgos puesto que la depresión de la función contráctil y la caída en la reserva contráctil se presentaron previos a la disfunción mitocondrial y en ausencia de una elevación en la producción de NO en el tejido cardiaco; lo que no descarta la acción de NO procedente de otras células con acción paracrina sobre el cardiomiocito.

Trx1 retarda el agotamiento del sistema de defensa antioxidante mitocondrial

La sepsis se caracteriza por el aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y citokinas inflamatorias (Galley 2011). Para contrarrestar su excesiva producción y efectos, el organismo cuenta con las defensas antioxidantes. En sepsis, así como se ha descrito el incremento de ERO también se ha descrito el agotamiento de la defensa antioxidante, dejando expuestos a los órganos al estrés oxidativo (Macdonald, Galley et al. 2003).

Trx1 es una proteína multifuncional que interactúa con otras proteínas para regenerar las proteínas dañadas por ERO, y regula diversos factores de transcripción tales como NF-kB, el cual es capaz de incrementar la expresión de genes asociados con la respuesta inmune y con sistemas antioxidantes (Hirota, Murata et al. 1999). Por tal motivo, examinamos si la sobreexpresión de Trx1 modificaba otras enzimas antioxidantes citosólicas y mitocondriales en el tejido cardiaco (catalasa, MnSOD y Trx2) por medio de la detección de diferencias en la actividad y/o expresión proteica.

A nivel citosólico, se observó que la sobreexpresión de Trx1 no previno la reducción de la actividad de la catalasa durante la progresión de la sepsis; sin embargo, a nivel mitocondrial, protegió la pérdida de actividad de la MnSOD en etapas tardías de sepsis observada en los ratones WT (Tabla 3). El mantenimiento de la actividad de MnSOD no se relacionó a modificaciones en la transcripción génica y/o la expresión proteica como se observa en las Figuras 25 y 26. Respecto a su expresión, esta observación fue

concordante con hallazgos previos de Yamamoto y col, en donde los niveles de expresión de MnSOD no evidenciaron diferencias entre un dominante negativo transgénico para Trx1 y su control no transgénico (Yamamoto, Yang et al. 2003).

En los ratones WT, el insulto séptico mostró inducir el incremento en la expresión de Trx2 (Figura 24); incluso desde un estadio temprano de la sepsis y en forma correspondiente con su progresión. En los ratones Tg-trx1 se evidenciaron mayores niveles de expresión proteica de Trx2 en condiciones basales que se mantuvieron durante la progresión de la sepsis. El descenso en la expresión de Trx2 en los ratones WT a niveles basales a las 24 hs post LPC, coincidió con la aparición de una significativa reducción en la actividad de los complejos mitocondriales y con el agotamiento de la actividad de la MnSOD.

Teniendo en cuenta que Trx2 junto con MnSOD son los mayores sistemas antioxidantes en mitocondria cardiaca, Trx2 podría estar ejerciendo una potente acción antioxidante y reguladora del estado redox, contribuyendo a la postergación del daño mitocondrial observado en Tg-trx1. En este sentido, se ha reportado previamente que Trx2 tendría un papel crucial en la detoxificación de ERO en la mitocondria y en la regulación de la apoptosis por la vía intrínseca (Tanaka, Hosoi et al. 2002); así como también, en la reducción de peroxirredoxinas mitocondriales (Hanschmann, Lonn et al. 2010).

En células endoteliales, un estudio de la función de Trx2 indicó que esta proteína es negativamente regulada en respuesta a isquemia y su reducción se correlaciona con el incremento en el estrés oxidativo (Dai, He et al. 2009).

Se puede concluir entonces que Trx1, estimula el incremento en la expresión de Trx2 y no así de MnSOD en el miocardio de ratones sépticos; logrando inclusive mantener la expresión de Trx2 durante el curso y progresión del proceso séptico.

Para evaluar el daño oxidativo inducido por la sepsis a nivel cardiaco y el potencial efecto protector de la sobreexpresión de Trx1, se determinaron los niveles de carbonilos proteicos en proteínas citosólicas y mitocondriales. Pudimos observar, como se muestra en la Figura 27, que en los ratones que sobreexpresaban Trx1 se mantuvo un nivel de oxidación proteica aproximadamente 40% menor respecto de los WT; tanto en las mitocondrias como en el citosol cardiaco. Esta protección se observó tanto en el estado

basal como durante la progresión de la sepsis, alcanzando valores máximos a las 6 hs post LPC donde el nivel de oxidación en los ratones WT fue más de un 50% mayor que en los Tg-trx1.

En ambos grupos, la oxidación proteica en mitocondria se mantuvo estable incluso durante la progresión de la sepsis. En el citosol, se incrementó en respuesta a la sepsis hacia las 24 horas post LPC, aunque sólo de forma significativa en WT.

Estos resultados indican que hay una atenuación de la oxidación proteica mediada por Trx1 tanto en mitocondria como en citosol y que por consiguiente, el sistema Trx brindaría a la mitocondria un mejor estado de preparación ante el estrés oxidativo característico del insulto séptico.

La reducción en la oxidación de proteínas ha sido demostrada previamente en sepsis, pero con el uso de Mito-Vit-E que actúa directamente en el mitocondria (Zang, Sadek et al. 2012).

Aquí observamos que ya sea de forma directa o indirecta (a través del aumento de Trx2), Trx1 brinda protección tanto en el citosol como en la mitocondria.

Trx1 no produce cambios en la expresión ni actividad de NOS

En la sepsis, se ha observado que el incremento en la producción de NO juega un papel importante en la patogénesis de la disfunción miocárdica por sepsis (Balligand, Ungureanu et al. 1993, Preiser, Zhang et al. 2001, Khadour, Panas et al. 2002). El efecto del NO se ha relacionado específicamente a una reducción en la generación de energía por parte del miocardio (Kelm, Schafer et al. 1997), y al incremento en los niveles de productos resultantes de su reacción con otras ERO, como el peroxinitrito (Escames, Lopez et al. 2007).

En contraste con hallazgos previos, en este trabajo de tesis no se observó un incremento en la expresión de eNOS así como tampoco de iNOS o nNOS. Por el contrario, se observó una reducción en la expresión de eNOS a las 6 hs post LPC (Figura 29) y no se detectó expresión transcripcional de iNOS durante ninguno de los tiempos de sepsis estudiados. En concordancia con ello, tampoco detectamos un incremento en la producción

de NO ni en los niveles de nitración proteica en el tejido cardiaco, por lo menos hasta las 18 hs post LPC.

En concordancia con nuestros resultados, van de Sandt *et al.* no observaron cambios en la transcripción génica y/o expresión proteica de las 3 isoformas de NOS en tejido cardiaco de ratones en el desarrollo de la sepsis (6 y 12 hs post LCP), pero sí de eNOS en la vasculatura coronaria (van de Sandt, Windler et al. 2013). En dicho trabajo, observaron que ratones transgénicos eNOS^{-/-} sometidos a este modelo preservaban la respuesta estimuladora a catecolaminas y tenían una mayor sobrevida respecto de animales WT. Congruentemente, se ha demostrado que la sobreexpresión de eNOS reduce la respuesta contráctil ante el estímulo β -adrenérgico (Brunner, Andrew et al. 2001).

En el corazón, eNOS, además de expresarse en las células endoteliales, también se expresa en los túbulos T cercanos al retículo sarcoplásmico, por lo que participa activamente en la contractilidad miocárdica. Así es probable entonces, que la reducción en la expresión de eNOS a las 6 hs aquí observada, sea un mecanismo compensatorio ante la alteración temprana en la respuesta inotrópica. Mecanismo que al parecer se mantuvo por mayor tiempo en los ratones WT, debido a que en este grupo la reducción en la expresión se mantuvo significativa incluso hasta las 18 horas post LPC y con unos niveles de expresión transcripcional mucho menores en comparación con Tg-Trx1.

Al igual que la eNOS, la isoforma neuronal se encuentra constitutivamente expresada en los miocitos cardiacos, hallándose localizada en el retículo sarcoplásmico junto a SERCA y a los receptores de rianodina. Varios estudios han mostrado que nNOS actúa principalmente regulando la vía β -adrenérgica, modulando así la contracción cardiaca (Zhang, Jin et al. 2014), y se le ha atribuido, asimismo, una función cardioprotectora. La evidencia en la sepsis por endotoxemia señala reducción en la expresión de nNOS en miocitos purificados (Comini, Boraso et al. 2005); y en el modelo de sepsis por ligadura y punción cecal ha mostrado no modificar su expresión (Ortiz, Garcia et al. 2014). En la presente investigación, su expresión fue apenas detectable.

Respecto a iNOS, es aceptado que en sepsis existe un significativo incremento tanto en su expresión como en su actividad y que es expresada por un amplio rango de tejidos en

respuesta a la estimulación por lipopolisacárido (Liu, Adcock et al. 1993). Sin embargo, en este trabajo observamos la expresión del ARNm de iNOS solamente en el estado basal.

Los resultados aquí obtenidos se muestran discrepantes con la fuerte evidencia del incremento en la producción de NO en la disfunción cardiaca en sepsis. Esta discrepancia podría relacionarse a diferencias en cuanto a la severidad del insulto, la respuesta inflamatoria generada y los tiempos de sepsis estudiados. Es importante tener en cuenta que el óxido nítrico produce alteraciones tanto a nivel celular como vascular. Los niveles reducidos de nitrotirosina aquí observados, fueron acompañados con una escasa alteración vascular y un escaso infiltrado leucocitario, evaluados mediante estudios histopatológicos.

Trx1 retarda y atenúa el daño en la función mitocondrial

La disfunción mitocondrial es un componente del mecanismo patogénico en la sepsis que ha sido reportado en mayor o menor grado, dependiendo de la variabilidad de los modelos de sepsis existentes y de técnicas utilizadas para el estudio del daño mitocondrial. El daño y/o disfunción mitocondrial observado en la sepsis se caracteriza por: anormalidades funcionales de la cadena respiratoria (Singer 2007, Azevedo 2010), el incremento en la producción de ERO, el agotamiento de las defensas antioxidantes (Zang, Maass et al. 2007), la pérdida de la integridad de la membrana externa, y un incremento en la fragilidad y el tamaño mitocondrial (Kozlov, Staniek et al. 2006).

En el presente trabajo, se observaron algunos cambios funcionales en las mitocondrias miocárdicas a las 6 hs post LPC principalmente en los ratones WT, en los que se evidenció una pérdida del 30% en el potencial de membrana y una reducción en la producción mitocondrial de H₂O₂, sin cambios significativos en el consumo de oxígeno tisular. En los ratones Tg-trx1, por el contrario, se mantuvieron controlados el potencial de membrana y la producción de H₂O₂, mientras que se observó un incremento significativo en el consumo de oxígeno tisular.

Estos resultados fueron coincidentes con la reducción en la contractilidad cardiaca, en la que intervienen entre otros factores la incipiente disfunción energética celular, debida al incremento de los requerimientos energéticos y del gasto cardiaco, propios del estado

hiperdinámico en el estadio temprano de la sepsis (Lang, Bagby et al. 1984, Yang, Chung et al. 2002).

En los ratones WT, estos cambios podrían ser parte de un mecanismo de respuesta compensatoria que involucraría a la mitocondria y que es desarrollada por el músculo cardiaco con el objeto de suplir la demanda metabólica interna; que por el contrario no aparecen en el grupo transgénico y por tanto nos sugiere que Trx1 se encuentra propiciando el mantenimiento de un estado energético estable conducente a la conservación de la función mitocondrial basal.

La utilización del O₂ por el tejido cardiaco se correlaciona positivamente con la tasa metabólica del mismo; por lo cual evaluamos el consumo de oxígeno tisular como una aproximación al estudio del metabolismo del O₂.

A las 6 hs, no observamos alteración en la tasa de consumo de oxígeno tisular en los ratones WT, pero si un significativo incremento en los ratones Tg-Trx1 (Figuras 31 y 32). En este contexto, la depresión contráctil en la sepsis temprana no parecería estar relacionada a cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial; así como tampoco, que el incremento en el consumo producido por la sobreexpresión de Trx1, protegiera contra la pérdida de la fuerza contráctil.

En el periodo tardío de sepsis (24 hs post LPC), nuestros datos muestran en ambos grupos una aparente invariabilidad en las tasas consumo de oxígeno total y de fuente mitocondrial respecto a los niveles normales basales, no concordante con la corriente evidencia del deterioro de la respiración mitocondrial observada en la sepsis (Fink 2001). Estos resultados pueden deberse y/o encontrarse relacionados a procesos restaurativos metabólicos durante la progresión del proceso séptico; estudios de biogénesis mitocondrial reportan que este mecanismo se asocia a una activación de la mitocondria y con ello a un incremento en el consumo de oxígeno (Nisoli, Falcone et al. 2004); por tanto, es probable que debido a la activación de la biogénesis aquí observada (Figura 42), haya una activación en el consumo de oxígeno mitocondrial. Al medir el consumo de O₂ en presencia de KCN (inhibidor de la citocromo oxidasa mitocondrial), se observó una tendencia al incremento en el consumo de oxígeno de fuente no mitocondrial. La medición del consumo tisular podría estar enmascarando un paulatino descenso significativo en el consumo de O₂

mitocondrial compatible, además, con el descenso en la actividad de los complejos mitocondriales hacia las 24 hs de sepsis. Trx1 no parece modificar estos resultados.

La disfunción mitocondrial en tejido cardiaco se observó en la fase tardía de la sepsis, evidenciándose a partir de las 18 hs con la aparición de la inhibición de la actividad de todos los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. La sobreexpresión de Trx1 atenúa y retrasa la pérdida de actividad en el complejo I.

Otros estudios en mitocondrias cardiacas en el modelo de sepsis por LPC, han mostrado similares hallazgos con la observación de una reducción de la actividad de la citocromo oxidasa y del consumo de oxígeno en sepsis severa después de las 24 hs (Groening, Huang et al. 2011) e incluso 48 hs post LPC (Zang, Martinez et al. 2012).

La disfunción mitocondrial en el tejido cardiaco se presenta en la etapa tardía de la sepsis, a diferencia de otros tejidos en los cuales el deterioro mitocondrial se observa más tempranamente. Por ejemplo, en el músculo esquelético la reducción significativa en la actividad del complejo II-III se ha observado a las 12 hs post LPC (Peruchi, Petronilho et al. 2011) al igual que el incremento en la producción de H_2O_2 y reducción en el consumo de oxígeno mitocondrial (Llesuy, Evelson et al. 1994); y en hígado, la reducción en el consumo de oxígeno se ha visto tan temprano como a las 6 hs (Carchman, Whelan et al. 2013), con reducción en el control respiratorio (Boczkowski, Lisdero et al. 1999) y la actividad de complejos mitocondriales (Gonzalez, Elguero et al. 2014). En estos tejidos, la inducción de la iNOS y la producción de altos niveles de NO y de peroxinitrito se han relacionado con la disfunción mitocondrial observada, la nitración del complejo I mitocondrial y su correlato con la disfunción orgánica.

En concordancia con la teoría Mitcheliana, el desacoplamiento o pérdida del potencial de membrana mitocondrial inhibe la producción de superóxido y H_2O_2 en cardiomiocitos (Wheeler) (Korshunov, Skulachev et al. 1997), tal como se puede evidenciar en este trabajo. Sin embargo, la reducción en el potencial de membrana mitocondrial aquí observado podría deberse a dos mecanismos; primero, por un mecanismo de respuesta al estímulo β -adrenérgico que ligeramente disipa la fuerza protón-motriz junto a una aceleración del flujo de electrones y a un incremento del consumo de O_2 (Nickel, Loffler et al. 2013); o segundo, por un mecanismo de disipación del $\Delta\psi_m$, mediado por la activación

de canales de la membrana interna mitocondrial inducido por ERO (Zorov, Filburn et al. 2000), o quizás por un ligero desacoplamiento inducido por la actividad de proteínas desacoplantes, especialmente UCP2. Sin embargo, no hemos encontrado incrementos en el ARNm de UCP2 o UCP3 (Figura 34), por tanto nuestros resultados sugieren un desacoplamiento que podría estar relacionado con la prolongada estimulación β -adrenérgica. De forma similar, otros autores han evidenciado desacoplamiento sin detectar la expresión de UCP2 en sepsis polimicrobiana, y sólo aumentos en el ARNm de UCP2 a las 12 hs en relación a sus respectivos controles (Roshon, Kline et al. 2003).

UCP2 es una proteína transportadora mitocondrial que regula la producción de ATP catalizando la tanslocación de protones a través de la membrana mitocondrial lo que reduce la fuerza protón-motriz. Se ha reportado que la expresión de UCP2 es regulada a nivel traduccional y por tanto los niveles de proteína y ARNm no son sinónimos; por lo cual el desacoplamiento podría estar mediado por la activación de UCPs independientemente de los cambios en los niveles de expresión (Boudina, Sena et al. 2007).

El repentino incremento en los niveles de expresión de ARNm visto en Tg-Trx1 a las 24 hs podría ser un mecanismo cardioprotector, ya que se ha hallado que altos niveles de UCP2 mejoran la oxidación de ácidos grasos en corazones con deficiencia respiratoria, resultando en una prolongación del tiempo de sobrevida, y aparición retardada de signos de cardiomiopatía mitocondrial y mayor esperanza de vida, tal como lo han sugerido recientes evidencias en sobreexpresión de UCP2 (Kukat, Dogan et al. 2014).

Como conclusión acerca de los hallazgos de la función mitocondrial y su análisis, creemos que en la disfunción miocárdica séptica, el consumo de oxígeno, el desacoplamiento mitocondrial, la reducción en la producción de H_2O_2 y la expresión y actividad de las óxido nítrico sintasas, en primera instancia podrían representar una respuesta adaptativa y/o compensatoria del corazón ante el insulto séptico. Posteriormente, y debido al agotamiento de la defensa antioxidante en el estado tardío de la sepsis, comienza a aparecer la disfunción mitocondrial con la alteración de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria. Trx1 parece mostrar un efecto controlador sobre estos mecanismos, logrando atenuar la disfunción mitocondrial asociada a los defectos estructurales en la mitocondria, como se expondrá más adelante.

Apoptosis y autofagia

La apoptosis es un proceso de muerte celular que ocurre en varios órganos durante la sepsis. Tanto en modelos de sepsis por LPS como por LPC, se ha observado una incrementada apoptosis en cardiomiocitos, evaluada a través de diferentes métodos como el TUNEL (Ha, Hua et al. 2006) y la medición de Anexina V (Wang, Qin et al. 2014). La apoptosis es desencadenada por estrés oxidativo y nitrosativo, como efecto directo del peroxinitrito (Ahmad, Rasheed et al. 2009). Sin embargo, juega un papel menor en la disfunción miocárdica séptica debido a su naturaleza reversible.

Para examinar la acción protectora de Trx1 sobre la apoptosis, utilizamos el método del TUNEL. Ni en ratones transgénicos ni en WT se observó la presencia de apoptosis, así como tampoco una reducción significativa de citocromo *c* en la fracción mitocondrial (Figura 33).

Este hallazgo podría explicarse por la ausencia de factores desencadenantes de la apoptosis como lo es el incremento de NO y de sus efectos citotóxicos o por una inhibición de la vía de señalización apoptótica, debido a la activación temprana de la autofagia, como mecanismo para reciclar mitocondrias dañadas y compensar la creciente demanda energética mitocondrial necesaria para la adecuada funcionalidad contráctil (Nishida, Kyoj et al. 2009). La autofagia es un mecanismo de degradación y reciclado de macromoléculas y organelas como las mitocondrias. Mediante microscopía electrónica observamos la presencia de autofagia tanto en el grupo WT como en el Tg-trx1 (Figura 37), compatible con previos reportes en modelos de sepsis por LPC. Estudios recientes han mostrado el incremento de autofagia incluso en otros órganos como hígado y pulmones durante el desarrollo de la sepsis (Chien, Chen et al. 2011). Este proceso de autofagia o específicamente mitofagia en sepsis, se mostró como un mecanismo de remoción y reemplazo de mitocondrias dañadas, tal como ha sido manifestado anteriormente por otros autores (Carchman, Whelan et al. 2013). Sin embargo, este proceso se observó parcialmente en algunos fragmentos de los cortes de tejido evaluados que contenían mitocondrias defectuosas o restos de éstas. Además, la autofagia podría contribuir a la

reducción de la producción de ERO tal como observamos a las 6 hs, coincidiendo con estudios que demuestran que este mecanismo protege contra el estrés oxidativo (Hickson-Bick, Jones et al. 2008)

La formación de autofagosomas fue ensayada por la evaluación de la conversión LC3I a LC3II. Durante la autofagia LC3I es procesada y reclutada al autofagosoma donde se genera LC3II por proteólisis y lipidación cerca de su extremo C-terminal. En este trabajo, observamos un rápido incremento en los niveles de LC3II (forma conjugada con fosfatidiletanolamina) a partir de las 6 hs post LCP en los animales transgénicos y a las 18 hs en los animales WT (Figura 38).

Interesantemente, se observó también la formación de gotas lipídicas a las 24 hs post LPC en los corazones de ambos grupos (Figura 35). En este sentido, se conoce que aproximadamente el 70 % del ATP cardiaco es producido por oxidación lipídica, mientras que el resto es producido primariamente por oxidación de glucosa. La sepsis se caracteriza por alteraciones en la β -oxidación de ácidos grasos y en la conversión de los ácidos grasos no oxidados a triglicéridos, que resulta en la acumulación intracelular de lípidos. Asimismo, la reducción en la oxidación de ácidos grasos no puede ser totalmente compensada por el aumento del catabolismo de la glucosa para la producción cardiaca de ATP, debido a resistencia a la insulina y supresión de la utilización de glucosa (Drosatos, Lymperopoulos et al. 2015). Por otra parte, la aparición de gotas lipídicas en el miocardio podría deberse a un cambio del flujo metabólico de la fosforilación oxidativa a la glucólisis en respuesta al estrés oxidativo. Sería un intento de combatir el estímulo nocivo, ahorrando recursos en las gotas para la generación de energía celular y la reducción de la biosíntesis anabólica (Lee, Zhang et al. 2013).

Dinámica y biogénesis mitocondrial

Con el objeto de evaluar el efecto de Trx1 sobre los cambios en la dinámica mitocondrial en el miocardio, se determinaron los niveles de expresión de proteínas de fusión y fisión mediante RT-PCR cuantificada y/o Western blot. Los resultados mostraron un ligero descenso a las 6 hs en los niveles de ARNm de Mfn2, sin cambios significativos

durante la progresión de la sepsis (Figura 39). Opa1 mostró una temprana disminución en la expresión proteica que sólo fue significativa en los WT, y una reducción en los niveles de ARNm en la sepsis tardía en ambos grupos (Figura 40). Esta reducción en las proteínas de fusión coincidió con los hallazgos microscópicos (Figuras 34 y 35). La ligera reducción en la expresión de Mfn2 podría contribuir junto a la activación de la autofagia al apagamiento de la señal de apoptosis. Datos recientes, señalan que la Mfn2 participa en la vía intrínseca de la muerte celular apoptótica, debido a que actúa como receptor de Bax. La menor expresión de Mfn2 reduciría los sitios de unión de Bax a la mitocondria lo que indicaría la reducción del estímulo pro-apoptótico (Hall, Burke et al. 2014). El aumento en el área mitocondrial determinado a las 6 hs en ambos grupos junto a las alteraciones en la membrana interna tales como la disrupción en las crestas, fueron coincidentes con los cambios vistos en Opa1. En este sentido, a las 6 hs, en Tg-Trx1 la disrupción de las crestas mitocondriales resultó 8% menor y a las 24 hs fue significativamente menor que en los ratones WT (Tabla 6).

El hallazgo de una menor fosforilación de Drp1 en Ser⁶¹⁶ a las 24 hs en ratones Tg-trx1, denotó una menor activación de Drp1 o reclutamiento mitocondrial y por tanto menor división mitocondrial en el grupo transgénico (Figura 41). Opuesto a ello, en ratones WT se observó activación del proceso de fragmentación mitocondrial dado el aumento significativo en la fosforilación de Drp1 en Ser⁶¹⁶ a las 24 hs junto a inhibición de la fusión mitocondrial. La determinación del área mitocondrial a las 24 hs en ratones WT, dio cuenta de una reducción respecto al sham, que no se vió en Tg-trx1 (Figura 36).

Estos datos muestran que durante la progresión de la sepsis, en el miocardio ocurre un desbalance en la dinámica mitocondrial influenciando cambios en la morfología mitocondrial y en su función reguladora de la apoptosis. El proceso de activación temprana de la autofagia podría ser un mecanismo compensatorio ante el progresivo daño mitocondrial y ante la ausencia de la activación oportuna del mecanismo de biogénesis mitocondrial en WT. La sobreexpresión de Trx1 evidenció modular los cambios en la dinámica mitocondrial y con ello atenuar y retardar el daño morfológico o ultraestructural en la sepsis.

En nuestro análisis no se observó una atenuación o restauración de la actividad de los complejos mitocondriales paralela a los cambios en la dinámica y la activación del proceso de biogénesis mitocondrial coincidiendo con los resultados de Vanasco y col. (Vanasco, Saez et al. 2014)

Respecto al proceso de biogénesis mitocondrial, Trx1 promovió su activación de manera significativa a las 24 hs, concordante con los cambios observados en las proteínas moduladoras de la dinámica mitocondrial y en paralelo a la prolongación del tiempo de sobrevida.

Trx1 regula la expresión de una gran cantidad de genes, unos de forma positiva y otros de forma negativa. Dentro de los 50 genes mayormente regulados en forma positiva por Trx1 está PGC1- α , que es un coactivador transcripcional que participa en la regulación del proceso de biogénesis mitocondrial e incrementa la expresión de NRF1 y la actividad transcripcional de NRF1 y NRF2 (Ago, Yeh et al. 2006). A su vez, PGC-1 α se asocia con el incremento en la expresión de otros antioxidantes como UCP2, Prx3, Prx5, Trx2, TrxR2, catalasa, MnSOD, y GPx-1 (Bernstein, Fajardo et al.), así como también con la regulación positiva en la expresión de Mfn2 (Liesa, Borda-d'Agua et al. 2008). En este sentido, pudimos observar que el grupo Tg-trx1 no séptico, presentó un nivel de ARNm de PGC1- α 50% mayor en comparación con el WT. A su vez, una mayor expresión proteica de Trx2 fue observada en la mitocondria de ratones Tg-trx1, siendo éste el primer reporte confirmatorio que Trx1 promueve también la expresión de su isoforma mitocondrial.

A las 6 hs post LPC se observó una reducción en el nivel de ARNm de PGC-1 α , en el tejido miocárdico de ambos grupos, que fue revertida de forma significativa sólo en los animales Tg-trx1, mostrando un incremento progresivo en la sepsis tardía. Similares resultados había reportado nuestro laboratorio en hígado de rata (Gonzalez, Elguero et al. 2014), evidenciando que en corazón al igual que en hígado la biogénesis es un proceso que no se activa antes de las 24 hs de sepsis. La caída en la expresión de PGC-1 α a las 6 hs fue concordante con la ligera reducción en la expresión de Mfn2 en ambos grupos.

La reducción en los niveles de expresión de PGC-1 α se encuentra asociada: a cambios en el metabolismo miocárdico tales como la conversión de un metabolismo

oxidativo de ácidos grasos hacia procesos glucolíticos (Sano and Schneider 2005), característicos del proceso séptico.

En el presente trabajo podemos entonces afirmar que en la sepsis temprana existe una relación entre los procesos de dinámica y biogénesis mitocondrial y la reducción de la respuesta ante la estimulación β -adrenérgica y la función contráctil. Como señalamos anteriormente, ésta podría ser causada por la alteración en las cascadas de señalización y la movilización intracelular del calcio y no por pérdida de la masa mitocondrial.

Los bajos porcentajes de daño estructural y la ausencia de disfunción mitocondrial a las 6 hs post LPC, sumados a una temprana activación de la autofagia no argumentan a favor de una reducción considerable de la población mitocondrial.

La sobreexpresión de Trx1 mostró un efecto atenuador de estas alteraciones asociado con el mejoramiento en la sobrevida.

Conclusiones

En la presente Tesis se analizaron los efectos de Trx1 en el miocardio de ratones sépticos, específicamente sobre la disfunción contráctil y la disfunción mitocondrial cardíaca.

El presente trabajo mostró que en la fase temprana de sepsis, se presentan alteraciones iniciales en la morfología mitocondrial, activación de la autofagia principalmente de mitocondrias – mitofagia -, disminución de proteínas involucradas en la dinámica y biogénesis mitocondrial y caída en la función contráctil cardíaca no relacionada a disfunción mitocondrial, sino muy posiblemente a alteraciones en la movilidad del calcio y modificación en la expresión de proteínas participantes en la dinámica mitocondrial. La aparición del estrés oxidativo y de sus efectos sobre la función mitocondrial ocurre durante la fase tardía de la sepsis, después de 18 horas post LPC.

Los resultados evidenciaron que:

- La sobreexpresión de Trx1 en el tejido cardíaco prolonga el tiempo de supervivencia en la sepsis.
- Trx1 atenúa la caída en la contractilidad miocárdica como respuesta ante la estimulación β -adrenérgica o reserva contráctil, característica de la fase temprana de la sepsis, que podría deberse a la alteración en las cascadas de señalización y a la alteración en la movilidad del calcio y no por la pérdida de la función mitocondrial.
- En la sepsis tardía, Trx1 retrasa el agotamiento de la defensa antioxidante mitocondrial, reduciendo la pérdida de actividad del complejo I mitocondrial y el potencial de membrana, y además reduciendo el porcentaje de mitocondrias con alteraciones morfológicas.
- En concordancia con la progresión del daño mitocondrial, la autofagia se mostró como un mecanismo compensatorio involucrado en el proceso de reciclaje de mitocondrias

defectuosas. La sobreexpresión de Trx1 activó significativamente y de forma anticipada este proceso, reduciendo el porcentaje de mitocondrias con alteraciones tanto en la membrana interna como externa.

- Trx1 previene parcialmente las alteraciones en la dinámica mitocondrial y con ello sus efectos sobre la ultraestructura mitocondrial; y activa de forma significativa el mecanismo de biogénesis mitocondrial.

Los resultados de esta investigación ofrecen evidencia científica base que sugiere la evaluación del uso de Trx1 en ensayos clínicos, como una potencial terapia antioxidante en sepsis, focalizada en sus efectos en la amortiguación del estrés oxidativo, del daño en las vías de señalización adrenérgica, y el retardo de la disfunción mitocondrial, la disfunción miocárdica séptica y la mortalidad. Ya sea, por manipulación de la expresión del gen de Trx1 endógena a través de terapia génica o por administración exógena de Trx1 recombinante.

Un resultado interesante de la presente investigación, es la atenuación de la caída en la respuesta ante el estímulo β -adrenérgico, sobre todo porque desde el punto de vista clínico la reducción en la reserva contráctil cardiaca está relacionada a un peor pronóstico en el paciente séptico (Kimmoun, Ducrocq et al. 2013).

Por tanto, consideramos que como un siguiente paso ante el hallazgo de efectos benéficos de Trx1 sobre la disfunción contráctil por sepsis, es necesario investigar en forma específica los factores y mecanismos por medio de los cuales Trx1 atenúa la caída en la reserva contráctil, teniendo en cuenta todos los elementos y vías involucrados en la respuesta ante el estímulo adrenérgico. Los factores en los que Trx1 puede estar interviniendo y que tendrían que evaluarse serían: la expresión y modificación post transcripcional de la vía de señalamiento río abajo de la cascada en la estimulación de BAR; los niveles de catecolaminas endógenas que generalmente se elevan durante la sepsis y que puede estar modulando Trx1; el flujo de calcio a nivel intracelular, y el estado redox y de fosforilación de los canales participantes.

Referencias Bibliográficas

Ago, T., I. Yeh, M. Yamamoto, M. Schinke-Braun, J. A. Brown, B. Tian and J. Sadoshima (2006). "Thioredoxin1 upregulates mitochondrial proteins related to oxidative phosphorylation and TCA cycle in the heart." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1635-1650.

Ahsan, M. K., I. Lekli, D. Ray, J. Yodoi and D. K. Das (2009). "Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2741-2758.

Andresen, M. and T. Regueira (2010). "[Myocardial dysfunction in sepsis]." Rev Med Chil **138**(7): 888-896.

Ashrafian, H., L. Docherty, V. Leo, C. Towlson, M. Neilan, V. Steeples, C. A. Lygate, T. Hough, S. Townsend, D. Williams, S. Wells, D. Norris, S. Glyn-Jones, J. Land, I. Barbaric, Z. Lalanne, P. Denny, D. Szumska, S. Bhattacharya, J. L. Griffin, I. Hargreaves, N. Fernandez-Fuentes, M. Cheeseman, H. Watkins and T. N. Dear (2010). "A mutation in the mitochondrial fission gene Dnm1l leads to cardiomyopathy." PLoS Genet **6**(6): e1001000.

Atefi, G., F. S. Zetoune, T. J. Herron, J. Jalife, M. Bosmann, R. Al-Aref, J. V. Sarma and P. A. Ward "Complement dependency of cardiomyocyte release of mediators during sepsis." Faseb J **25**(7): 2500-2508.

Azevedo, L. C. (2010). "Mitochondrial dysfunction during sepsis." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **10**(3): 214-223.

Balligand, J. L., D. Ungureanu, R. A. Kelly, L. Kobzik, D. Pimental, T. Michel and T. W. Smith (1993). "Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium." J Clin Invest **91**(5): 2314-2319.

Baumgart, K., V. Simkova, F. Wagner, S. Weber, M. Georgieff, P. Radermacher, G. Albuszies and E. Barth (2009). "Effect of SOD-1 over-expression on myocardial function during resuscitated murine septic shock." Intensive Care Med **35**(2): 344-349.

Bergmann, O., R. D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabe-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B. A. Buchholz, H. Druid, S. Jovinge and J. Frisen (2009). "Evidence for cardiomyocyte renewal in humans." Science **324**(5923): 98-102.

Bernardi, P. and S. von Stockum (2012). "The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question." Cell Calcium **52**(1): 22-27.

Bernardin, G., A. D. Strosberg, A. Bernard, M. Mattei and S. Marullo (1998). "Beta-adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylate cyclase is impaired during severe sepsis in humans." Intensive Care Med **24**(12): 1315-1322.

Berndt, C., C. H. Lillig and A. Holmgren (2007). "Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(3): H1227-1236.

Bernstein, D., G. Fajardo and M. Zhao "THE ROLE OF beta-ADRENERGIC RECEPTORS IN HEART FAILURE: DIFFERENTIAL REGULATION OF CARDIOTOXICITY AND CARDIOPROTECTION." Prog Pediatr Cardiol **31**(1): 35-38.

Boczkowski, J., C. L. Lisdero, S. Lanone, A. Samb, M. C. Carreras, A. Boveris, M. Aubier and J. J. Poderoso (1999). "Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia." FASEB J **13**(12): 1637-1646.

Boudina, S., S. Sena, H. Theobald, X. Sheng, J. J. Wright, X. X. Hu, S. Aziz, J. I. Johnson, H. Bugger, V. G. Zaha and E. D. Abel (2007). "Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins." Diabetes **56**(10): 2457-2466.

Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein and W. J. Sibbald (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." Chest **101**(6): 1644-1655.

Boudina, S. and E. D. Abel (2006). "Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes." Physiology (Bethesda) **21**: 250-258.

Boveris, A. (1984). "Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria." Methods Enzymol **105**: 429-435.

Brunner, F., P. Andrew, G. Wolkart, R. Zechner and B. Mayer (2001). "Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase." Circulation **104**(25): 3097-3102.

Byrne, J. A., D. J. Grieve, J. K. Bendall, J. M. Li, C. Gove, J. D. Lambeth, A. C. Cave and A. M. Shah (2003). "Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy." Circ Res **93**(9): 802-805.

Cadenas, E., A. Boveris, C. I. Ragan and A. O. Stoppani (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." Arch Biochem Biophys **180**(2): 248-257.

Callister, M. E., A. Burke-Gaffney, G. J. Quinlan, A. G. Nicholson, R. Florio, H. Nakamura, J. Yodoi and T. W. Evans (2006). "Extracellular thioredoxin levels are increased in patients with acute lung injury." Thorax **61**(6): 521-527.

Carchman, E. H., S. Whelan, P. Loughran, K. Mollen, S. Stratamirovic, S. Shiva, M. R. Rosengart and B. S. Zuckerbraun (2013). "Experimental sepsis-induced mitochondrial

biogenesis is dependent on autophagy, TLR4, and TLR9 signaling in liver." FASEB J **27**(12): 4703-4711.

Ceylan-Isik, A. F., P. Zhao, B. Zhang, X. Xiao, G. Su and J. Ren (2010). "Cardiac overexpression of metallothionein rescues cardiac contractile dysfunction and endoplasmic reticulum stress but not autophagy in sepsis." J Mol Cell Cardiol **48**(2): 367-378.

Chen, H., S. A. Detmer, A. J. Ewald, E. E. Griffin, S. E. Fraser and D. C. Chan (2003). "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development." J Cell Biol **160**(2): 189-200.

Chen, L., Q. Gong, J. P. Stice and A. A. Knowlton (2009). "Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure." Cardiovasc Res **84**(1): 91-99.

Chesley, A., M. S. Lundberg, T. Asai, R. P. Xiao, S. Ohtani, E. G. Lakatta and M. T. Crow (2000). "The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase." Circ Res **87**(12): 1172-1179.

Chien, W. S., Y. H. Chen, P. C. Chiang, H. W. Hsiao, S. M. Chuang, S. I. Lue and C. Hsu (2011). "Suppression of autophagy in rat liver at late stage of polymicrobial sepsis." Shock **35**(5): 506-511.

Comini, L., A. Boraso, T. Bachetti, P. Bernocchi, E. Pasini, D. Bastianon, S. Curello, C. M. Terracciano, C. Ceconi and R. Ferrari (2005). "Effects of endotoxic shock on neuronal NOS and calcium transients in rat cardiac myocytes." Pharmacol Res **51**(5): 409-417.

Cohen, G., D. Dembiec and J. Marcus (1970). "Measurement of catalase activity in tissue extracts." Anal Biochem **34**: 30-38.

Crouser, E. D. (2004). "Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome." Mitochondrion **4**(5-6): 729-741.

Dai, S., Y. He, H. Zhang, L. Yu, T. Wan, Z. Xu, D. Jones, H. Chen and W. Min (2009). "Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin promotes ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(4): 495-502.

Dare, A. J., A. R. Phillips, A. J. Hickey, A. Mittal, B. Loveday, N. Thompson and J. A. Windsor (2009). "A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome." Free Radic Biol Med **47**(11): 1517-1525.

de Montmollin, E., J. Aboab, A. Mansart and D. Annane (2009). "Bench-to-bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis." Crit Care **13**(5): 230.

Dhanantwari, P., S. Nadaraj, A. Kenessey, D. Chowdhury, Y. Al-Abed, E. J. Miller and K. Ojamaa (2008). "Macrophage migration inhibitory factor induces cardiomyocyte apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **371**(2): 298-303.

Dorn, G. W., 2nd (2013). "Mitochondrial dynamics in heart disease." Biochim Biophys Acta **1833**(1): 233-241.

Drosatos, K., A. Lympelopoulou, P. J. Kennel, N. Pollak, P. C. Schulze and I. J. Goldberg (2015). "Pathophysiology of sepsis-related cardiac dysfunction: driven by inflammation, energy mismanagement, or both?" Curr Heart Fail Rep **12**(2): 130-140.

Escames, G., L. C. Lopez, F. Ortiz, A. Lopez, J. A. Garcia, E. Ros and D. Acuna-Castroviejo (2007). "Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice." FEBS J **274**(8): 2135-2147.

Fink, M. P. (2001). "Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis." Crit Care Clin **17**(1): 219-237.

Flierl, M. A., D. Rittirsch, M. S. Huber-Lang, J. V. Sarma and P. A. Ward (2008). "Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis." Mol Med **14**(5-6): 327-336.

Flynn, A., B. Chokkalingam Mani and P. J. Mather (1007). "Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms." Heart Fail Rev **15**(6): 605-611.

Fu, C., C. Wu, T. Liu, T. Ago, P. Zhai, J. Sadoshima and H. Li (2009). "Elucidation of thioredoxin target protein networks in mouse." Mol Cell Proteomics **8**(7): 1674-1687.

Gonzalez, A. S., M. E. Elguero, P. Finocchietto, S. Holod, L. Romorini, S. G. Miriuka, J. G. Peralta, J. J. Poderoso and M. C. Carreras (2014). "Abnormal mitochondrial fusion-fission balance contributes to the progression of experimental sepsis." Free Radic Res **48**(7): 769-783.

Galley, H. F. "Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis." Crit Care **14**(4): 230.

Galley, H. F. (2011). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis." Br J Anaesth **107**(1): 57-64.

Gonzalez, A. S., M. E. Elguero, P. Finocchietto, S. Holod, L. Romorini, S. G. Miriuka, J. G. Peralta, J. J. Poderoso and M. C. Carreras (2014). "Abnormal mitochondrial fusion-fission balance contributes to the progression of experimental sepsis." Free Radic Res **48**(7): 769-783.

Groening, P., Z. Huang, E. F. La Gamma and R. J. Levy (2011). "Glutamine restores myocardial cytochrome C oxidase activity and improves cardiac function during experimental sepsis." JPEN J Parenter Enteral Nutr **35**(2): 249-254.

Guyton, A. H., JE. (2006). Heart muscle; the heart as a pump and function of the heart valves. Textbook of medical physiology. Philadelphia, Elsevier: 109 - 114.

Ha, T., F. Hua, D. Grant, Y. Xia, J. Ma, X. Gao, J. Kelley, D. L. Williams, J. Kalbfleisch, I. W. Browder, R. L. Kao and C. Li (2006). "Glucan phosphate attenuates cardiac dysfunction and inhibits cardiac MIF expression and apoptosis in septic mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(4): H1910-1918.

Hahn, P. Y., P. Wang, S. M. Tait, Z. F. Ba, S. S. Reich and I. H. Chaudry (1995). "Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis." Shock **4**(4): 269-273.

Hall, A. R., N. Burke, R. K. Dongworth and D. J. Hausenloy (2014). "Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease." Br J Pharmacol **171**(8): 1890-1906.

Hamacher-Brady, A., N. R. Brady and R. A. Gottlieb (2006). "Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes." J Biol Chem **281**(40): 29776-29787.

Hanschmann, E. M., M. E. Lonn, L. D. Schutte, M. Funke, J. R. Godoy, S. Eitner, C. Hudemann and C. H. Lillig (2010). "Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3." J Biol Chem **285**(52): 40699-40705.

Hickson-Bick, D. L., C. Jones and L. M. Buja (2008). "Stimulation of mitochondrial biogenesis and autophagy by lipopolysaccharide in the neonatal rat cardiomyocyte protects against programmed cell death." J Mol Cell Cardiol **44**(2): 411-418.

Hirota, K., M. Murata, Y. Sachi, H. Nakamura, J. Takeuchi, K. Mori and J. Yodoi (1999). "Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB." J Biol Chem **274**(39): 27891-27897.

Herbertson, M. J., H. A. Werner and K. R. Walley (1996). "Nitric oxide synthase inhibition partially prevents decreased LV contractility during endotoxemia." Am J Physiol **270**(6 Pt 2): H1979-1984.

Hofer, S., C. Rosenhagen, H. Nakamura, J. Yodoi, C. Bopp, J. B. Zimmermann, M. Goebel, P. Schemmer, K. Hoffmann, K. Schulze-Osthoff, R. Breitkreutz and M. A. Weigand (2009). "Thioredoxin in human and experimental sepsis." Crit Care Med **37**(7): 2155-2159.

Holmgren, A. and J. Lu "Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease." Biochem Biophys Res Commun **396**(1): 120-124.

Holmgren, A., B. O. Soderberg, H. Eklund and C. I. Branden (1975). "Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(6): 2305-2309.

Hsieh, C. H., P. Y. Pai, H. W. Hsueh, S. S. Yuan and Y. C. Hsieh (2011). "Complete induction of autophagy is essential for cardioprotection in sepsis." Ann Surg **253**(6): 1190-1200.

Huet, O., L. Dupic, A. Harrois and J. Duranteau "Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis." Front Biosci **16**: 1986-1995.

Hunter, J. D. and M. Doddi (2010). "Sepsis and the heart." Br J Anaesth **104**(1): 3-11.
Ishiwata, T., F. Guo, Z. Naito, G. Asano and R. Nishigaki (1997). "Differential distribution of eNOS and iNOS mRNA in rat heart after endotoxin administration." Jpn Heart J **38**(3): 445-455.

Iwata, A., R. A. de Claro, V. L. Morgan-Stevenson, J. C. Tupper, B. R. Schwartz, L. Liu, X. Zhu, K. C. Jordan, R. K. Winn and J. M. Harlan "Extracellular administration of BCL2 protein reduces apoptosis and improves survival in a murine model of sepsis." PLoS One **6**(2): e14729.

Joulin, O., P. Petillot, M. Labalette, S. Lancel and R. Neviere (2007). "Cytokine profile of human septic shock serum inducing cardiomyocyte contractile dysfunction." Physiol Res **56**(3): 291-297.

Katti, S. K., D. M. LeMaster and H. Eklund (1990). "Crystal structure of thioredoxin from Escherichia coli at 1.68 Å resolution." J Mol Biol **212**(1): 167-184.

Kelm, M., S. Schafer, R. Dahmann, B. Dolu, S. Perings, U. K. Decking, J. Schrader and B. E. Strauer (1997). "Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation." Cardiovasc Res **36**(2): 185-194.

Khadour, F. H., D. Panas, P. Ferdinandy, C. Schulze, T. Csont, M. M. Lalu, S. M. Wildhirt and R. Schulz (2002). "Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(3): H1108-1115.

Kimmoun, A., N. Ducrocq, S. Mory, R. Delfosse, L. Muller, P. Perez, R. Fay and B. Levy (2013). "Cardiac contractile reserve parameters are related to prognosis in septic shock." Biomed Res Int **2013**: 930673.

Kobayashi-Miura, M., K. Shioji, Y. Hoshino, H. Masutani, H. Nakamura and J. Yodoi (2007). "Oxygen sensing and redox signaling: the role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2040-2050.

Kojda, G. and K. Kottenberg (1999). "Regulation of basal myocardial function by NO." Cardiovasc Res **41**(3): 514-523.

Korshunov, S. S., V. P. Skulachev and A. A. Starkov (1997). "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria." FEBS Lett **416**(1): 15-18.

Kostin, S., L. Pool, A. Elsasser, S. Hein, H. C. Drexler, E. Arnon, Y. Hayakawa, R. Zimmermann, E. Bauer, W. P. Klovekorn and J. Schaper (2003). "Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts." Circ Res **92**(7): 715-724.

Kozlov, A. V., K. Staniek, S. Haindl, C. Piskernik, W. Ohlinger, L. Gille, H. Nohl, S. Bahrami and H. Redl (2006). "Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(3): G543-549.

Kroemer, G., G. Marino and B. Levine (2010). "Autophagy and the integrated stress response." Mol Cell **40**(2): 280-293.

Kukat, A., S. A. Dogan, D. Edgar, A. Mourier, C. Jacoby, P. Maiti, J. Mauer, C. Becker, K. Senft, R. Wibom, A. P. Kudin, K. Hultenby, U. Flogel, S. Rosenkranz, D. Ricquier, W. S. Kunz and A. Trifunovic (2014). "Loss of UCP2 attenuates mitochondrial dysfunction without altering ROS production and uncoupling activity." PLoS Genet **10**(6): e1004385.

Lang, C. H., G. J. Bagby, J. L. Ferguson and J. J. Spitzer (1984). "Cardiac output and redistribution of organ blood flow in hypermetabolic sepsis." Am J Physiol **246**(3 Pt 2): R331-337.

Lambert, A. J. and M. D. Brand (2004). "Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane." Biochem J **382**(Pt 2): 511-517.

Laurent, T. C., E. C. Moore and P. Reichard (1964). "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B." J Biol Chem **239**: 3436-3444.

Lee, S. J., J. Zhang, A. M. Choi and H. P. Kim (2013). "Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress." Oxid Med Cell Longev **2013**: 327167.

Lehman, J. J., P. M. Barger, A. Kovacs, J. E. Saffitz, D. M. Medeiros and D. P. Kelly (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis." J Clin Invest **106**(7): 847-856.

Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent and G. Ramsay (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med **31**(4): 1250-1256.

Li, H., A. Wan, G. Xu and D. Ye (2013). "Small changes huge impact: the role of thioredoxin 1 in the regulation of apoptosis by S-nitrosylation." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **45**(3): 153-161.

Liang, H. L. and M. T. Wong-Riley (2006). "Activity-dependent regulation of nuclear respiratory factor-1, nuclear respiratory factor-2, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 in neurons." Neuroreport **17**(4): 401-405.

Liesa, M., B. Borda-d'Agua, G. Medina-Gomez, C. J. Lelliott, J. C. Paz, M. Rojo, M. Palacin, A. Vidal-Puig and A. Zorzano (2008). "Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta." PLoS One **3**(10): e3613.

Liu, S., I. M. Adcock, R. W. Old, P. J. Barnes and T. W. Evans (1993). "Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA." Biochem Biophys Res Commun **196**(3): 1208-1213.

Llesuy, S., P. Evelson, B. Gonzalez-Flecha, J. Peralta, M. C. Carreras, J. J. Poderoso and A. Boveris (1994). "Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome." Free Radic Biol Med **16**(4): 445-451.

Lopaschuk, G. D., J. R. Ussher, C. D. Folmes, J. S. Jaswal and W. C. Stanley (2010). "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease." Physiol Rev **90**(1): 207-258.
Lowes, D. A. and H. F. Galley (2011). "Mitochondrial protection by the thioredoxin-2 and glutathione systems in an in vitro endothelial model of sepsis." Biochem J **436**(1): 123-132.

Lowes, D. A. and H. F. Galley (2011). "Mitochondrial protection by the thioredoxin-2 and glutathione systems in an in vitro endothelial model of sepsis." Biochem J **436**(1): 123-132.

MacCarthy, P. A., D. J. Grieve, J. M. Li, C. Dunster, F. J. Kelly and A. M. Shah (2001). "Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy: role of reactive oxygen species and NADPH oxidase." Circulation **104**(24): 2967-2974.

Macdonald, J., H. F. Galley and N. R. Webster (2003). "Oxidative stress and gene expression in sepsis." Br J Anaesth **90**(2): 221-232.

Mahmood, D. F., A. Abderrazak, K. El Hadri, T. Simmet and M. Rouis (2013). "The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease." Antioxid Redox Signal **19**(11): 1266-1303.

Mahmood, D. F., A. Abderrazak, E. H. Khadija, T. Simmet and M. Rouis "The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease." Antioxid Redox Signal **2013**: 26.

Massion, P. B., O. Feron, C. Dessy and J. L. Balligand (2003). "Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing." Circ Res **93**(5): 388-398.

Mercola, M., P. Ruiz-Lozano and M. D. Schneider (2011). "Cardiac muscle regeneration: lessons from development." Genes Dev **25**(4): 299-309.

- Merx, M. W. and C. Weber (2007). "Sepsis and the heart." Circulation **116**(7): 793-802.
- Miranda-Vizuete, A., J. Ljung, A. E. Damdimopoulos, J. A. Gustafsson, R. Oko, M. Pelto-Huikko and G. Spyrou (2001). "Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa." J Biol Chem **276**(34): 31567-31574.
- Mitsui, A., J. Hamuro, H. Nakamura, N. Kondo, Y. Hirabayashi, S. Ishizaki-Koizumi, T. Hirakawa, T. Inoue and J. Yodoi (2002). "Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span." Antioxid Redox Signal **4**(4): 693-696.
- Morales, C. R., Z. Pedrozo, S. Lavandero and J. A. Hill (2014). "Oxidative stress and autophagy in cardiovascular homeostasis." Antioxid Redox Signal **20**(3): 507-518.
- Muller, F. L., Y. Liu and H. Van Remmen (2004). "Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane." J Biol Chem **279**(47): 49064-49073.
- Murray, A. J., M. A. Cole, C. A. Lygate, C. A. Carr, D. J. Stuckey, S. E. Little, S. Neubauer and K. Clarke (2008). "Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart." J Mol Cell Cardiol **44**(4): 694-700.
- Nakamura, H. (2005). "Thioredoxin and its related molecules: update 2005." Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 823-828.
- Nakamura, H., K. Nakamura and J. Yodoi (1997). "Redox regulation of cellular activation." Annu Rev Immunol **15**: 351-369.
- Narula, J., N. Haider, R. Virmani, T. G. DiSalvo, F. D. Kolodgie, R. J. Hajjar, U. Schmidt, M. J. Semigran, G. W. Dec and B. A. Khaw (1996). "Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure." N Engl J Med **335**(16): 1182-1189.
- Nicholson, C. K., J. P. Lambert, J. D. Molkenin, J. Sadoshima and J. W. Calvert (2013). "Thioredoxin 1 is essential for sodium sulfide-mediated cardioprotection in the setting of heart failure." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(4): 744-751.
- Nickel, A., J. Loffler and C. Maack (2013). "Myocardial energetics in heart failure." Basic Res Cardiol **108**(4): 358.
- Nishida, K., S. Kyoji, O. Yamaguchi, J. Sadoshima and K. Otsu (2009). "The role of autophagy in the heart." Cell Death Differ **16**(1): 31-38.
- Nisoli, E., S. Falcone, C. Tonello, V. Cozzi, L. Palomba, M. Fiorani, A. Pisconti, S. Brunelli, A. Cardile, M. Francolini, O. Cantoni, M. O. Carruba, S. Moncada and E. Clementi (2004). "Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16507-16512.

Okada, K., T. Minamino, Y. Tsukamoto, Y. Liao, O. Tsukamoto, S. Takashima, A. Hirata, M. Fujita, Y. Nagamachi, T. Nakatani, C. Yutani, K. Ozawa, S. Ogawa, H. Tomoike, M. Hori and M. Kitakaze (2004). "Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis." Circulation **110**(6): 705-712.

Ortiz, F., J. A. Garcia, D. Acuna-Castroviejo, C. Doerrier, A. Lopez, C. Venegas, H. Volt, M. Luna-Sanchez, L. C. Lopez and G. Escames (2014). "The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS." J Pineal Res **56**(1): 71-81.

Palaniyandi, S. S., X. Qi, G. Yogalingam, J. C. Ferreira and D. Mochly-Rosen "Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure." Drug Discov Today Dis Mech **7**(2): e95-e102.

Parrillo, J. E., M. M. Parker, C. Natanson, A. F. Suffredini, R. L. Danner, R. E. Cunnion and F. P. Ognibene (1990). "Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy." Ann Intern Med **113**(3): 227-242.

Perez, V. I., L. A. Cortez, C. M. Lew, M. Rodriguez, C. R. Webb, H. Van Remmen, A. Chaudhuri, W. Qi, S. Lee, A. Bokov, W. Fok, D. Jones, A. Richardson, J. Yodoi, Y. Zhang, K. Tominaga, G. B. Hubbard and Y. Ikeno (2011). "Thioredoxin 1 overexpression extends mainly the earlier part of life span in mice." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **66**(12): 1286-1299.

Peruchi, B. B., F. Petronilho, H. A. Rojas, L. Constantino, F. Mina, F. Vuolo, M. R. Cardoso, C. L. Goncalves, G. T. Rezin, E. L. Streck and F. Dal-Pizzol (2011). "Skeletal muscle electron transport chain dysfunction after sepsis in rats." J Surg Res **167**(2): e333-338.

Piquereau, J., F. Caffin, M. Novotova, C. Lemaire, V. Veksler, A. Garnier, R. Ventura-Clapier and F. Joubert (2013). "Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell?" Front Physiol **4**: 102.

Powis, G. and W. R. Montfort (2001). "Properties and biological activities of thioredoxins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **30**: 421-455.

Preiser, J. C., H. Zhang, B. Vray, A. Hrabak and J. L. Vincent (2001). "Time course of inducible nitric oxide synthase activity following endotoxin administration in dogs." Nitric Oxide **5**(2): 208-211.

Reitman, S. and S. Frankel (1957). "A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases." Am J Clin Pathol **28**(1): 56-63.

Reyes-Juarez, J. L. and A. Zarain-Herzberg (2006). "[Function and role of the sarcoplasmic reticulum in heart disease]." Arch Cardiol Mex **76 Suppl 4**(4): S18-32.

Ritter, C., M. Andrades, M. L. Frota Junior, F. Bonatto, R. A. Pinho, M. Polydoro, F. Klamt, C. T. Pinheiro, S. S. Menna-Barreto, J. C. Moreira and F. Dal-Pizzol (2003). "Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation." Intensive Care Med **29**(10): 1782-1789.

Romero-Bermejo, F. J., M. Ruiz-Bailen, J. Gil-Cebrian and M. J. Huertos-Ranchal "Sepsis-induced cardiomyopathy." Curr Cardiol Rev **7**(3): 163-183.

Roshon, M. J., J. A. Kline, L. R. Thornton and J. A. Watts (2003). "Cardiac UCP2 expression and myocardial oxidative metabolism during acute septic shock in the rat." Shock **19**(6): 570-576.

Rubartelli, A., A. Bajetto, G. Allavena, E. Wollman and R. Sitia (1992). "Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway." J Biol Chem **267**(34): 24161-24164.

Rudiger, A. and M. Singer (2007). "Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction." Crit Care Med **35**(6): 1599-1608.

Rudiger, A., M. Stotz and M. Singer (2008). "Cellular processes in sepsis." Swiss Med Wkly **138**(43-44): 629-634.

Samuel, S. M., M. Thirunavukkarasu, S. V. Penumathsa, S. Koneru, L. Zhan, G. Maulik, P. R. Sudhakaran and N. Maulik (2010). "Thioredoxin-1 gene therapy enhances angiogenic signaling and reduces ventricular remodeling in infarcted myocardium of diabetic rats." Circulation **121**(10): 1244-1255.

Sano, M. and M. D. Schneider (2005). "Energizer: PGC-1 alpha keeps the heart going." Cell Metab **1**(4): 216-218.

Sebai, H., M. Sani, E. Aouani and N. Ghanem-Boughanmi (2011). "Cardioprotective effect of resveratrol on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat." Drug Chem Toxicol **34**(2): 146-150.

Sengupta, R. and A. Holmgren (2011). "The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation." Biochim Biophys Acta **1820**(6): 689-700.

Singer, M. (2007). "Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure." Crit Care Med **35**(9 Suppl): S441-448.

Smeding, L., H. Leong-Poi, P. Hu, Y. Shan, J. J. Haitsma, E. Horvath, S. Furmli, H. Masoom, J. W. Kuiper, A. S. Slutsky, T. G. Parker, F. B. Plotz and C. C. dos Santos (2012). "Salutary effect of resveratrol on sepsis-induced myocardial depression." Crit Care Med **40**(6): 1896-1907.

Song, M. and G. W. Dorn, 2nd (2015). "Mitoconfusion: Noncanonical Functioning of Dynamism Factors in Static Mitochondria of the Heart." Cell Metab **21**(2): 195-205.

Spitz, D. R. and L. W. Oberley (1989). "An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates." Anal Biochem **179**(1): 8-18.

Sriskandan, S. and D. M. Altmann (2008). "The immunology of sepsis." J Pathol **214**(2): 211-223.

Tait, S. W. and D. R. Green (2013). "Mitochondrial regulation of cell death." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(9).

Takagi, Y., A. Mitsui, A. Nishiyama, K. Nozaki, H. Sono, Y. Gon, N. Hashimoto and J. Yodoi (1999). "Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 4131-4136.

Tanaka, T., F. Hosoi, Y. Yamaguchi-Iwai, H. Nakamura, H. Masutani, S. Ueda, A. Nishiyama, S. Takeda, H. Wada, G. Spyrou and J. Yodoi (2002). "Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis." EMBO J **21**(7): 1695-1703.

Tao, W., D. J. Deyo, D. L. Traber, W. E. Johnston and E. R. Sherwood (2004). "Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused by cecal ligation and puncture in mice." Shock **21**(1): 31-37.

Tavernier, B., A. Mebazaa, P. Mateo, S. Sys, R. Ventura-Clapier and V. Veksler (2001). "Phosphorylation-dependent alteration in myofilament Ca^{2+} sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart." Am J Respir Crit Care Med **163**(2): 362-367.

Turdi, S., X. Han, A. F. Huff, N. D. Roe, N. Hu, F. Gao and J. Ren (2012). "Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction: role of autophagy." Free Radic Biol Med **53**(6): 1327-1338.

van de Sandt, A. M., R. Windler, A. Godecke, J. Ohlig, S. Zander, M. Reinartz, J. Graf, E. E. van Faassen, T. Rassaf, J. Schrader, M. Kelm and M. W. Merx (2013). "Endothelial NOS (NOS3) impairs myocardial function in developing sepsis." Basic Res Cardiol **108**(2): 330.

van Empel, V. P., A. T. Bertrand, L. Hofstra, H. J. Crijns, P. A. Doevendans and L. J. De Windt (2005). "Myocyte apoptosis in heart failure." Cardiovasc Res **67**(1): 21-29.

Vanasco, V., T. Saez, N. D. Magnani, L. Pereyra, T. Marchini, A. Corach, M. I. Vaccaro, D. Corach, P. Evelson and S. Alvarez (2014). "Cardiac mitochondrial biogenesis in endotoxemia is not accompanied by mitochondrial function recovery." Free Radic Biol Med **77**: 1-9.

Vary, T. C. (1991). "Increased pyruvate dehydrogenase kinase activity in response to sepsis." Am J Physiol **260**(5 Pt 1): E669-674.

Vatner, D. E., K. Asai, M. Iwase, Y. Ishikawa, R. P. Shannon, C. J. Homcy and S. F. Vatner (1999). "Beta-adrenergic receptor-G protein-adenylyl cyclase signal transduction in the failing heart." Am J Cardiol **83**(12A): 80H-85H.

Villani, G. and G. Attardi (2007). "Polarographic assays of respiratory chain complex activity." Methods Cell Biol **80**: 121-133.

Vincent, J. L., P. Gris, M. Coffernils, M. Leon, M. Pinsky, C. Reuse and R. J. Kahn (1992). "Myocardial depression characterizes the fatal course of septic shock." Surgery **111**(6): 660-667.

Watts, J. A., J. A. Kline, L. R. Thornton, R. M. Grattan and S. S. Brar (2004). "Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats." J Mol Cell Cardiol **36**(1): 141-150.

Wheeler, D. S. "Oxidative Stress in Critically Ill Children with Sepsis." Open Inflamm J **4**(s1): 74-81.

Yamamoto, M., G. Yang, C. Hong, J. Liu, E. Holle, X. Yu, T. Wagner, S. F. Vatner and J. Sadoshima (2003). "Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy." J Clin Invest **112**(9): 1395-1406.

Yang, S., C. S. Chung, A. Ayala, I. H. Chaudry and P. Wang (2002). "Differential alterations in cardiovascular responses during the progression of polymicrobial sepsis in the mouse." Shock **17**(1): 55-60.

Yoshioka, J., E. R. Schreiter and R. T. Lee (2006). "Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules." Antioxid Redox Signal **8**(11-12): 2143-2151.

Zang, Q., D. L. Maass, S. J. Tsai and J. W. Horton (2007). "Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis." Surg Infect (Larchmt) **8**(1): 41-54.

Zang, Q. S., B. Martinez, X. Yao, D. L. Maass, L. Ma, S. E. Wolf and J. P. Minei (2012). "Sepsis-induced cardiac mitochondrial dysfunction involves altered mitochondrial-localization of tyrosine kinase Src and tyrosine phosphatase SHP2." PLoS One **7**(8): e43424.

Zhang, H., D. Liu, X. Wang, X. Chen, Y. Long, W. Chai, X. Zhou, X. Rui, Q. Zhang, H. Wang and Q. Yang (2013). "Melatonin improved rat cardiac mitochondria and survival rate in septic heart injury." J Pineal Res **55**(1): 1-6.

Zhang, Y. H., C. Z. Jin, J. H. Jang and Y. Wang (2014). "Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology." J Physiol **592**(Pt 15): 3189-3200.

Zorov, D. B., C. R. Filburn, L. O. Klotz, J. L. Zweier and S. J. Sollott (2000). "Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes." J Exp Med **192**(7): 1001-1014.

Resumen

El estrés oxidativo está involucrado en la etiología de muchas patologías incluyendo el cáncer, la enfermedad cardiovascular y los procesos inflamatorios como la sepsis, entre otros. La evidencia actual sugiere que Trx1 tiene un papel importante en la neutralización del estrés oxidativo, la inhibición de la apoptosis y la modulación del proceso inflamatorio. En modelos animales, Trx1 ha mostrado ejercer un rol protector en la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, es desconocido su efecto protector sobre la función mitocondrial, la muerte celular y los procesos de dinámica y biogénesis mitocondrial en la disfunción miocárdica inducida por sepsis, la cual es una reconocida complicación de la sepsis severa y en la que el estrés oxidativo es considerado como la causa subyacente.

Se utilizaron ratones FVB machos transgénicos con sobreexpresión específica de Trx1 en corazón (Tg-trx1) y sus respectivos wild-type (WT). Se les realizó ligadura- doble punción cecal o laparotomía. Se analizó la sobrevida y se evaluó el inotropismo a través de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) y la reserva contráctil frente a un estímulo β -adrenérgico (isoproterenol (Iso)(1 μ M)) por técnica de Langendorff. A las 6, 18 y 24 h, se evaluó en el tejido cardíaco: la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes; la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial por espectrofotometría; el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por citometría de flujo; y la expresión de óxido nítrico sintasas (NOS) por Western blot y RT-PCR. Además se estudió la apoptosis mediante la técnica de TUNEL y la liberación de citocromo *c* mitocondrial; la autofagia por microscopía electrónica (ME) y la expresión de LC3 por *Western blot*. La expresión génica de proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial (Drp1, Mfn2, Opa1) y la biogénesis (PGC-1 α , NRF-1 and TFAM) se evaluaron por RT-qPCR.

Los resultados mostraron que Trx1 incrementó el tiempo promedio de sobrevida en ratones sépticos (Tg-trx1: 36; wt: 28h; $p=0,0204$). A las 6 hs produjo un incremento de 15 puntos porcentuales en la contractilidad cardíaca como respuesta ante el estímulo β -adrenérgico (Tg-trx1: 7,8% vs WT: 22,8%; medias de las diferencias relativas entre basal e Iso). En la sepsis tardía, Trx1 retardó la caída en la actividad de SOD mangánica sin ejercer ninguna

modificación sobre su expresión proteica. Trx1 no modificó la expresión ni la actividad de NOS, por lo que se observó, indistintamente de WT, una reducción en la expresión de eNOS a las 6 hs post LPC que fue reversible en la sepsis tardía; las isoformas nNOS e iNOS fueron indetectables en sepsis; de forma coincidente, no se detectaron cambios en la actividad de NOS así como tampoco en los niveles de 3-nitrotirosina, como marcador de nitración proteica.

Referente a su acción sobre la función mitocondrial, Trx1 atenuó la caída en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), retardó la inhibición del complejo I mitocondrial y mantuvo invariable la producción de H_2O_2 mitocondrial y el nivel de carbonilación proteica en los homogenatos de corazón. Los cambios en la ultraestructura mitocondrial debidos al proceso séptico también fueron atenuados; principalmente la alteración de las crestas y de la membrana externa mitocondrial.

Durante la progresión de la sepsis, tanto en ratones Tg-Trx1 como en WT hubo inhibición de la apoptosis y activación de la autofagia evidenciada por el incremento de la razón LC3-II/LC3-I. Estos hallazgos se acompañaron de la reducción de los niveles de Opa1 y Drp1 relacionados a la alteraciones en las crestas mitocondriales, así como también de PGC-1 α que luego incrementó progresivamente y de forma significativa sólo en Tg-trx1.

Los datos nos permiten concluir que durante la disfunción miocárdica séptica, Trx1 ejerce un prolongado efecto protector redox, postergando el daño funcional mitocondrial y atenuando las alteraciones estructurales en la mitocondria cardiaca. Trx1 activa significativamente el proceso de biogénesis mitocondrial. Estos mecanismos asociados a la mitofagia, estarían participando en la restauración de la población mitocondrial y finalmente prolongando la supervivencia en la sepsis por LCP.