



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral:

Impacto del estrés del retículo endoplasmático en la disfunción miocárdica

Tesista: Lic. Juan Ignacio Elio Mariángelo

Directora: Dra. Matilde Said

Codirectora: Dra. Cecilia Mundiña-Weilenmann

Año: 2019

El presente trabajo de Tesis, pudo ser llevado a cabo gracias al apoyo de diferentes instituciones a las que agradezco:

*A la **Facultad de Ciencias Exactas** de la **Universidad Nacional de La Plata**, por permitirme formarme como Biotecnólogo y Biólogo Molecular de manera gratuita y sin ninguna restricción, y realizar la carrera de Doctor en Ciencias Exactas.*

*A las autoridades del **Centro de Investigaciones Cardiovasculares** y de la **Facultad de Ciencias Médicas** de la **Universidad Nacional de La Plata**, por darme el lugar para poder realizar mi trabajo de Tesis.*

*A la **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica** y al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas**, por becarme para poder realizar el doctorado y financiar nuestra investigación.*

Al momento de presentar este trabajo de Tesis, se consolidan años de esfuerzo tanto a nivel individual como del grupo de personas que permitieron que llegara a este punto. Me gustaría comenzar agradeciendo profundamente a las mismas.

En primer lugar, agradezco a mi grupo de trabajo compuesto por mi directora la Dra. Matilde Said, mi Codirectora la Dra. Cecilia Mundiña-Weilenmann, la Dra. Leticia Vittone y la Dra. Margarita Salas; por haberme dado la oportunidad de ser su becario y permitirme llevar a cabo mi tesis doctoral, haberme integrado y darme lugar para participar y trabajar con ustedes.

A Matilde y a Cecilia, por guiarme, ayudarme a crecer y haber sido fundamentales para mi formación como profesional. Por estar día a día a lo largo de estos años, acompañándome, con la dedicación y el gran apoyo que me dieron. Por darme la confianza y el incentivo para poder desempeñarme en el ámbito científico. Por alentarme siempre a mejorar y a aceptar desafíos. Por empujar siempre para adelante y demostrar que hay que persistir para llevar los proyectos a buen puerto.

A Leticia por la claridad de sus ideas y su visión integral, por estar constantemente presente, por motivarme y guiarme. Por estar siempre abierta al debate de ideas y conceptos.

A Margarita por su buena predisposición y paciencia y por haber iniciado este proyecto. Por sus tan necesarias correcciones.

A todas ellas por transmitirme su experiencia, su excelencia académica y científica y la pasión por la investigación. Por su integridad como personas y profesionales, que marcarán mi formación a futuro.

A Romina Becerra, por guiarme y formarme en mis primeros pasos por el laboratorio con paciencia y compañerismo. Al resto de mis compañeros de laboratorio con los que compartí diferentes momentos y me acompañaron en el transcurso y desarrollo de esta Tesis: Agustina Silvestri, Barbara Román y Mariano Di Carlo.

A mis amigos, a los de siempre y a los nuevos que hice a lo largo de estos años. Con amigos se hace todo mucho más sencillo, y marcan quienes somos.

A los distintos integrantes y compañeros del Centro de Investigaciones Cardiovasculares, por el grupo humano que representan, habiéndome siempre demostrado afecto, calidez y motivación.

Por último, a los que dedico este trabajo de Tesis:

A mis papás, Mónica y Eduardo, por siempre motivarme para estudiar una carrera universitaria y científica. Por marcarme para seguir este camino y brindarme su plena confianza. Gracias a su impronta y apoyo incondicional llegué a estar en este lugar.

A Dani, el amor de mi vida, mi gran compañera y la mejor persona que conozco. Por acompañarme a cada instante, ser mi cable a tierra y la alegría de mis días. No hubiera podido llegar hasta acá sin vos.

Los resultados experimentales obtenidos durante el período de mi Tesis Doctoral, dieron lugar a publicaciones y presentaciones en reuniones científicas de la especialidad.

Publicaciones:

- **Mariángelo JIE**, Román B, Silvestri A, Salas M, Vittone L, Said M, Mundiña-Weilenman C. Chemical chaperones improve the functional recovery of stunned myocardium by attenuating the endoplasmic reticulum stress. *Acta Physiol (Oxf)*. 2019. doi: 10.1111/apha.13358

Presentaciones en reuniones científicas:

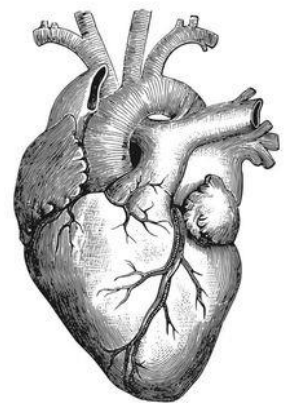
- Di Carlo M, Becerra R, **Mariángelo J**, Salas M, Said M. El estrés del retículo endoplasmático inducido por isquemia y reperfusión (I/R) del miocardio. Su relación con la activación de la quinasa dependiente de calcio y calmodulina. II Congreso internacional de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata, Argentina, 2015.
- Di Carlo M, Becerra R, **Mariángelo J**, Salas M, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Vittone L. Participación de la quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII) en el estrés del retículo endoplasmático inducido por isquemia y reperfusión del miocardio. Reunión Conjunta 2015 entre la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata, Argentina, 2015. *Medicina*. Vol 75, Suplemento II, Nº: 584, 2015.
- **Mariángelo J**, Becerra R, Román B, Vittone L, Salas M, Said M, Mundiña-Weilenmann C. Señalización inducida por el estrés del retículo endoplásmico durante la isquemia y reperfusión miocárdica. Reunión 2016 de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS), La Plata, Argentina, 2016. *Physiological Mini Reviews*. Vol 9: 53, 2016.
- **Mariángelo J**, Román B, Salas M, Said M, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C. Characterization of the cellular signaling induced by the endoplasmic reticulum (ER) stress in isolated perfused rat hearts and its possible impact on tissue injury. Congreso de la Unión Internacional de Ciencias Fisiológicas (International Union of Physiological Sciences IUPS). Río de Janeiro, Brasil, Agosto de 2017.
- **Mariángelo JIE**, Román B, Becerra R, Silvestri A, Esoin F, Salas M, Said MM, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L. Does the severity of the ischemic insult promote differential activation of the endoplasmic reticulum stress pathways? Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Argentina, Noviembre de 2017. *Medicina*. Vol 77, Suplemento I, Nº: 5, 2017.
- **Mariángelo JIE**, Román B, Silvestri A, Salas M, Said M, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C. Unfolded protein response in the stunned heart. Estados Unidos de América. New London, NH. 2018. Gordon Research Conference "Cardiac Regulatory Mechanisms".
- **Mariángelo JIE**, Román B, Silvestri A, Salas M, Said M, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C. Pro-survival and pro-apoptotic mechanisms triggered by endoplasmic reticulum stress in the ischemic-reperfused myocardium. Reunión Conjunta entre la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI) y la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS) 2018. Mar del Plata, Argentina, 2018. *Medicina*. Vol 78, Suplemento III, Nº, 2018.

Índice

1. Introducción.....	8
1.1. <i>Retículo Sarco/Endoplasmático: ¿dos entidades distintas en el músculo cardíaco?</i>	9
1.2. <i>Síntesis y plegamiento proteico</i>	13
1.3. <i>Estrés de retículo endoplasmático y respuesta a las proteínas mal plegadas.</i>	16
1.3.1. GRP78	17
1.3.2. Vía de PERK.....	18
1.3.3. Vía de IRE1	19
1.3.4. Vía de ATF6	20
1.4. <i>Injuria por isquemia y reperfusión</i>	21
1.4.1. <i>Injuria reversible por isquemia/reperfusión. Bases moleculares del atontamiento miocárdico.</i> ..	22
1.4.2. <i>Injuria irreversible por isquemia/reperfusión. Mecanismos de muerte celular</i>	25
1.5. <i>Estrés de retículo endoplasmático y respuesta a las proteínas mal plegadas en la isquemia/reperfusión miocárdica</i>	30
2. Hipótesis	33
3. Objetivos	35
4. Materiales y Métodos.....	37
4.1. <i>Experimentos ex vivo: corazones intactos</i>	38
4.2. <i>Protocolos experimentales.</i>	38
4.3. <i>Determinación de LDH</i>	41
4.4. <i>Determinación del tamaño de infarto</i>	41
4.5. <i>Medición de peroxidación lipídica</i>	42
4.6. <i>Electroforesis y Western Blot</i>	43
4.7. <i>Evaluación de apoptosis</i>	44
4.8. <i>RT-PCR cuantitativa en tiempo real</i>	45
4.9. <i>Análisis estadístico.</i>	46
5. Resultados	47

5.1. Estrés de retículo endoplasmático en el corazón atontado.....	48
5.2. Injuria inducida por isquemia/reperfusión moderada.....	53
5.3. Impacto funcional del estrés de retículo endoplasmático en el corazón atontado.....	55
5.4. Participación del translocón en la disfunción contráctil del corazón atontado.....	61
6. Discusión.....	63
6.1. En el atontamiento miocárdico se desencadenan vías adaptativas y pro-apoptóticas de la UPR.....	64
6.2. El estrés de RE contribuye a la disfunción contráctil del atontamiento miocárdico.....	67
6.3. La inhibición del translocón mejora la recuperación contráctil del corazón atontado	67
7. Conclusiones	69
8. Bibliografía.....	71

1. Introducción



1.1. Retículo Sarco/Endoplasmático: ¿dos entidades distintas en el músculo cardíaco?

El retículo sarcoplasmático (RS) desempeña un rol fundamental en el acoplamiento eléctrico-contráctil (AEC) de las células musculares cardíacas. El AEC es el conjunto de fenómenos que comienzan con la despolarización de la membrana celular y culminan en el interior de la célula con la contracción a nivel de los miofilamentos. Este proceso tiene como nexo principal al ion Ca^{+2} , que vincula la actividad eléctrica con la mecánica. Su aumento en el citosol determina la contracción y su disminución, que ocurre a través de distintos mecanismos, cierra el ciclo y produce la relajación miocárdica. El RS es el encargado de sostener el ciclo de Ca^{+2} . Este sistema de membranas del interior celular presenta diferentes regiones que cumplen funciones específicas. El RS longitudinal es un conjunto de túbulos interconectados que forman una red alrededor de las miofibrillas y está enriquecido en la ATPasa transportadora de Ca^{+2} del RS (SERCA2a), responsable de la remoción del Ca^{+2} del citoplasma que inicia la relajación muscular. En sus extremos, el RS longitudinal presenta ensanchamientos llamados cisternas terminales que se encuentran en estrecha proximidad con invaginaciones de la membrana plasmática denominadas túbulo T. Las cisternas del RS contienen al receptor de rianodina (RyR2), canal responsable de la liberación de Ca^{+2} hacia el citosol que inicia la contracción muscular. En el interior del RS se encuentra la proteína calsecuestrina encargada de unir y almacenar Ca^{+2} (1) (Figura 1).

El retículo endoplasmático (RE) es también un sistema de membranas presente en todas las células eucariotas. Está formado por tubos y sacos aplanados interconectados que se extienden a través del citosol y se continúan con la envoltura nuclear. Su papel es fundamental en múltiples procesos necesarios para la supervivencia y el funcionamiento normal de la célula como la síntesis lipídica, la síntesis de proteínas integrales de membrana y secretadas, la regulación del Ca^{+2} y la interacción con otras organelas (2).

El RE fue descrito por primera vez en 1945 (3) y años más tarde a través del uso de la microscopía electrónica, se distinguieron dos porciones: el RE liso y el rugoso (4). La presencia de una gran cantidad de ribosomas en la cara citosólica le confirió el nombre a este último. Actualmente se identifican diferentes dominios estructurales y funcionales en el RE: el RE rugoso, el RE transicional, el RE liso, que a su vez puede ser dividido en RE periférico o cortical, también conocido como PAM (del inglés: "*Plasma membrane-Associated Membrane*") y el RE asociado a mitocondria conocido como MAM (del inglés: "*Mitochondria-Associated Membrane*") (5) y

finalmente la envoltura nuclear. Como ya mencionamos el RE rugoso está caracterizado por la presencia de ribosomas y su función principal es la síntesis y plegamiento proteico y el almacenamiento de Ca^{+2} . El RE transicional es el lugar adonde migran las proteínas que van a ser secretas al aparato de Golgi. El dominio PAM está involucrado en el transporte de lípidos a la membrana plasmática y permite la entrada capacitativa de Ca^{+2} desde el espacio extracelular. A través del dominio MAM se transfieren lípidos esenciales y Ca^{+2} desde el RE hacia la mitocondria (5). Por último, la envoltura nuclear, estructura membranosa que rodea y define al núcleo celular, no fue inicialmente considerada parte del RE (6). Sin embargo, la presencia de ribosomas en su cara externa (7) y el hecho de que realiza muchas de las funciones descritas para el RE rugoso, como almacenamiento y regulación de la liberación de Ca^{+2} y síntesis proteica, ha llevado a que algunos autores consideren a la envoltura nuclear como parte de la red del RE (8).

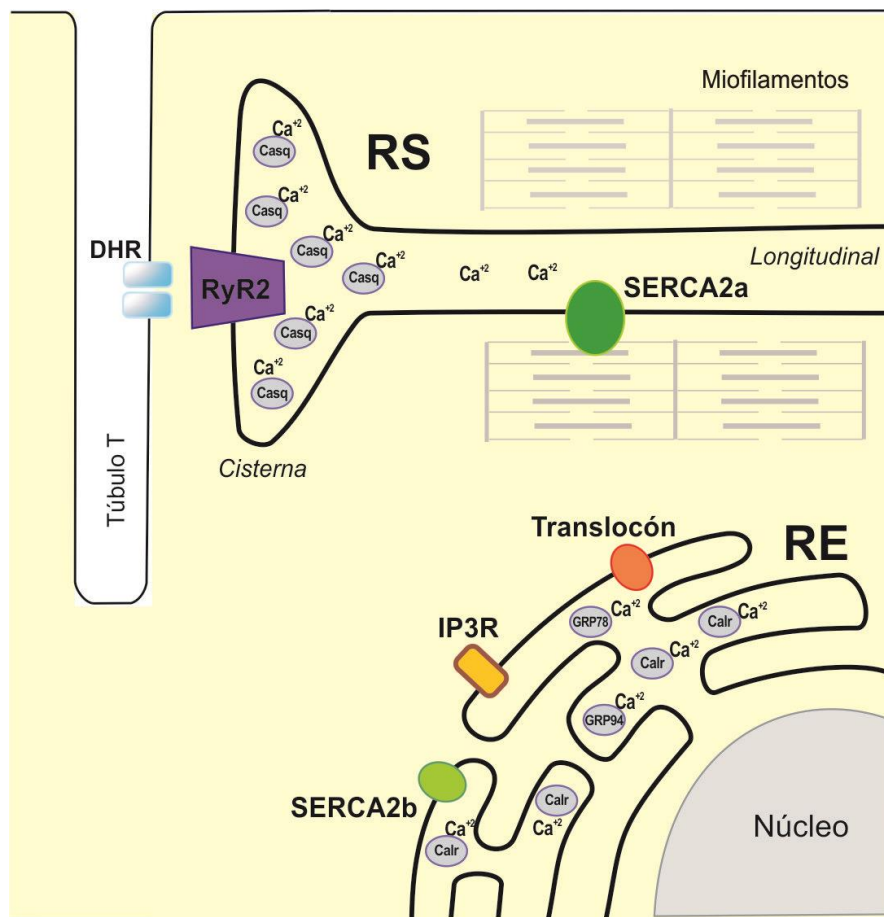


Figura 1. Esquema del RS y del RE en el miocito cardíaco donde se muestran las distintas proteínas involucradas en el manejo del Ca^{+2} . DHR: canal de Ca^{+2} tipo L; Casq: calsequestrina, Calr: calreticulina.

La forma y distribución de los dominios del RE está regulada por una variedad de proteínas integrales de membrana e interacciones con proteínas del citoesqueleto u otras organelas. Estas interacciones son de naturaleza dinámica y pueden cambiar en distintos estadios de la célula (9).

Para llevar a cabo sus funciones, el RE requiere niveles intraluminales de Ca^{+2} elevados y mecanismos que regulen con precisión su entrada y salida. La principal proteína encargada de promover la entrada de Ca^{+2} al RE desde el citosol es la ATPasa transportadora de Ca^{+2} , SERCA2b. La liberación de Ca^{+2} desde el RE ocurre a través de canales, principalmente el receptor de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3R) y el translocón. Además, el RE contiene proteínas fijadoras de Ca^{+2} que modulan la concentración luminal del ion. Calreticulina es una de las mayores responsables del almacenamiento de Ca^{+2} ya que fija aproximadamente un 50% del Ca^{+2} luminal (10), mientras que otras proteínas como GRP94 y GRP78 (del inglés: *Glucose Regulated Protein 94 o 78* kDa) tienen una menor afinidad pero, en virtud de su abundancia, fijan aproximadamente un 30% del Ca^{+2} almacenado (11, 12). Además, parte del Ca^{+2} remanente se halla unido a enzimas que participan en la síntesis y plegamiento proteico, como oxidorreductasas y disulfuro isomerasas (13) (Figura 1).

Si bien tanto el RE como el RS intervienen en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{+2} , las diferentes proteínas involucradas en su almacenamiento y transporte determinan una participación distinta de cada organela en el manejo de este ion a nivel intracelular. La liberación de Ca^{+2} del RE produce cambios sostenidos en la concentración citosólica del mismo, necesarios para la activación de múltiples vías de señalización dependientes de Ca^{+2} . El RS en cambio, libera y retoma Ca^{+2} rápidamente, provocando variaciones que sostienen la alta velocidad del ciclo contracción/relajación (2).

Si bien el RE y el RS parecen tener funciones bien definidas, todavía se discute en el miocito cardíaco si son dos sistemas de membranas físicamente separados o un sistema único con diferente especialización (Figura 2). En un principio, el RS del músculo estriado fue considerado como una forma modificada del RE liso (14). Incluso, algunas evidencias le adjudicaron funciones similares al RE rugoso, interviniendo en la síntesis proteica. Otros estudios, sin embargo, sugieren que este proceso ocurre en un RE independiente localizado en la zona perinuclear (15).

Por lo tanto, con la información disponible no podemos establecer aun si el RS y el RE constituyen dos entidades física y/o funcionalmente independientes en el miocito cardíaco. Resolver esta controversia es un importante desafío a futuro.

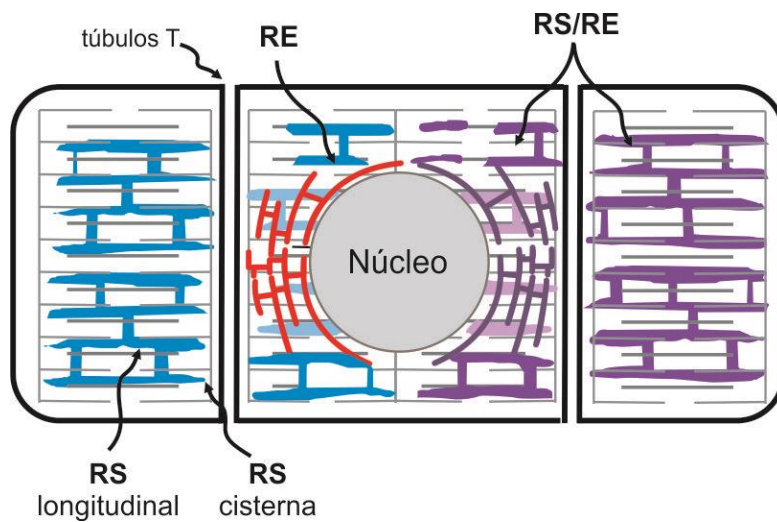


Figura 2. Relación entre el RE y el RS en el miocito cardíaco. Esquema que muestra a los sistemas de membrana RE y RS como continuos (derecha) o como dos organelas independientes (izquierda).

1.2. Síntesis y plegamiento proteico

Como se mencionó en el apartado anterior, una de las principales funciones del RE es servir como sitio de síntesis de proteínas destinadas a secreción, de proteínas integrales de membrana (16) y de algunas proteínas citosólicas (17). La Figura 3 muestra un esquema de la síntesis y plegamiento proteico que ocurre en el RE. La traducción de proteínas se inicia en los complejos ARNm-ribosoma del citosol. El extremo amino terminal del polipéptido naciente posee una secuencia señal que es reconocida por la partícula de reconocimiento de señal (PRS) (16, 18). El complejo ARNm-ribosoma-polipéptido naciente-PRS, se ancla al receptor de PRS que se encuentra en la membrana del RE (19, 20). La traducción continúa y el polipéptido emergente puede co-traduccionalmente entrar al RE a través del translocón (21), que es un canal formado por varias proteínas denominadas Sec (de inglés: **Secretory**) (22). Durante su paso por el translocón una peptidasa cliva el péptido señal permitiendo que la proteína libre entre en el lumen del RE (22). Una vez que la traducción está completa y que el péptido señal es escindido, los ribosomas son liberados nuevamente hacia el citosol (23, 24).

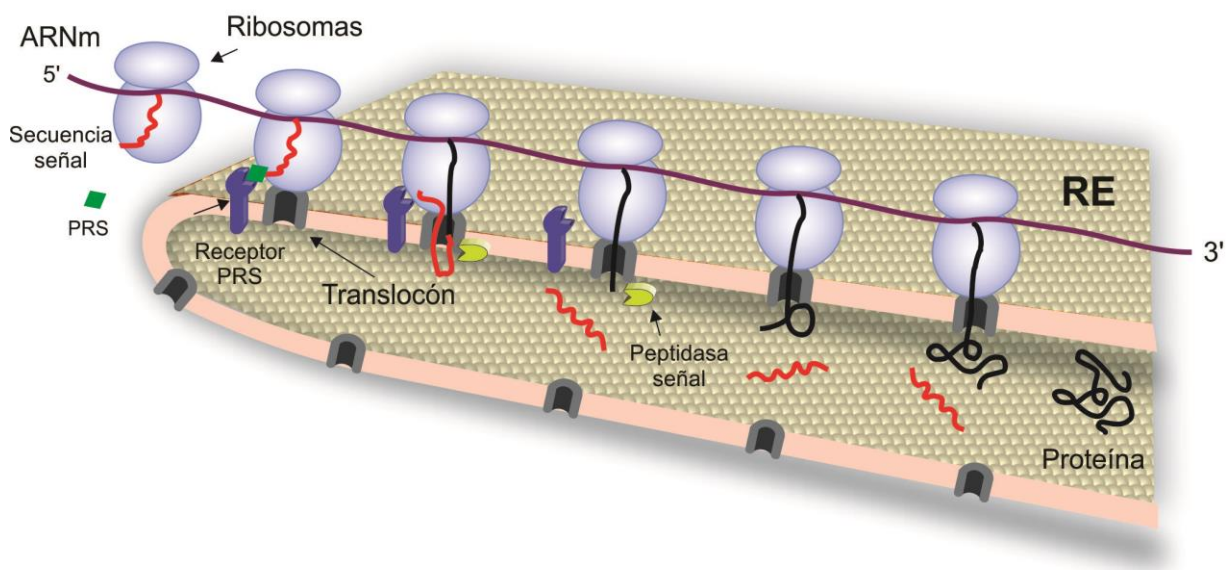


Figura 3. Pasos de la síntesis de proteínas en el RE. La partícula de reconocimiento de señal (PRS), reconoce la secuencia señal traducida por el complejo ribosoma/ARNm. Luego PRS se une a su receptor en la membrana del RE y la proteína naciente ingresa al lumen del RE a través del translocón. Finalmente una peptidasa cliva a la secuencia señal y la síntesis proteica continúa hacia el interior del RE.

Para que la proteína naciente resulte funcionalmente activa, debe adquirir un plegamiento correcto, oligomerizarse y/o sufrir distintas modificaciones post-traduccionales (16).

El plegamiento requiere de la participación de proteínas que favorecen termodinámicamente el proceso y colaboran en el control de calidad, así como también de ciertas condiciones en el lumen del RE. La proteína ingresa al RE en un estado desplegado y debe pasar progresivamente por distintos intermediarios de plegamiento para alcanzar su conformación nativa. Las chaperonas son proteínas que reconocen y se pegan a regiones hidrofóbicas de las proteínas recientemente sintetizadas y las estabilizan para que no se agreguen. No llevan a cabo el proceso de plegamiento como tal, ni forman parte de la estructura funcional final de la proteína, sino que actúan como enzimas acelerando las etapas limitantes de la reacción de plegamiento, es decir, disminuyen la barrera energética entre el estado nativo y no nativo de la proteína. Su actividad requiere ATP y altas concentraciones de Ca^{+2} .

Entre las chaperonas más abundantes del RE está la GRP78 (11). GRP78 no solo acompaña el plegamiento sino que libera sustratos terminalmente mal plegados hacia el sistema de degradación asociada al RE (ERAD), mediado por el proteosoma. GRP78 se retiene en el RE gracias al dominio KDEL (según el código de una letra de los aminoácidos K: lisina, D: aspártico, E: glutámico; L: leucina) en el extremo C-terminal. Este extremo de la chaperona también se une, inicialmente con baja afinidad, a las regiones hidrofóbicas expuestas de las proteínas en estados intermedios o parciales de plegamiento. La interacción GRP78-péptido, activa a la ATPasa del dominio N-terminal y la hidrólisis del ATP produce un cambio conformacional que aumenta la afinidad por el péptido (25).

Por otro lado, el plegamiento de proteínas requiere de reacciones como la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos de prolina y la formación o ruptura de puentes disulfuro catalizada por proteínas disulfuro isomerasas (PDI). Esta última reacción necesita un ambiente oxidante como el provisto por el RE que exhibe una baja relación del sistema glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) (1:1-3:1 vs. 100:1-30:1), una de las principales defensas antioxidantes de las células presente en el citosol (26).

Otras modificaciones de la estructura proteica llevadas a cabo en el RE incluyen: hidroxilación del ácido aspártico, carboxilación de residuos del ácido glutámico, adición de anclajes de glicofosfatidil inositol y N-glicosilación (26). La N-glicosilación, un paso crítico en el plegamiento de proteínas, consiste en la transferencia de un oligosacárido precursor al extremo amino terminal de un residuo de Asparagina (Asn) de la secuencia Asn-X-Serina (Ser)/Treonina (Thr), (donde X es cualquier aminoácido excepto Prolina). Modificaciones del oligosacárido precursor informan a la

maquinaria del RE que las chaperonas, calreticulina y calnexina, deben ayudar con el plegamiento. Una vez que éste se ha completado, una nueva modificación del oligosacárido indica al sistema de control de calidad del RE que inspeccione la proteína en busca de defectos. Si está plegada inapropiadamente, la maquinaria del RE devuelve la proteína a las chaperonas para ser replegada. Si este paso fracasa, las proteínas serán conducidas hacia al ERAD para asegurar que polipéptidos aberrantes no entren inadvertidamente a la vía secretoria (27). De esta manera, los sistemas del control de calidad del RE utilizan la información contenida dentro de los oligosacáridos, como sensores para vigilar el estatus de plegamiento de las proteínas.

Una vez que la proteína adquiere su estructura nativa, se decide el destino final de la misma. Si se trata de una proteína residente del RE ya está disponible para funcionar. Si por el contrario está destinada a la secreción, será liberada por parte de las chaperonas y empaquetada para viajar a través del Golgi, hacia su destino final (28). El destino de las proteínas integrales de membrana está determinado por la presencia de tramos de residuos hidrofóbicos o por una secuencia de anclaje a membrana, lo que produce que la translocación se detenga (29, 30).

1.3. Estrés de retículo endoplasmático y respuesta a las proteínas mal plegadas.

El RE tiene la capacidad de detectar el estado de plegamiento de las proteínas a través de un sistema de control de calidad. Pequeños cambios en los niveles de proteínas mal plegadas envían señales hacia otras partes de la célula que responden ajustando la maquinaria de plegamiento a la demanda (31). Cambios drásticos en el estado del plegamiento de las proteínas provocados por alteraciones en el entorno oxidativo, en los niveles de Ca^{+2} intraluminal, desbalance en la provisión de glucosa y nutrientes, mutaciones genéticas de las proteínas o un alto tráfico de las mismas en el RE, inician una versión mucho más reactiva de este intento de mantener la homeostasis, que se denomina respuesta a las proteínas mal plegadas o UPR (del inglés: *Unfolded Protein Response*) (26).

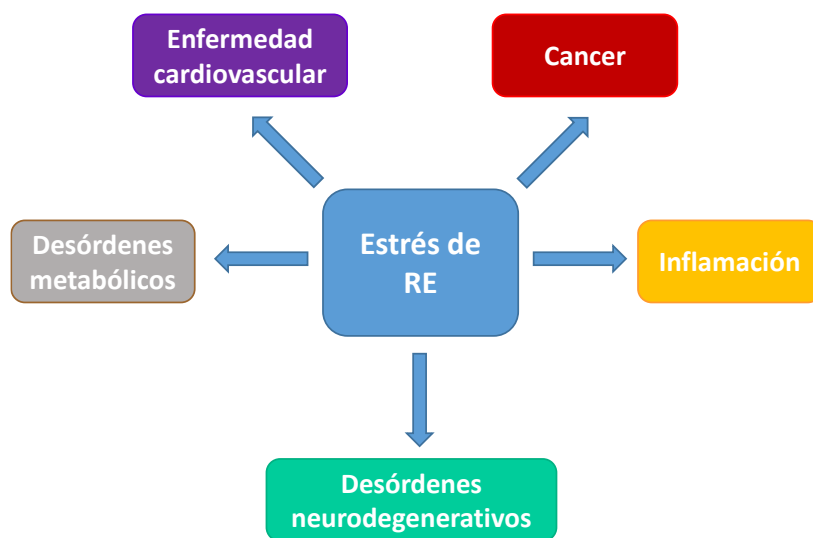


Figura 4. El estrés de RE contribuye a la patología de muchas enfermedades humanas.

Como muestra la Figura 4, numerosísimas patologías se relacionan con plegamiento anómalo de proteínas, estrés de RE y activación de la UPR. Entre ellas se encuentran: enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, Huntington, enfermedades priónicas), diabetes, síndrome metabólico, enfermedades infecciosas e inflamatorias y cáncer (32). También se ha descrito que vías tanto adaptativas como pro-apoptóticas de la UPR desempeñan un rol crítico en el desarrollo y progresión de enfermedades

cardiovasculares como la hipertrofia, la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca y la aterosclerosis (33, 34).

La acumulación de proteínas mal plegadas es detectada a través de tres proteínas transmembrana que inician caminos distintos de señalización: PERK (del inglés: *Protein Kinase RNA-like ER Kinase*) (35, 36), IRE1 (del inglés: *Inositol-Requiring Enzyme 1*) (37-40), y ATF6 (del inglés: *Activating Transcription Factor 6*) (41-44) (Figura 5). La activación de estas vías promueve mecanismos que conducen a: 1) reducir la cantidad de proteínas que se sintetizan e ingresan al RE, para evitar que se sigan acumulando proteínas mal plegadas, 2) aumentar selectivamente la síntesis de proteínas que faciliten el correcto plegamiento proteico (como chaperonas y PDI, entre otras), y 3) aumentar la síntesis de componentes de la maquinaria de degradación, para eliminar aquellas proteínas terminalmente mal plegadas. Además, bajo ciertas condiciones, el estrés de RE puede activar la autofagia (45-47), un mecanismo catabólico de conservación de energía que promueve la sobrevivencia celular (48). En conjunto, bajo condiciones homeostáticas, estos elementos de la respuesta al estrés de RE, hacen que el RE pueda suplir la demanda de plegamiento de proteínas, constituyéndose así en un mecanismo adaptativo. Sin embargo, si estos factores de la respuesta al estrés de RE, no son suficientes para suplir la demanda, se activan otro tipo de señales, que conducen a la célula hacia la muerte por apoptosis, convirtiendo la respuesta al estrés de RE en un proceso maladaptativo (49). Dependiendo de la intensidad, y de la duración, el estrés de RE puede entonces activar mecanismos de sobrevivencia, o de muerte celular (50).

A continuación detallaremos los principales componentes de las vías de la UPR.

1.3.1. GRP78

GRP78 fue originalmente identificada por aumentar su expresión ante la depleción de glucosa (51) y por fijarse a la cadena pesada de la inmunoglobulina en linfocitos B (52) por lo que también recibió el nombre de BiP (del inglés: *Binding Immunoglobulin Protein*) (53). Como ya se mencionó, GRP78 actúa como chaperona luminal del RE, pero además cumple un rol modulador del estrés de RE. En condiciones normales, GRP78 se encuentra asociada a los dominios luminales de los tres efectores proximales de la UPR (PERK, IRE1 y ATF6) manteniéndolos inactivos. Frente a la acumulación de proteínas mal plegadas, GRP78 se une a ellas para facilitar su plegamiento o conducir las a la maquinaria de ERAD. La disociación de GRP78 de los tres sensores transmembrana

hace que éstos se activen (54, 55). Además, como ya se señaló, GRP78 es importante en la regulación de la concentración luminal de Ca^{+2} del RE.

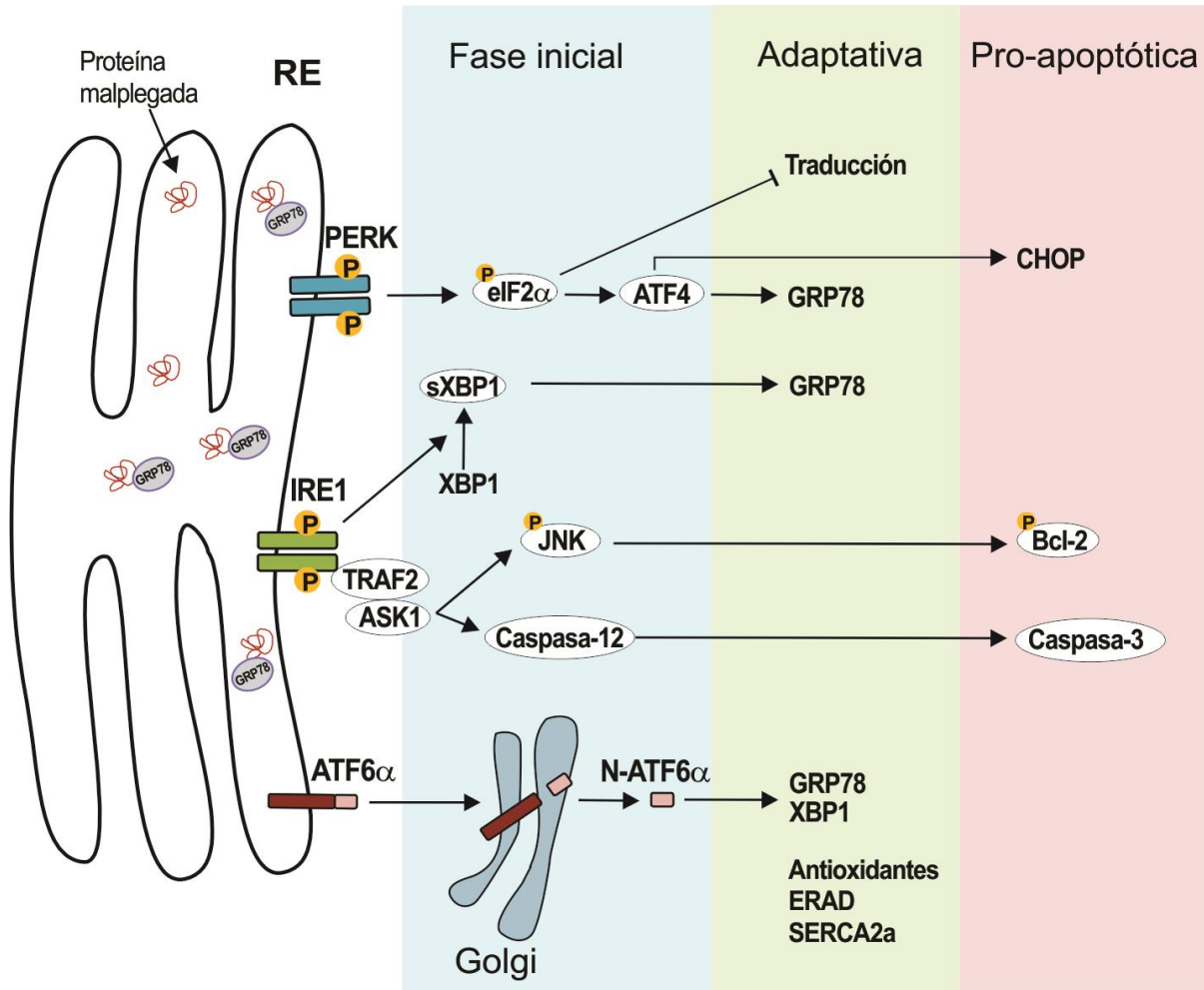


Figura 5. Respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR). La UPR se activa cuando GRP78 es reclutada por las proteínas mal plegadas. PERK fosforila al eIF2 α inhibiendo la traducción global y promoviendo a su vez la activación de ATF4. IRE1 α cataliza la escisión de un intrón del ARNm de XBP1, dando lugar a sXBP1, que activa la transcripción de chaperonas. ATF6, es clivado en el Golgi y promueve la transcripción de GRP78, XBP1, proteínas antioxidantes, componentes de la ERAD y SERCA2a. Si el estrés de RE es intenso o duradero, se activan señales pro-apoptóticas: CHOP (vía de PERK), la fosforilación de JNK y el clivaje de caspasa-12 (vía de IRE1 α).

1.3.2. Vía de PERK

Cuando se activa, PERK se oligomeriza permitiendo su trans-autofosforilación. A su vez produce la fosforilación del factor iniciador de la traducción eIF2 α (del inglés: *eukaryotic Initiation Factor 2*) en su Ser 51, lo cual impide la formación del complejo eIF2-GTP-ARN de transferencia

unido a metionina, responsable de iniciar la traducción de las proteínas nacientes (56). Sólo algunos ARNm, como el del factor de transcripción ATF4, escapan a esta inhibición por poseer modificaciones en la región 5' no traducida que le permiten interactuar con la maquinaria de traducción (57, 58). ATF4 aumenta la expresión de genes que favorecen la supervivencia (GRP78) (59) o en caso de estrés prolongado o extremo, de genes que promueven la muerte (CHOP, del inglés: *CCAAT-enhancer-binding protein Homologous Protein*) (57). Como se detallará más adelante CHOP induce la expresión de numerosas proteínas que de manera directa o indirecta estimulan el mecanismo de apoptosis mitocondrial. Por otra parte, PERK induce la expresión de antioxidantes endógenos que protegen del daño oxidativo a través de la fosforilación del factor de transcripción Nrf2 (del inglés: *Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2*) (60).

1.3.3. Vía de IRE1

IRE1 es una proteína bifuncional ya que contiene un dominio serina-treonina quinasa y un dominio endorribonucleasa en el extremo carboxilo terminal. Hay dos isoformas de IRE1 en mamíferos, IRE1 α , expresada ubicuamente, e IRE1 β , expresada en intestino (61, 62). Cuando GRP78 se disocia, IRE1 se homodimeriza y se activa (63). Recientemente se ha propuesto que IRE1 podría ser regulada directamente por las proteínas mal plegadas (64).

La actividad endorribonucleasa de IRE1 al clivar el ARN ribosomal (ARNr) 28S y diversos ARNm, inhibe la síntesis proteica (RIDD, del inglés: *Regulated IRE1-Dependent Decay*). En particular IRE1 realiza el corte y empalme (*splicing*) no-convencional del ARNm del factor de transcripción XBP1 (del inglés: *X-box Binding Protein 1*) (65). Un intrón de 26 nucleótidos es escindido del ARNm del XBP1 (uXBP1) de manera independiente al *spliceosoma*, resultando el ARNm de sXBP1 con un marco de lectura alterado (65). sXBP1, es un potente factor de transcripción, que se une a una región específica del promotor que contiene el elemento de respuesta al estrés del RE (ERSE, del inglés: *Endoplasmic Reticulum Stress Response Elements*) aumentando la producción de chaperonas (65, 66) y también a un segundo motivo regulador en cis del promotor de los UPR (del inglés: *Unfolded Protein Response Element*) (66) promoviendo la expresión de genes involucrados en la ERAD.

La actividad quinasa de IRE1 produce su autofosforilación e IRE1 fosforilado recluta a TRAF2 (del inglés: *Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 2*) y ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*), los cuales conducen a la activación de JNK (del inglés: *c-Jun N-terminal Kinase*), quinasa

activada por diversos inductores de estrés (45). Otra enzima activada por la vía IRE1/TRAF/ASK1 es la caspasa-12 (67). Como se detallará más adelante JNK y caspasa-12 se asocian a mecanismos pro-apoptóticos.

Trabajos recientes, identificaron a IRE1 α co-localizando con RyR2 e interaccionando con calsecuestrina en las cisternas del RS (68) y con el IP3R en los MAM (69), demostrando funciones desconocidas hasta el momento y no canónicas para este efector de la UPR.

1.3.4. Vía de ATF6

ATF6 se encuentra en el RE como oligómeros unidos por puentes disulfuro y asociados a GRP78, lo cual impide su tráfico hacia el Golgi (70). En respuesta al estrés de RE, los puentes disulfuro son reducidos, facilitando la formación de monómeros de ATF6 (70) que junto con la desunión de GRP78 (71) permiten la migración de ATF6 al Golgi. En esta organela, ATF6 es clivado en el dominio de transmembrana por las proteasas de sitio-1 y sitio-2 (S1P y S2P) (71). Esta proteólisis libera el dominio citosólico, N-ATF6 α , que se transloca al núcleo y actúa como un factor de transcripción soluble del tipo cremallera de leucina básica (bZIP), e induce la expresión de numerosos genes de proteínas vinculadas al estrés de RE (GRP78, XBP1, proteínas de la ERAD) (72). Además promueve la expresión de proteínas no residentes en el RE, vinculadas al manejo del Ca⁺² y a la defensa antioxidante (42, 73).

Hay dos isoformas de ATF6 (ATF6 α y ATF6 β), que tienen diferente actividad transcripcional. ATF6 α es un activador transcripcional eficiente mientras que ATF6 β parece jugar un rol de regulación sobre la respuesta temporal de ATF6 (74). Recientemente se ha descrito que tanto ATF6 α como ATF6 β serían importantes en la mayor demanda de síntesis proteica asociada a la hipertrofia que ocurre en respuesta a una sobrecarga de presión (75).

1.4. Injuria por isquemia y reperfusión

El aporte sanguíneo inadecuado o insuficiente al miocardio se denomina isquemia miocárdica. La falta de oxígeno y nutrientes genera alteraciones metabólicas que pueden dar lugar en última instancia a la muerte celular. En este contexto, se hace mandatorio, reestablecer el flujo sanguíneo (reperfusión) para limitar el daño miocárdico; sin embargo, la reperfusión por sí misma puede generar y/o exacerbar la injuria. Este daño adicional se denomina “injuria por reperfusión” (76, 77) y hace referencia a los efectos deletéreos producidos por la restitución del flujo sanguíneo que no fueron consecuencia del período isquémico. Entre ellos podemos mencionar la aparición de arritmias, la depresión de la función contráctil y el incremento de la muerte celular.

Los estudios experimentales han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y reperfusión (I/R). Las alteraciones que la I/R provoca sobre la estructura y función del corazón, varían dependiendo del tiempo de duración y la severidad de la isquemia. Luego de períodos muy breves de oclusión global o regional del flujo coronario, por ejemplo 5 min, el corazón recupera su función contráctil sin presentar daño tisular una vez reperfundido. Si el período de isquemia se extiende por más tiempo, por ejemplo 15-20 min y dependiendo de la especie animal, el corazón presenta una función contráctil deprimida luego de la restauración del flujo coronario, a pesar de la ausencia de daño tisular irreversible. A esta disfunción contráctil que es transitoria se la denomina “miocardio atontado” (del inglés: *stunning*) (78, 79). Si la isquemia se prolonga aún más tiempo (por ejemplo, más de 20 min en la rata), la reperfusión genera un daño irreversible en el corazón, conduciendo a la muerte celular del tejido afectado (80).

En el presente trabajo de Tesis, centraremos nuestros estudios en un modelo experimental de miocardio atontado. La relevancia clínica de este fenómeno, que no es una entidad única sino un síndrome, reside en que se presenta en situaciones tales como la reperfusión espontánea luego de espasmos coronarios o isquemia post-ejercicio, reperfusión coronaria por terapia trombolítica, por angioplastia percutánea transluminal, luego del paro cardiopléjico para la cirugía cardíaca o el “bypass” de arterias coronarias (81-83).

En las próximas secciones describiremos los aspectos fisiopatológicos más relevantes del atontamiento miocárdico.

1.4.1. Injuria reversible por isquemia/reperfusión. Bases moleculares del atontamiento miocárdico

Los eventos moleculares que desembocan en el fenotipo del corazón atontado aún no han sido totalmente esclarecidos y se proponen dos hipótesis plausibles (Figura 6): 1) La hipótesis del Ca^{+2} (sobrecarga de Ca^{+2}) postula que el atontamiento miocárdico es el resultado de una alteración en la homeostasis de este ion (84, 85) y 2) La hipótesis de los radicales libres sostiene que el atontamiento es causado por especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (EROs/ERNs). Ambas alteraciones, sobrecarga de Ca^{+2} y producción de radicales libres, ocurren principalmente al inicio de la reperfusión (86-88). Las dos hipótesis planteadas no son, por lo tanto, mutuamente excluyentes y pueden representar diferentes aspectos del mismo proceso fisiopatológico (80).

Durante la isquemia, la falta de aporte de oxígeno frena la producción de ATP resultante de la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial y las células se ven forzadas a realizar glucólisis anaeróbica para mantener una síntesis residual de ATP. Ésto provoca una rápida acumulación de lactato y protones (H^+) que disminuyen el pH intracelular (pH_i) (89, 90). En corazones de rata, luego de 20 minutos de isquemia, el pH_i desciende de 7,2 a aproximadamente 6,4 (91, 92). La acidosis intracelular activa al intercambiador Na^+/H^+ de membrana (NHE-1) que intenta recuperar el pH_i , al extruir H^+ a expensas del ingreso de Na^+ al interior celular. Pero su acción se ve limitada por la acumulación de H^+ en el espacio extracelular (93, 94). Por otra parte la depleción energética inhibe tanto a la bomba Na^+/K^+ ATPasa, que impide que el Na^+ egrese de la célula (95-97) como a la bomba de Ca^{+2} del RS (SERCa2a), que recaptura el Ca^{+2} hacia su interior, conduciendo a aumentos progresivos del Na^+ y Ca^{+2} citosólicos.

La restauración del flujo miocárdico produce la recuperación de la actividad respiratoria y por lo tanto la disponibilidad del ATP para el accionar de las bombas. Sin embargo, la reperfusión induce una sobrecarga aún mayor de Na^+ y Ca^{+2} citosólicos que la que ocurre durante la isquemia. La normalización del pH extracelular provoca la reactivación completa del NHE-1 que junto con el accionar de otros mecanismos de corrección de acidosis intracelular, como el co-transporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, pueden eliminar los H^+ acumulados en la isquemia ingresando Na^+ a la célula. Este aumento del Na^+ modifica la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ en sus dos modos de acción, ya sea disminuyendo su modo "directo" de funcionamiento (eliminando Ca^{+2} de la célula) o aumentando su modo "inverso" de funcionamiento (promoviendo la entrada de Ca^{+2} a la célula) (98). Además, estudios de nuestro grupo, mostraron que al inicio de la reperfusión ocurre una

masiva liberación de Ca^{+2} del RS (99). Como resultado de estos mecanismos, una gran cantidad de Ca^{+2} se acumula en el corazón reperfundido, que según la hipótesis del Ca^{+2} , sería el disparador del daño post-isquémico del miocardio atontado. Se ha descrito que la sobrecarga de Ca^{+2} conduce a la activación de calpaínas, proteínas tiol-proteasas dependientes de Ca^{+2} . Debido al accionar de estas enzimas, hay un aumento de la fragilidad del sarcolema, con hinchamiento celular y reducción de la tolerancia al estrés mecánico, por la degradación de proteínas del citoesqueleto como α -fodrina y α -anquirina (100-102). Además, se ha propuesto que las calpaínas alteran el manejo de Ca^{+2} mediante el clivaje de RyR2 y SERCA2a (103, 104) y la sensibilidad al Ca^{+2} de los miofilamentos mediante la degradación de la troponina I (84). Mientras que en mamíferos grandes, el atontamiento miocárdico se acompaña de una disminución del transitorio de Ca^{+2} con alteración del manejo de Ca^{+2} por parte del RS (105, 106), en roedores el Ca^{+2} intracelular retorna a niveles pre-isquémicos a pesar de persistir la disfunción contráctil (86, 107, 108) sugiriendo una menor respuesta de los miofilamentos al Ca^{+2} .

Por otra parte la hipótesis de las EROs sostiene que ellas son las responsables del daño por I/R. Las EROs se elaboran continuamente como producto del metabolismo normal de la célula, pero son inactivadas por un conjunto de mecanismos antioxidantes enzimáticos y de atrapamiento. En ciertas condiciones como en la I/R, la generación de las EROs se incrementa y/o disminuyen las defensas antioxidantes, generándose el estrés oxidativo que trae como consecuencia el daño celular por oxidación de distintas macromoléculas. Las principales fuentes de EROs involucradas en la I/R son: las mitocondrias, las NADPH oxidasas (Nox) y la xantina oxidoreductasa (XOR).

En órganos metabólicamente activos como el corazón, las mitocondrias son la fuente más importantes de EROs (109-111). La cadena transportadora de electrones es una serie de complejos ubicados en la matriz mitocondrial interna (del I al IV), acoplados a transportadores móviles (coenzima Q y citocromo c), que reciben y transfieren electrones basados en su potencial redox y la disminución de la energía libre. Durante el metabolismo oxidativo normal, la transferencia incompleta de electrones al O_2 genera pequeñas cantidades de EROs (0,1-2 % del O_2 consumido) principalmente a nivel de los complejos I y III (112, 113). Éstos son eficientemente neutralizados por los mecanismos de defensa antioxidantes. Sin embargo durante la I/R, el enlentecimiento de la cadena transportadora aumenta la producción de EROs que resultan de la reducción univalente del O_2 y son sucesivamente: el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical

hidroxilo (HO^*), uno de los oxidantes más potentes. En estas condiciones, los niveles acumulados sobrepasan al sistema antioxidante y se desencadena el estrés oxidativo.

La familia de las Nox también ha sido implicada en la producción de EROs en la I/R miocárdica (114, 115). Tanto la Nox2 del sarcolema, como la Nox4, localizada en membranas de organelas intracelulares, aumentan su expresión y actividad en el miocardio post-isquémico (116) y producen H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ (114, 115). La supresión de una u otra isoforma resultó efectiva en reducir la excesiva producción de EROs y la injuria por I/R (117). Sin embargo, la supresión simultánea de ambas isoformas exacerbó el daño, sugiriendo que se requiere una cierta cantidad de EROs derivadas de Nox2 o Nox4 para sostener vías de adaptación y protección frente a la I/R (118).

Finalmente también se ha propuesto que la XOR contribuye a la producción de EROs durante la I/R (87). En mamíferos, la XOR existe como dos formas interconvertibles, la xantina deshidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO). En condiciones normales predomina la XDH que utiliza el NAD^+ como aceptor de electrones. Pero luego de un período de isquemia, la acumulación de hipoxantina (producto del catabolismo del ATP) y el retorno del suministro de O_2 durante la reperfusión, activa a la XO que utiliza al O_2 como aceptor final de electrones y genera $\text{O}_2^{\cdot-}$ (119, 120). No obstante, las evidencias experimentales que avalan la contribución de la XO a la producción global de EROs y al daño por I/R en el corazón son aún contradictorias (87, 119). Es posible que su actividad sea relevante en regular el estado redox en el microambiente de ciertos compartimentos intracelulares (121).

Debido a su alta inestabilidad, los radicales libres son difíciles de detectar y por ello el estrés oxidativo se evalúa generalmente a través del daño que provoca sobre las distintas macromoléculas: lípidos, ácidos nucleicos y proteínas o mediante la cuantificación de la depleción de sustancias antioxidantes (122-124). La peroxidación lipídica, detectada mediante la presencia de productos de la misma, como malondialdehído, dienos conjugados e hidroxienol, es una marca ampliamente utilizada de presencia de EROs en diferentes modelos de I/R (125-127). La oxidación de grupos sulfhidrilos de proteínas y de glutatión, el principal antioxidante citosólico, es también evidencia del aumento del estrés oxidativo y del desbalance redox producidos por la I/R en diferentes tejidos (128-131).

Las ERNs son moléculas reactivas principalmente derivadas del óxido nítrico (NO^*). El NO^* se produce a partir de L-arginina por acción de las óxido nítrico sintasas, NOS1 (NOS neuronal o nNOS), NOS2 (NOS inducible, o iNOS), y NOS3 (NOS endotelial, o eNOS). Mientras que los cardiomiocitos expresan constitutivamente NOS1 y NOS3 en diferentes estructuras subcelulares, la expresión de

la NOS2 inducible puede ser gatillada por diversos estímulos, incluyendo infecciones, insuficiencia cardíaca o I/R (132-134). A partir del NO* se pueden formar otras especies reactivas, como el nitroxilo (HNO) y el peroxinitrito (ONOO-) que pueden afectar la función y/o estructura del miocardio (132-136).

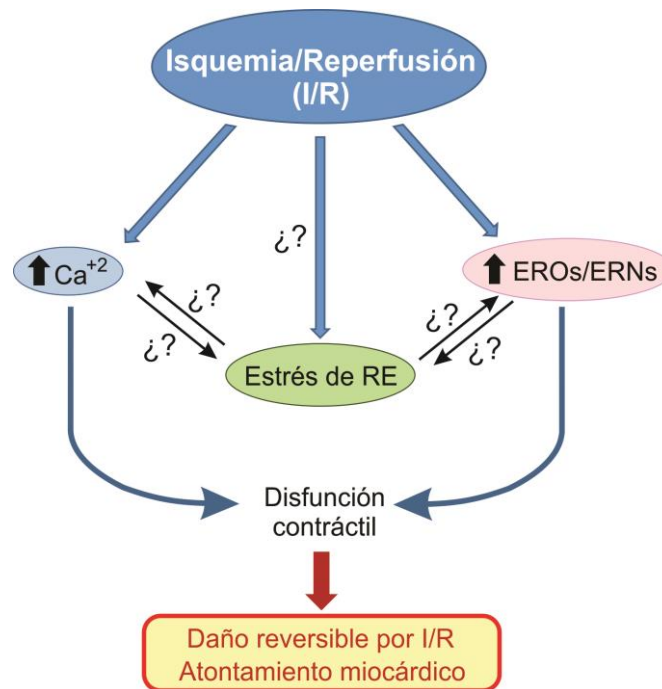


Figura 6. Esquema de la secuencia de eventos que conducen a la disfunción contráctil en el atontamiento miocárdico y su potencial vinculación con el estrés de RE.

Las alteraciones en el manejo de Ca^{+2} intracelular y los aumentos del estrés oxidativo que subyacen al atontamiento cardíaco, son también estímulos disparadores de estrés de RE. Sin embargo se desconoce si durante el atontamiento hay estrés de RE y si éste contribuye a la sobrecarga de Ca^{+2} intracelular y aumento de EROs/ERNs que condicionan la disfunción contráctil característica de esta entidad nosológica (Figura 6).

1.4.2. Injuria irreversible por isquemia/reperusión. Mecanismos de muerte celular

Cuando el episodio isquémico se torna más severo o prolongado, el corazón resulta incapaz de producir suficiente energía vía glicólisis, y la muerte celular sobreviene.

De los numerosos mecanismos de muerte celular descritos (137) necrosis y apoptosis son los más frecuentes y mejor estudiados en la injuria por I/R.

1.4.2.1. Necrosis

La necrosis celular se caracteriza por la pérdida de integridad de la membrana celular, edema de organelas, caída en la producción de ATP y extrusión de componentes intracelulares al espacio intersticial con la consecuente reacción inflamatoria (138). En el tejido cardiaco, la detección en suero de enzimas como la lactato deshidrogenasa (LDH), la creatinfosfoquinasa y sus isoenzimas, y proteínas no enzimáticas como las troponinas cardíacas, son marcadores de necrosis tisular (139, 140).

Tradicionalmente se ha considerado a la necrosis como un proceso pasivo, no regulado (141, 142), sin embargo, evidencia reciente ha demostrado que ésta puede ser también programada, en un proceso conocido como necroptosis (141, 142).

1.4.2.2. Apoptosis

La apoptosis, en cambio, es un proceso activo, finamente regulado y caracterizado por condensación y fragmentación de la cromatina, contracción o encogimiento celular y formación de “brotos” de membrana plasmática conteniendo restos celulares que son liberados como cuerpos apoptóticos al espacio intersticial para ser fagocitados por macrófagos u otras células. Debido a que no hay liberación de componentes intracelulares, existe poca o nula respuesta inflamatoria (143).

El mecanismo de la apoptosis es extremadamente complejo, ya que son múltiples las moléculas que promueven la muerte celular amplificando efectos en cascada y retroalimentación positiva con el fin de asegurar que una vez iniciado el proceso, éste sea rápido, fatal y en cierto punto irreversible.

La activación de la apoptosis se puede realizar mediante varias rutas no excluyentes entre sí: la denominada vía extrínseca o del receptor de muerte, la vía intrínseca o mitocondrial, y la vía dependiente del RE. Todas ellas convergen en la activación de una serie de proteasas denominadas caspasas (del inglés: *Cysteine Aspartyl-specific proteases*). Las caspasas están constitutivamente expresadas en la célula como pro-caspasas o zimógenos inactivos y se clasifican en función de su estructura, la secuencia temporal de su activación y el mecanismo de acción, en dos subgrupos: caspasas iniciadoras 2, 8, 9, 10, 12 y caspasas ejecutoras o efectoras 3, 6 y 7 (144, 145). El punto de confluencia de las tres vías de la apoptosis es la activación de las caspasas ejecutoras, encargadas

de fragmentar los componentes celulares clivando varias proteínas y produciendo los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de la apoptosis. Un ejemplo es la activación de endonucleasas que segmentan el ADN entre nucleosomas formando oligonucleosomas (180-200 pares de bases (146)).

La vía extrínseca se inicia por ligandos, solubles o presentes en las membranas de diversas células, siendo los más conocidos Fas, y el factor de necrosis tumoral $TNF\alpha$ (del inglés: *Tumor Necrosis Factor*) (147). La unión de los ligandos a sus receptores específicos recluta a la proteína adaptadora FADD (del inglés: *Fas-Associated Death Domain*) o TRADD (del inglés: *TNFR-Associated Death Domain*) respectivamente, provocando la activación de las pro-caspasas-8 o 10 que a su vez escinden y activan a otras pro-caspasas como la caspasa-3, corriente abajo. En algunas células, la vía extrínseca puede conectarse con la vía intrínseca. La caspasa-8 puede hidrolizar a la proteína Bid, cuya forma truncada, tBid, transloca a la mitocondria y dispara la liberación de citocromo c, evento crucial en el proceso apoptótico mitocondrial como veremos en el próximo párrafo (148).

La vía intrínseca, también denominada vía mitocondrial, es activada por diversos estímulos tales como estrés oxidativo, radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, daño del ADN, sobrecarga de Ca^{+2} , etc. (149). Esta vía está regulada por integrantes de la familia de proteínas Bcl-2 (del inglés: *B-Cell Lymphoma2*) entre las cuales hay miembros anti y pro-apoptóticos. Los antiapoptóticos son: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, y A1/BFL-1 y los pro-apoptóticos incluyen a: Bax, Bak, Bok y las proteínas BH3 "only" (del inglés: *Bcl-2 Homologydomain3*), abarcando a Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa, PUMA y HRK. Si la expresión o activación de los miembros pro-sobrevivencia de la familia Bcl-2 prevalece por sobre la activación de los miembros pro-apoptóticos, se produce la interrupción de los mecanismos de muerte celular (150). Sin embargo, si los estímulos deletéreos son suficientes, la activación transcripcional o post-transcripcional de los efectores BH3-"only" transmiten la señal de muerte mediante Bax y Bak. La relación entre Bcl-2 o Bcl-xL/ Bak o Bax es la que va a determinar entonces si la apoptosis ocurre o no (151). Bcl2, es el principal miembro anti-apoptótico y se encuentra ubicado en la membrana mitocondrial, en la membrana del RE y en la envoltura nuclear (Krajewski et al., 1993). Bax se localiza en el citosol, en tanto Bak, está anclado en la membrana mitocondrial externa interaccionando con la proteína llamada VDAC 2 (del inglés: *Voltage-Dependent Anion Channel 2*), formando el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) en estado inactivo.

Cuando mecanismos aún no claramente dilucidados activan las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, éstas se oligomerizan, Bax se inserta en la membrana mitocondrial externa y Bak se separa de VDAC 2, procesos que conducen a la formación de un poro activo, lo que constituye un punto de no retorno (152, 153), con liberación de proteínas desde el espacio intermembranoso hacia el citosol. Entre ellas el citocromo c, que en conjunto con APAF-1 (del inglés: *Apoptotic Protease Activating Factor-1*) conforman un complejo multiproteico denominado apoptosoma que activa a la procaspasa-9 (154, 155). Una vez activada, caspasa-9 hidroliza y activa a caspasas ejecutoras como la caspasa-3 (156) y la caspasa-7. Otros factores que se liberan a través del poro son las proteínas pro-apoptóticas Smac/DIABLO y Omi/HtrA2, que interaccionan y desactivan a proteínas inhibitorias de las caspasas (157, 158).

La caspasa 3, a su vez proteoliza y activa a la endonucleasa CAD (del inglés: *Caspase-Activated DNase*) que transloca al núcleo y degrada el ADN cromosomal como se describió previamente. La endonucleasa también es responsable de la condensación de la cromatina, la reorganización del citoesqueleto y la desintegración celular en cuerpos apoptóticos, por su acción sobre distintas proteínas (149, 159, 160).

La vía de apoptosis relacionada al estrés de ER es menos conocida. Se ha demostrado que cuando el estrés de RE es excesivo y la UPR es incapaz de corregir la falencia en la homeostasis del RE, la señalización apoptótica mediada por CHOP se activa (Figura 7). Como ya vimos, CHOP es un factor de transcripción regulado por la vía de PERK. CHOP puede inhibir la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (161) y activar la transcripción de la pro-apoptótica Bim para inducir la apoptosis mitocondrial (162). Adicionalmente, CHOP media la inducción transcripcional de numerosos genes que codifican para proteínas que indirectamente conducen a la apoptosis mitocondrial como GADD34, el receptor de muerte 5 y la oxidorreductasa 1 del RE (ERO1 α) (26). GADD34 es una proteína de anclaje que al reclutar a la fosfatasa PP1 facilita la defosforilación de eIF2 α , revirtiendo de este modo la inhibición de la síntesis proteica (163). Esto permite la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE e incrementa la traducción de proteínas pro-apoptóticas. A través de la inducción de ERO1 α , CHOP exagera el estrés oxidativo y promueve la liberación de Ca⁺² desde el RE por activación de receptores de IP3 (164, 165), dos mecanismos promotores de apoptosis mitocondrial.

Como mencionamos anteriormente, IRE1 media la apoptosis por la interacción con la proteína adaptadora TRAF2 y la quinasa de regulación de señal apoptótica ASK1, lo cual conduce a la

activación de JNK y caspasa-12 (45, 166). JNK fosforila a la proteína anti-apoptótica Bcl-2 que al disociarse de Bax promueve la formación de poros (Bax-Bak) tanto en la mitocondria como en la membrana del RE alterando la homeostasis del Ca^{+2} en estas organelas. Caspasa-12 podría activar a la caspasa-9 para inducir la activación de caspasa-3. Por otra parte, si bien IRE1, a través de RIDD promueve la degradación de numerosos ARNm y contribuye a reducir la carga proteica durante el estrés de RE (167, 168), su activación prolongada llevará a la inhibición de la expresión de genes que codifican para proteínas pro-sobrevida, favoreciendo la apoptosis (169, 170).

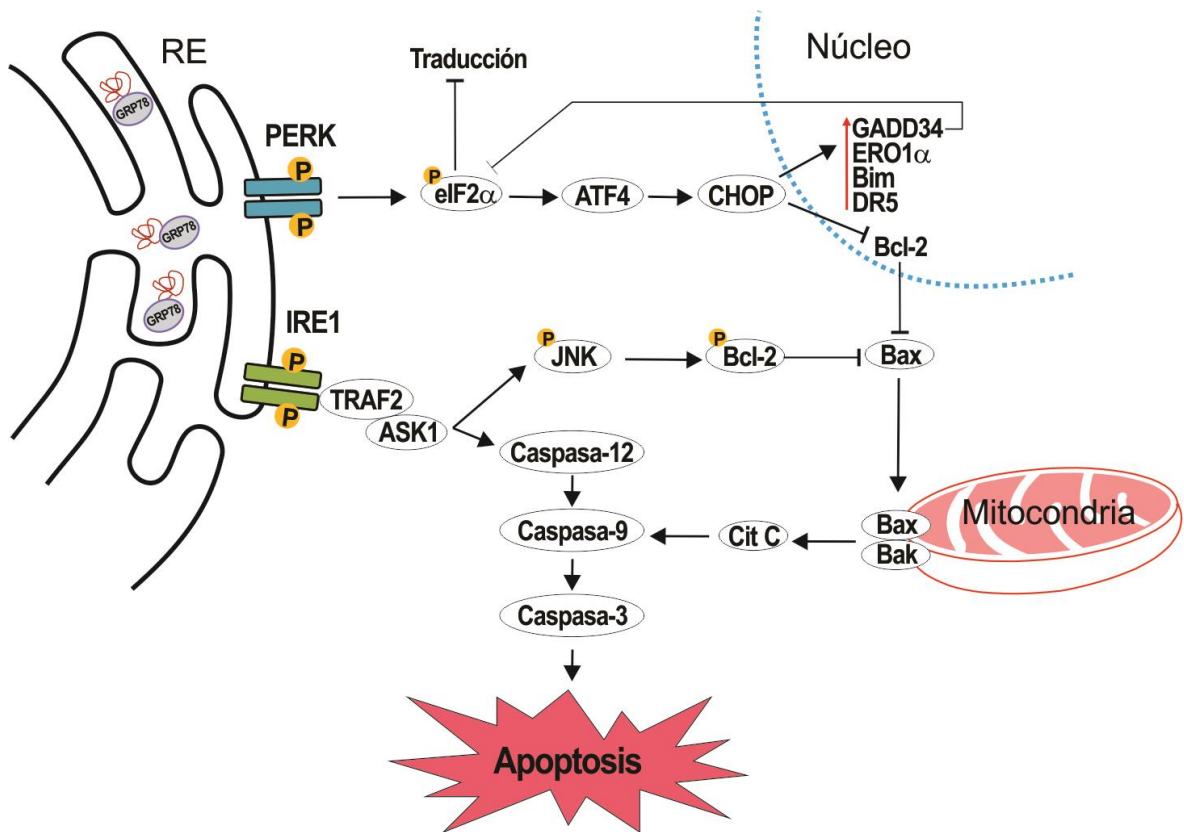


Figura 7. Vías pro-apoptóticas inducidas por un estrés severo del RE. Cit C: citocromo c, DR5: receptor de muerte 5.

1.5. Estrés de retículo endoplasmático y respuesta a las proteínas mal plegadas en la isquemia/reperfusión miocárdica

Es mucha la evidencia experimental que demuestra la activación de las distintas vías de la UPR en el corazón sometido a insulto isquémico severo y/o crónico (171).

Bajo condiciones de isquemia o hipoxia prolongada, la activación de la vía PERK quedó demostrada por el aumento de CHOP a nivel de ARNm y proteína (172, 173). Experimentos de Miyazaki y col. (174) demostraron que corazones de ratón deficientes en CHOP presentan un menor tamaño de infarto y una reducción del número de cardiomiocitos apoptóticos respecto a los ratones salvajes, luego de ser sometidos a una oclusión coronaria de 50 minutos seguida de reperfusión. Estos resultados confirman el rol pro-apoptótico de CHOP en respuesta a insultos isquémicos prolongados. En línea con estos hallazgos, se ha visto un aumento en la expresión de CHOP en pacientes con insuficiencia cardíaca de origen isquémico (175, 176).

La participación de la vía de ATF6 fue demostrada en numerosas investigaciones utilizando diversas herramientas genéticas y farmacológicas en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (73, 173, 177-180). En los distintos modelos utilizados (sobrexpresión de ATF6, inhibición farmacológica de su clivaje y activación, ratones carentes de ATF6) los resultados indicaron un rol protector de esta vía frente al daño por I/R. La activación de ATF6 mejoró la recuperación contráctil, disminuyó el tamaño de infarto y la apoptosis, y mejoró la supervivencia. Las alteraciones en la expresión de ATF6 fueron acompañadas por cambios en el mismo sentido de los niveles de GRP78, lo que podría explicar en parte su rol cardioprotector. La sobreexpresión de otras chaperonas y enzimas de plegamiento, como GRP94 y miembros de la familia de las PDI, así como proteínas componentes de la maquinaria de degradación ERAD, reguladas por ATF6 también podrían contribuir en este efecto beneficioso (181, 182).

Otro de los efectos de ATF6 es la inducción transcripcional de la bomba de Ca^{+2} SERCA2a (183) que podría ayudar a mitigar la sobrecarga de Ca^{+2} durante la I/R cardíaca. Sin embargo el rol de la SERCA2a en la protección debida a ATF6 no está aún completamente definido (184). Evidencia reciente sugiere que ATF6 también podría atenuar la injuria por I/R mediante la disminución directa de las EROs (73). En ventrículos de corazones de ratones que sobreexpresan ATF6, se evidenció un aumento de la expresión de múltiples genes antioxidantes que codifican para proteínas no residentes del RE, como catalasa, selenoproteína-S, y tioredoxina-reductasa-1. La expresión

incrementada de estos genes antioxidantes podría explicar la reducción del daño asociado a EROs en la I/R.

La mayoría de los estudios referidos a la vía IRE1 en la I/R miocárdica, se centran principalmente en el rol que cumple sXBP1. Utilizando modelos de ratón sometido a I/R, Wang y col. (185) demostraron un aumento de la expresión del ARNm de sXBP1 a los 5 minutos de reperfusión luego de la ligadura de la coronaria izquierda por 45 minutos. También mostraron que ante un insulto isquémico, la muerte de cardiomiocitos y el remodelamiento cardíaco patológico fue mayor en ratones *knockout* para el gen de XBP1 que en los controles respectivos, y que además, la sobreexpresión de sXBP1 en ratones transgénicos, redujo alrededor del 50% el área infartada. La cardioprotección asociada a sXBP1 podría estar vinculada en parte a la inducción de chaperonas como GRP78.

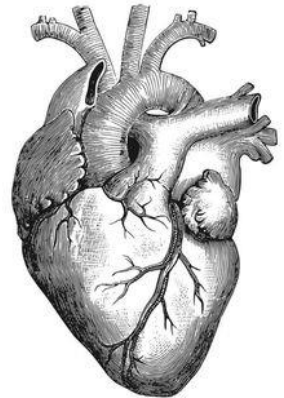
El efecto protector de XBP1 demostrado en modelos *in vivo* coincide con lo descrito previamente en cultivos de cardiomiocitos neonatales de rata sometidos a hipoxia/reoxigenación (173). El tratamiento de estos cultivos con un adenovirus codificando para una forma dominante-negativa de XBP1, inhibió la activación de los genes regulados por sXBP1, como GRP78, y aumentó la apoptosis. sXBP1 puede además disminuir el daño isquémico mediante la regulación de la proliferación endotelial y la angiogénesis. Se ha demostrado que la activación transitoria de sXBP1 puede incrementar la proliferación de las células endoteliales (186).

Sin embargo, como mencionamos anteriormente, el estrés persistente puede causar la activación de vías pro-apoptóticas de la cascada de IRE1 (45, 166). Éstas no han sido clarificadas en el contexto de injuria miocárdica por I/R, aunque se ha implicado a JNK (un efector corriente debajo de IRE1) en la activación de la autofagia (187).

Como vimos, GRP78 es un efector común en el camino protector de las vías de UPR en la I/R. Además de favorecer la proteostasis celular y evitar la activación de las señales pro-apoptóticas, se han postulado nuevos mecanismos mediante los cuales podría ejercer su rol beneficioso frente a la I/R. En un trabajo reciente, Bi y col. (188) demostraron que su sobreexpresión mejora la función cardíaca en ratones sometidos a I/R a través de la activación de Akt (también conocida como Proteína Quinasa B), una quinasa central en la regulación de la supervivencia celular (189-192). En otro trabajo Ouyang y col. establecieron que GRP78 también mejora la función mitocondrial en modelos celulares de isquemia (193).

Todos estos estudios confirman que la UPR es gatillada en el miocardio bajo condiciones de I/R que conducen a la muerte celular. Sin embargo, se desconoce si la respuesta al estrés de RE es activada en condiciones de I/R moderada no asociada con daño celular irreversible, como ocurre en el miocardio atontado.

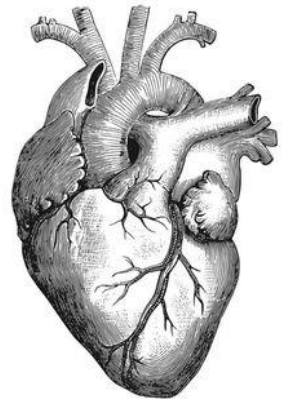
2. Hipótesis



De acuerdo con el estado actual del tema, las hipótesis de este Trabajo de Tesis son que en el atontamiento miocárdico:

1. Se produce estrés de RE y consecuentemente activación de la UPR.
2. La activación de la UPR involucra una respuesta adaptativa que tiende a reparar el daño y recuperar la homeostasis del RE.
3. La inhibición del estrés de RE afecta la recuperación contráctil post-isquémica.

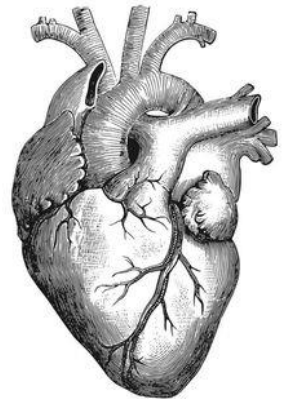
3. Objetivos



El objetivo general de este Trabajo de Tesis fue caracterizar el estrés de RE en la injuria por I/R. Nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la presencia de la UPR en el corazón atontado.
2. Comparar esta respuesta con la que ocurre en la injuria irreversible por I/R.
3. Estudiar el impacto del estrés de RE en el corazón atontado, mediante el uso de chaperonas químicas.

4. Materiales y Métodos



Para el desarrollo de este trabajo, se realizaron experimentos en ratas Wistar macho (*especie Ratus Norvegicus*) de 3-5 meses de edad (200-400 g de peso corporal). Los animales fueron alimentados y mantenidos en nuestro bioterio de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, 2011). Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (Nro T05022014).

4.1. Experimentos ex vivo: corazones intactos

Para este estudio, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de uretano 1mg/kg. Una vez comprobado el plano quirúrgico de anestesia (verificado por la pérdida del reflejo podal de retirada y/o del reflejo corneal) se realizó una toracotomía central, y se inyectó en el ápice del corazón heparina sódica (2,5 unidades/g) para mantenerlo anti-coagulado. Se procedió luego a canular la aorta, removiéndose rápidamente los corazones para su perfusión por la técnica de Langendorff, a temperatura (37°C) y flujo (14 ml/min) constantes. La perfusión fue realizada con una solución fisiológica de bicarbonato compuesta por (en mM): 128,3 NaCl; 4,7 KCl; 1,35 CaCl₂; 20,2 NaHCO₃; 0,4 NaH₂PO₄; 1,1 MgSO₄; 11,1 glucosa y 0,04 Na₂EDTA. Esta solución fue equilibrada con 95% O₂ - 5% CO₂ hasta alcanzar a un pH de 7,4, como se describió previamente (194). Posteriormente se realizó la ablación el nódulo aurículo-ventricular y se colocaron electrodos para mantener una frecuencia constante de 4Hz. Para evaluar la actividad mecánica del corazón se introdujo un balón de látex dentro del ventrículo izquierdo (VI) que se conectó a un traductor de presión (AD Instruments MLT 0380, CO, USA). El balón se llenó con una solución acuosa hasta conseguir una presión diastólica final (PDFVI) entre 5-10 mmHg. La contractilidad se evaluó mediante la presión desarrollada por el VI (PDVI) y su primera derivada, la máxima velocidad de desarrollo de la presión (+dP/dt). La relajación fue evaluada a través del tiempo medio de relajación ($t_{1/2}$) (194).

4.2. Protocolos experimentales.

Isquemia/Reperfusión

Una vez montados en el equipo de Langendorff, los corazones fueron perfundidos hasta lograr la estabilización mecánica durante 10 minutos (Pre-Isquemia), sometiéndolos a continuación, a la interrupción total del flujo coronario (isquemia global normotérmica, Isq) durante un período de

20 minutos (*protocolo de atontamiento*) o 30 minutos (*isquemia irreversible*) (Figura 8). En ese lapso el corazón dejó de ser estimulado eléctricamente. Finalizados los períodos de isquemia, se restauró la perfusión coronaria (reperfusión, R) por 30 o 60 minutos y simultáneamente, la estimulación eléctrica. Al finalizar la R, los corazones fueron congelados en N₂ líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de las determinaciones bioquímicas que permitieron evaluar la expresión y actividad de diferentes proteínas por Western blot, o los niveles de ARNm por qRT-PCR.

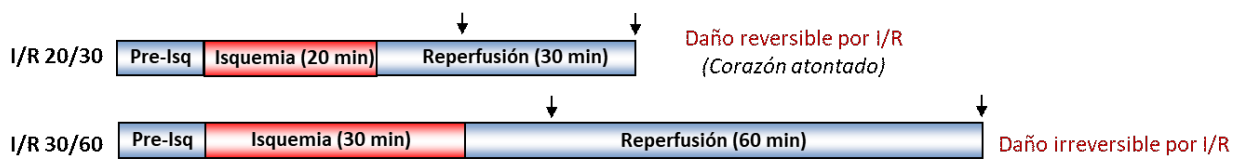
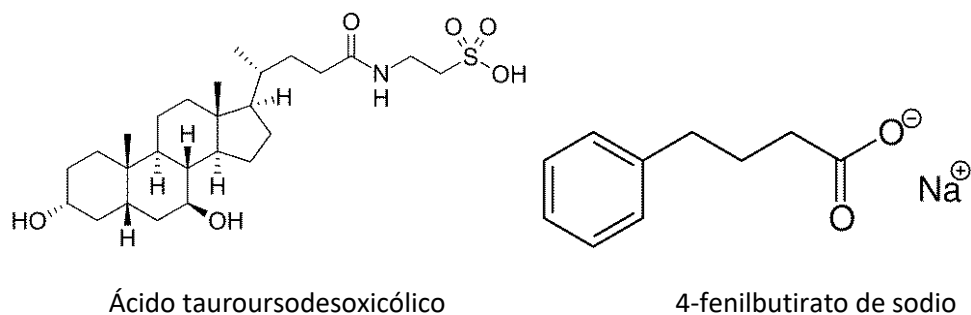


Figura 8. Esquema de los protocolos de I/R.

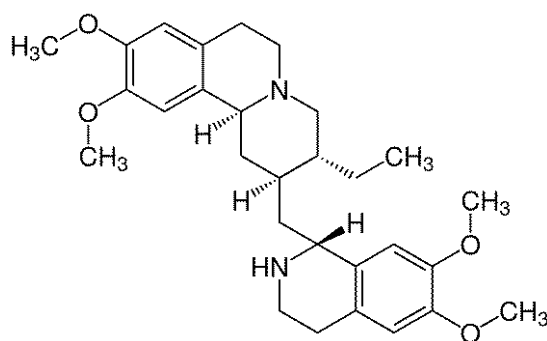
Un grupo de corazones, estabilizados y perfundidos durante un período de tiempo idéntico al de los protocolos de I/R, fue utilizado como control no isquémico.

El protocolo de daño reversible por I/R (corazón atontado) se realizó además en presencia de distintas drogas (Figura 9) que fueron perfundidas o bien sólo durante el período de reperusión [4-fenilbutirato de sodio (4-PBA) y ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA)] o bien durante los 5 minutos previos a la isquemia (emetina). Las concentraciones utilizadas fueron seleccionadas de acuerdo a experimentos previos y a la bibliografía (195-197): 30 μ M TUDCA, 3 mM 4-PBA y 0,5 μ M emetina.



Ácido tauroursodesoxicólico

4-fenilbutirato de sodio



Emetina

Figura 9. Estructura química de los fármacos utilizados.

El TUDCA es un ácido biliar, cuyo uso está aprobado para el tratamiento de colestasis hepática (198). El 4-PBA es un ácido graso de bajo peso molecular que se emplea clínicamente en trastornos del ciclo de la urea (198). Tanto TUDCA como 4-PBA son chaperonas químicas y su mecanismo de acción se basa en la interacción de sus regiones hidrofóbicas con los segmentos hidrofóbicos expuestos de las proteínas mal plegadas, evitando de esta manera la agregación de proteínas y como consecuencia el estrés de RE (199). Estos compuestos habían sido utilizados previamente en corazones sometidos a protocolos de I/R con daño irreversible (195, 196).

Por otro lado, la emetina es un alcaloide inhibidor de la fase de elongación de la traducción proteica, que al detener a los ribosomas hace que el translocón permanezca sellado por el complejo ribosoma-polipéptido naciente. De esta manera, bloquea la síntesis proteica e inhibe la pérdida de Ca^{+2} por el translocón (200).

4.3. Determinación de LDH

Fundamento

Lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima intracelular y por lo tanto su aumento en el efluente coronario es índice de daño tisular. La técnica para su detección, se basa en la reacción dependiente de nucleótido de adenina que transforma al piruvato en L-lactato y es catalizada por la enzima LDH.

Procedimiento

La concentración de LDH fue medida con el kit comercial de Boehringer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) por muestreo del efluente a los 10 minutos de la reperfusión (201). Brevemente, se agregaron 3 ml de 0,2 mM NADH (reconstituido en buffer 80 mM Tris; pH 7,2) en una cubeta termostatzada a 25°C y 100 µl de la muestra. Se mezcló y preincubó por 30 segundos, luego de los cuales se midió la absorbancia inicial y el cambio de DO/min durante los siguientes tres minutos (pendiente cinética) a 340 nm. Para realizar los cálculos de la actividad de LDH se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times \text{factor}$$

El factor de cálculo varía dependiendo de la temperatura de reacción que en nuestro caso fue de 25°C.

4.4. Determinación del tamaño de infarto

Fundamento

El cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) es convertido a rojo de formazán por la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, tiñendo de rojo oscuro el tejido viable. Dado que en las células necróticas no hay actividad de las deshidrogenasas, la zona infartada se apreciará como una zona pálida.

Procedimiento

Luego del período de reperfusión, los corazones fueron perfundidos con 1% TTC en solución amortiguadora fosfato (pH 7,4) por 7 minutos e inmersos en esta solución por otros 7 minutos. Los corazones fueron congelados a -20°C por 1 hora y luego cortados en 6 rodajas transversales (2mm de espesor) a lo largo del eje largo del VI, de apex a base. Las áreas infartadas fueron mejoradas por almacenamiento en una solución de formaldehído al 10% por 48 horas antes de la medición. La

cuantificación fue realizada en fotografías digitales por delinear manual de los márgenes de las áreas diferencialmente coloreadas: pálidas (infartadas) y rojas (tejido viable) utilizando el programa Image J (NIH). El peso de infarto fue determinado de la siguiente manera: $(A1 \times P1) + (A2 \times P2) + (A3 \times P3) + (A4 \times P4) + (A5 \times P5) + (A6 \times P6)$, donde A es el área promedio de infarto de ambos lados de la rodaja, y P el peso de la sección respectiva. El peso del área de riesgo (área total del ventrículo) fue calculado de manera similar. El tamaño de infarto fue expresado como el peso del área infartada/peso del área del ventrículo x 100.

4.5. Medición de peroxidación lipídica

Fundamento

Los productos resultantes de la peroxidación lipídica son parámetros confiables para monitorear el daño oxidativo de los lípidos. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de bajo peso molecular que se forman a través de la descomposición de ciertos productos primarios y secundarios de la peroxidación lipídica. El método propuesto por Buege y Aust (202) consiste en la reacción entre el ácido tiobarbitúrico y productos de descomposición de especies lipídicas peroxidadas tales como el MDA en un medio ácido (pH 3,50). Luego de una etapa de calentamiento se produce por aducción un cromóforo rosado cuya absorbancia se determina a 532 nm.

Procedimiento

Muestras de tejido de corazón de rata fueron homogenizadas en un buffer fosfato (25mM H_2PO_4 , 140 mM KCl) con un homogenizador (Kinematica Polytron 1200 PT E). Los homogenatos fueron centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos. 500 μ l de los sobrenadantes se mezclaron con 1,5 ml 10% (m/v) de ácido tricloroacético y 1 ml 0,67 % (m/v) de ácido tiobarbitúrico y se incubaron a 100 °C por 30 minutos. Luego de enfriarse las muestras fueron centrifugadas a 1000 xg por 10 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm (Jenway 6320D). Las TBARS se expresaron como nmol/mg de proteína del homogenato utilizando un coeficiente de extinción molar de $1,56 \times 10^5 M^{-1}cm^{-1}$.

4.6. Electroforesis y Western Blot

Fundamento

La electroforesis es una técnica de separación de proteínas que se basa en la diferente movilidad que adquieren las mismas en un campo eléctrico. El soporte utilizado es generalmente un gel de poliacrilamida y la movilidad de las proteínas dependerá del tamaño (masa) y de su carga eléctrica. En el método desarrollado por Laemmli (SDS-PAGE) (203) se utilizan dos diferentes tipos de geles de poliacrilamida: el gel de apilamiento y el de separación. El gel de apilamiento es ligeramente ácido (pH 6,8) y tiene una concentración menor de acrilamida lo que permite concentrar las proteínas antes de entrar al gel separador. El gel de separación, o de resolución, es básico (pH 8,8) y tiene un mayor contenido de poliacrilamida, haciendo los poros del gel más estrechos. Previo al proceso de separación, las proteínas se combinan con una solución de carga que contiene dodecil sulfato sódico (SDS), un agente tensioactivo que provoca la desnaturalización de las mismas y le otorga una carga negativa que resulta proporcional a la longitud de la cadena peptídica. Esto hace que las proteínas viajen hacia el electrodo positivo en relación sólo a su masa molecular: las proteínas más pequeñas viajarán más fácilmente (y por lo tanto más rápidamente) que las más grandes (204).

Luego de la separación de la mezcla proteica en el gel, se realiza la transferencia a una membrana, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular a la superficie del gel. Las proteínas migran fuera del gel y hacia la membrana. La membrana se bloquea (para prevenir unión inespecífica de los anticuerpos) previa a la incubación con anticuerpos primarios, que específicamente detectan los epitopes de la proteína de interés. Luego se utilizan anticuerpos secundarios que reconocen a las inmunoglobulinas específicas de especie de los anticuerpos primarios, y están conjugados con la peroxidasa de rabanita lo cual permite mediante un reactivo quimioluminiscente detectar la cantidad de anticuerpo unido y estimar la cantidad de la proteína de interés en las diferentes muestras.

Procedimiento

Los ventrículos congelados y pulverizados fueron homogenizados en cinco volúmenes de lo siguiente: 20 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 10 mM NaCl, 300 mM sacarosa; 1% IGEPAL; 0,1 % SDS; 25 mM NaF; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidina; 10 µg/ml Leupeptina; 1 µg/ml Pepstatina; 1 µg/ml E64 [trans-Epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidinio)butano]. El homogenato fue

sedimentado a 13000x g por 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue fraccionado en alícuotas pequeñas, congeladas en N₂, y guardadas a -80°C. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford con seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Una misma cantidad de proteína de cada muestra, fue sujeta a electroforesis en geles de acrilamida de 10-12 % de acuerdo al peso molecular (PM) de la proteína a estudiar. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Immobilion-P, Millipore). Las membranas fueron bloqueadas con solución amortiguadora Tris-salina (TBS) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) con y sin la adición de 0,1% de Tween (TBST) y 5% de leche descremada o BSA, como se indica para cada anticuerpo, y luego incubadas con los siguientes anticuerpos primarios: fosfo-JNK (1:1000 en TBST 5% BSA), JNK (1:1000 en TBST 1% leche), de Santa Cruz Biotechnology, caspasa-12 (1:1000 en TBST 1% leche) de Sigma-Aldrich, fosfo-eIF2 α (1:1000 en TBST 5% BSA) de Cell Signaling Technology, eIF2 α (1:1000 en TBST 1% leche) de Invitrogen, GAPDH (1:10000 en TBST 1% leche) de Millipore. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rabanito adecuado (Santa Cruz Biotechnology, 1:10000 en 1% leche TBST) y reveladas utilizando un reactivo de quimioluminiscencia mejorado (Millipore). Las señales emitidas por quimioluminiscencia fueron detectadas utilizando Chemidoc Imaging System (Bio-Rad), y analizadas con el programa Image J (NIH). Los resultados fueron normalizados con la señal de densitometría correspondiente de la proteína no-fosforilada o de GAPDH.

4.7. Evaluación de apoptosis

Fundamento

Una de las características bioquímicas de la apoptosis o muerte celular programada, es la generación de extremos 3'-hidroxilo libres en el ADN. El ensayo de marcaje con extremo de dUTP-biotina mediado por TdT (TUNEL) explota este sello bioquímico marcando los extremos expuestos del ADN, lo que permite la visualización de núcleos que contienen ADN fragmentado.

Procedimiento

Al finalizar los distintos protocolos experimentales, cortes de corazones fijados en paraformaldehído y embebidos en parafina fueron procesados para microscopía de inmunofluorescencia. La determinación de apoptosis se realizó por la técnica de TUNEL (del inglés: *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling*) utilizando un kit comercial (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche). Las secciones fueron capturadas con una cámara

digital RGB (Evolution VF, Q imaging) conectada a un microscopio (Olympus BX- 50). Se eligieron 20 áreas al azar en cada sección y se analizaron los resultados (número de núcleos apoptóticos/totales) procesando las imágenes con el programa Image-Pro Plus V6.0 (201).

4.8. RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* utilizada para amplificar una secuencia específica de ADN durante ciclos repetidos (de variación térmica) en los que se produce la copia de la secuencia blanco. La reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa termoestable que tiene la capacidad de sintetizar el ADN a partir de un molde de ADN y de cebadores específicos para las secuencias de interés. En la PCR de transcripción reversa, el sustrato es ADN complementario (ADNc), proveniente de la transcripción del ARN a ADNc convertido por la actividad enzimática de una transcriptasa reversa viral. En conjunto nos permiten evaluar la expresión de ARNm de genes de interés.

Procedimiento

El ARN fue extraído de los corazones utilizando TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, Calif). El ADNc fue generado por transcripción reversa utilizando M-MLV RT (Promega, Madison, Wis). La PCR real time cuantitativa, fue realizada a partir del ADNc empleando SYBR select Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, Calif) e iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, Calif). Se utilizaron los siguientes cebadores:

Gen	Sentido (5' to 3')	Antisentido (5' to 3')
XBP1 total (detecta forma no empalmada y empalmada)	AGAAACAGCAACCTGAGGGG	AGCAAGAAGATTACCATCAAGCAT
CHOP	TACACCACCACACCTGAAAGC	GCTAGGGATGCAGGGTCAAG
GRP78	TGATTCCGAGGAACACTGTGG	GGTGATTGTCTTTTGTGAGGGG
XBP1 empalmado (sXBP1)	GAGTCCGCAGCAGGTGC	GGTCCAACCTGTCCAGAATGC
GAPDH	GGGTGTGAACCACGAGAAAT	CCACAGTCTTCTGAGTGGCA

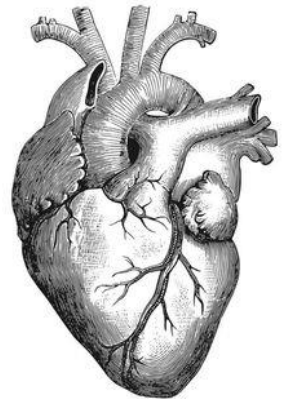
La abundancia relativa del ARN fue calculada con el método $\Delta\Delta Ct$ (205). Los cebadores fueron diseñados utilizando Primer-Blast (NCBI, NIH). Todos los cebadores tuvieron una eficiencia entre

90% y 110%, según lo evaluado mediante curva de calibración, y mostraron un solo pico de disociación.

4.9. Análisis estadístico.

Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los conjuntos de datos. Los resultados promedio fueron expresados como la media \pm error estándar. Para el estudio de significación se utilizó el test de t-Student para muestras apareadas o independientes. Para la comparación entre diferentes grupos se utilizó el test de Análisis de Varianza (ANOVA). Las diferencias estadísticas observadas con ANOVA fueron examinadas con el test de Newman-Keuls. En todos los casos se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

5. Resultados



5.1. Estrés de retículo endoplasmático en el corazón atontado

Con el fin de evaluar la activación de la UPR en el corazón atontado, analizamos por RT-qPCR la abundancia relativa de los niveles de ARNm de diferentes marcadores de estrés de RE (sXBP1, XBP1 total, GRP78 y CHOP) (Figura 10). Los corazones sometidos al protocolo de atontamiento (I/R 20/30) mostraron un incremento significativo en los niveles de ARNm de genes de la respuesta adaptativa sXBP1, XBP1 total y GRP78, respecto a los valores obtenidos en corazones no isquémicos. Este aumento fue similar en corazones en los que se realizó el protocolo de isquemia severa (I/R 30/60). Por otra parte, el ARNm de la proteína pro-apoptótica CHOP solo aumentó significativamente en los corazones sometidos a I/R 30/60.

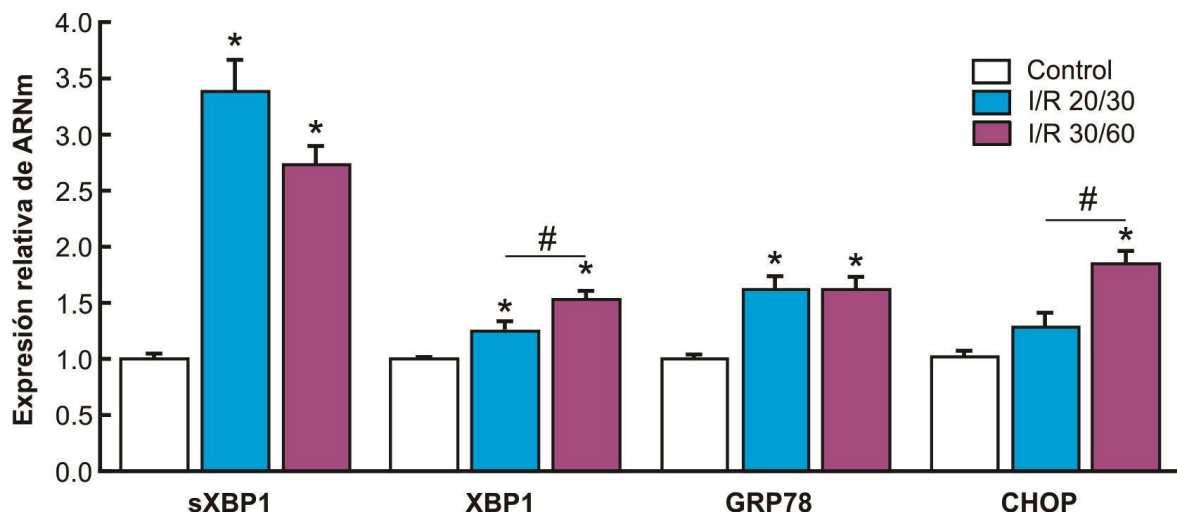


Figura 10. Expresión de ARNm de marcadores de estrés de RE en el corazón atontado. Resultados totales de los niveles de expresión de ARNm de sXBP1, XBP1 total, GRP78, y CHOP en corazones no isquémicos (Control) y corazones sometidos a I/R 20/30 o I/R 30/60. Los resultados representan valores promedios \pm ES de 7-14 corazones/grupo. * $p < 0,05$ respecto a Control. # $p < 0,05$ vs I/R 30/60.

Para evaluar si la falta de incremento en los niveles de ARNm de CHOP en corazones atontados podría deberse a un insuficiente tiempo de reperfusión, en un nuevo grupo de corazones se extendió el tiempo de reperfusión de 30 a 60 minutos. Nuevamente, la expresión del ARNm de CHOP permaneció sin cambios respecto a los corazones no isquémicos, mientras que los niveles de ARNm de los genes de la respuesta adaptativa de la UPR fue comparable en ambos protocolos de atontamiento (I/R 20/30 e I/R 20/60) (Figuras 10 y 11). Estos resultados sugieren que la intensidad del insulto isquémico, y no el tiempo de reperfusión, determina el patrón de la respuesta al estrés de RE.

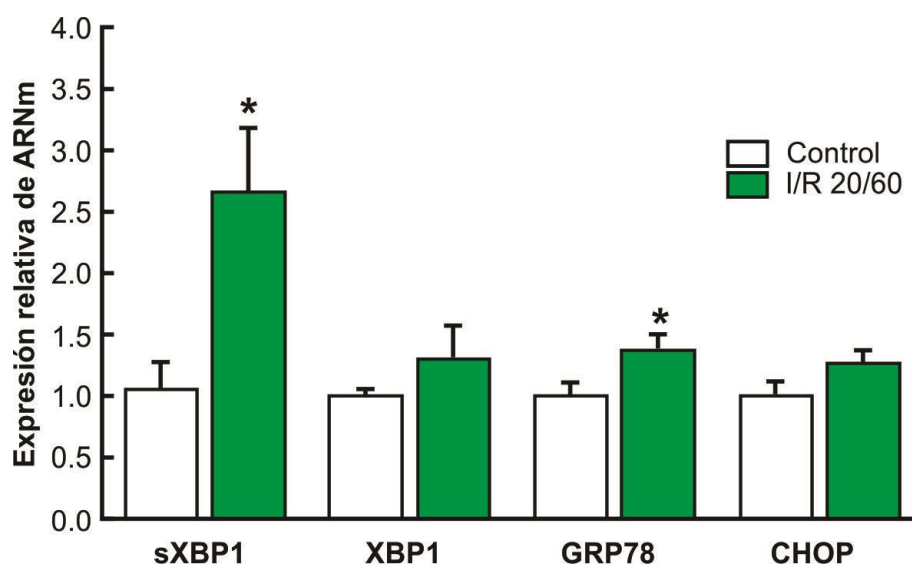


Figura 11. Expresión de ARNm de marcadores de estrés de RE en un protocolo de I/R 20/60. Resultados totales de los niveles de expresión de ARNm de sXBP1, XBP1 total, GRP78, y CHOP en corazones no isquémicos (Control) y corazones sometidos a I/R 20/60. Los resultados representan valores promedios \pm ES de 4-5 corazones/grupo. * $p < 0,05$ respecto a Control.

Un interrogante que se planteó a partir de estos experimentos fue si la isquemia por sí sola es suficiente para disparar la UPR o se requieren condiciones provistas por la reperfusión. Experimentos en miocitos ventriculares neonatales de rata habían demostrado que un periodo de hipoxia o isquemia simulada de 2 horas aumentaba los niveles de ARNm de GRP78 (173, 178). Quisimos investigar si en el corazón perfundido *ex vivo*, 20 minutos de isquemia eran suficientes para regular positivamente la expresión de genes de la UPR. Estudiamos dos marcadores de estrés de RE, GRP78 y sXBP1. Como se muestra en la Figura 12, la isquemia no modificó los niveles de sXBP1 pero provocó un incremento significativo en los niveles de ARNm de GRP78, similar al

detectado luego de la I/R 20/30. Estos resultados demuestran que un periodo de isquemia de 20 minutos es suficiente para disparar la expresión de uno de los marcadores de estrés estudiados, GRP78. En cuanto al sXBP1, los datos obtenidos no nos permiten concluir si se requiere más tiempo post-insulto para detectar aumentos en los niveles de su ARNm o si son necesarias condiciones aportadas por la reperfusión. De cualquier manera, nuestros hallazgos avalan el concepto de que las cascadas de señalización de la UPR tienen una dinámica temporal diferente, como fue propuesto por otros investigadores (171, 206).

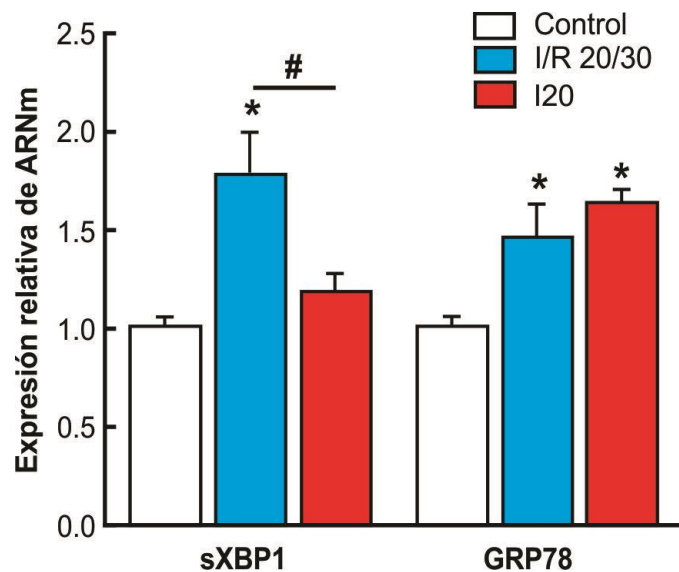


Figura 12. Expresión de ARNm de marcadores de estrés de RE luego de 20 minutos de isquemia (I 20). Resultados totales de los niveles de expresión de ARNm de sXBP1 y GRP78 en corazones no isquémicos (Control), y corazones sometidos a I 20 o I/R 20/30. Los resultados representan valores promedios \pm ES de 3-5 corazones/grupo. * $p < 0,05$ respecto a Control. # $p < 0,05$ vs I/R 20/30.

Los resultados que obtuvimos a nivel de ARNm indican que la UPR está gatillada en el corazón atontado con la activación de al menos dos de sus vías de señalización: 1) el aumento en los niveles de XBP1 total es un indicador de la activación de la vía de ATF6 y 2) el aumento en los niveles de sXBP1 es el resultado de la actividad endorribonucleasa de IRE1. Por otro lado, el incremento en los niveles de ARNm de GRP78 no puede atribuirse a una vía en particular, ya que resulta de la activación de cualquiera de los tres sensores del estrés de RE. Además los resultados indican que mientras que en el atontamiento sólo se activan señales adaptativas, en la injuria severa por I/R, éstas ocurren junto con la inducción transcripcional de CHOP, un componente pro-apoptótico de la vía PERK, clave en la respuesta maladaptativa al estrés de RE.

A continuación estudiamos las proteínas involucradas en la fase inicial de la respuesta al estrés de RE (54): la fosforilación de eIF2 α , asociada con la atenuación de la traducción proteica y por lo tanto parte de la respuesta adaptativa de la UPR, y la activación de JNK y caspasa-12, componentes de la vía pro-apoptótica mediada por estrés de RE (Figuras 13a-d). La fosforilación de eIF2 α aumentó en los corazones atontados sin cambios en eIF2 α total. Este incremento no se observó en aquellos corazones sometidos al protocolo de I/R de mayor duración (Figura 13a y b). La fosforilación de JNK aumentó en ambos grupos de I/R, con valores significativamente superiores en la I/R 20/30 respecto a la I/R 30/60. Finalmente, caspasa-12 presentó niveles de activación similares tanto en el protocolo de atontamiento como en el de daño severo por I/R comparados con el grupo no isquémico (Figura 13c y d).

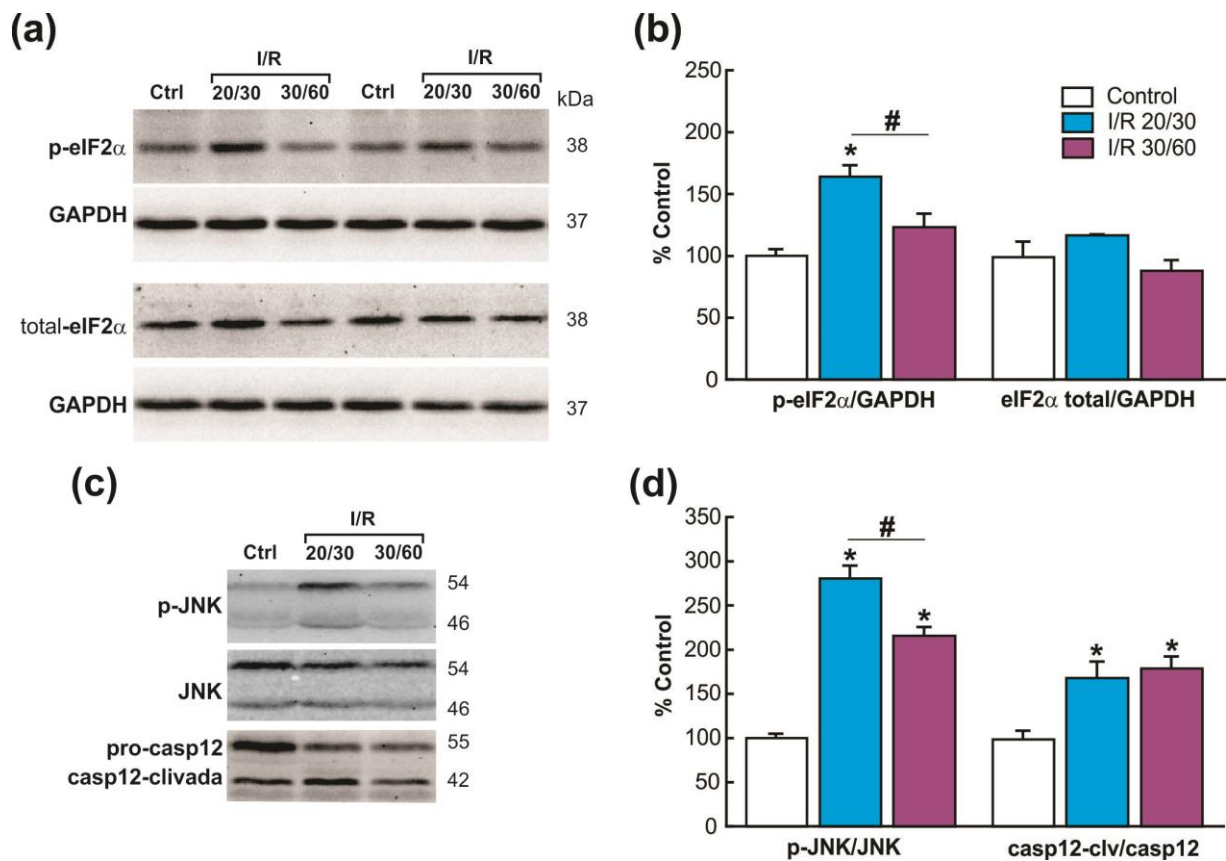


Figura 13. Activación de proteínas de la fase inicial de la respuesta al estrés de RE en el corazón atontado. (a) Western blots representativos y (b) resultados cuantitativos de eIF2 α fosforilado (p-eIF2 α) y total, en corazones no isquémicos (Control, Ctrl) y corazones sometidos a I/R 20/30 o I/R 30/60. GAPDH se usó como normalizador. (c) Western blots representativos y (d) resultados cuantitativos de JNK fosforilado (p-JNK) y total y caspasa-12 clivada (casp12-clv) en los mismos grupos experimentales. Los resultados representan valores promedios \pm ES de 5-12 corazones/grupo. * p < 0,05 respecto a Control. # p < 0,05 vs I/R 30/60.

Los resultados obtenidos a nivel de proteína muestran que la vía de PERK también está activada en el corazón atontado, como lo indica el aumento de la fosforilación del eIF2 α , un marcador temprano de la fase adaptativa. Inesperadamente, frente a este insulto por I/R, detectamos la activación simultánea de dos proteínas de la vía de IRE1 generalmente relacionadas con cascadas pro-apoptóticas (JNK y caspasa-12). Los resultados experimentales revelaron otra importante diferencia entre las señales de UPR activadas en ambos protocolos: la fosforilación de eIF2 α está ausente en la I/R 30/60.

5.2. Injuria inducida por isquemia/reperfusión moderada

Para evaluar si la activación de cascadas pro-apoptóticas en corazones sometidos a I/R 20/30 conduce a la muerte celular, realizamos el ensayo de TUNEL sobre cortes de ventrículo izquierdo obtenidos al final del protocolo. La Figura 14a y b muestra que el número de miocitos con núcleos apoptóticos (TUNEL positivos) en los corazones atontados no fue diferente de los corazones no isquémicos. Como 30 minutos de reperfusión, podría ser un tiempo insuficiente para la detección de la apoptosis, estudiamos la misma en el grupo de corazones donde la reperfusión se extendió por 60 minutos luego de los 20 minutos de isquemia. Nuevamente el porcentaje de núcleos TUNEL positivos no fue distinto del grupo control no isquémico. Como era de esperar, sí se evidenció un aumento significativo de la apoptosis en corazones sometidos a I/R 30/60.

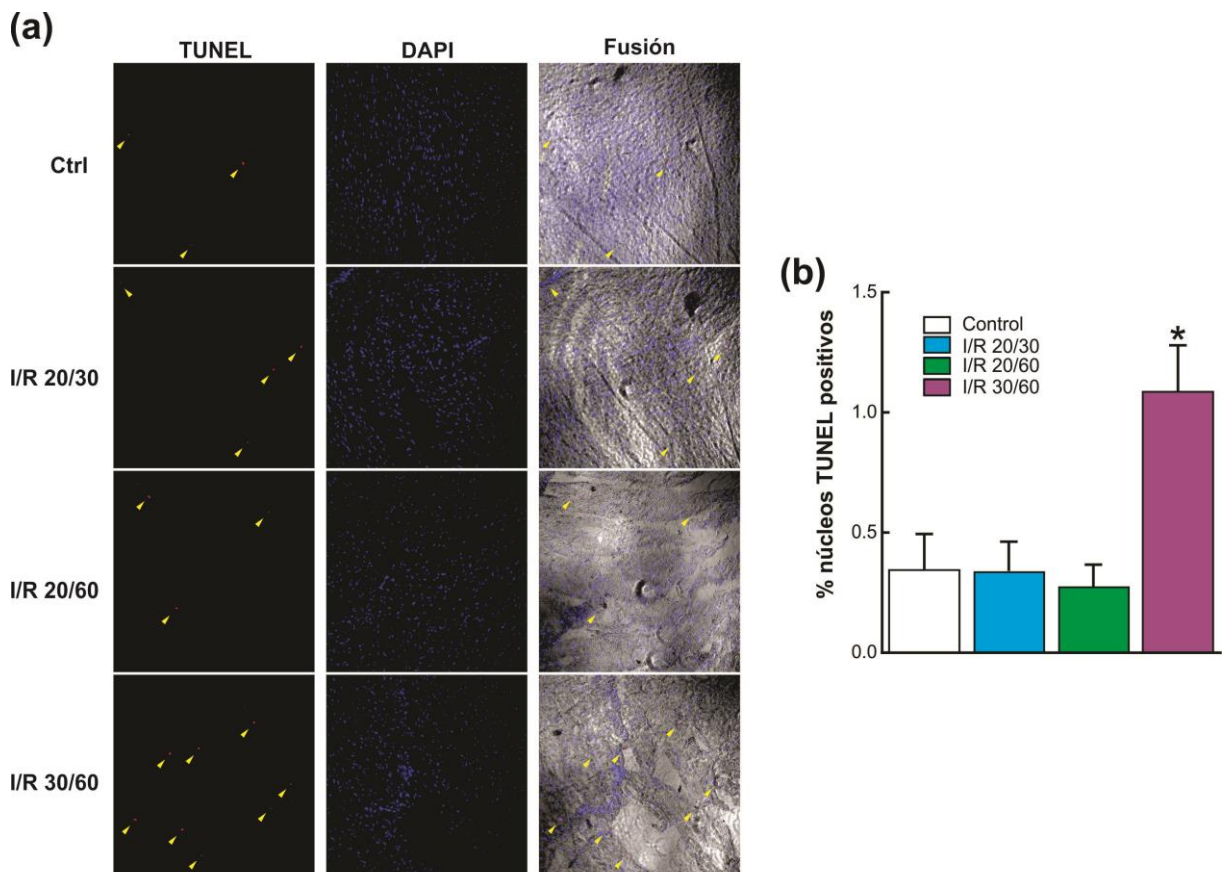


Figura 14. Determinación de la apoptosis celular en corazones sometidos a I/R. (a) Imágenes representativas de cortes de ventrículo izquierdo de corazones no isquémicos (Ctrl) y corazones al finalizar los protocolos de I/R, en donde se observan: núcleos TUNEL positivos (puntos rojos) que indican las células apoptóticas, tinción de DAPI (puntos azules) para marcar los núcleos y la fusión de ambas en una imagen de campo claro. Las flechas amarillas señalan los núcleos TUNEL positivos. (b) Resultados cuantitativos del porcentaje de núcleos TUNEL positivos en las distintas intervenciones. Los resultados representan los valores promedios \pm el ES de 4-8 corazones/grupo. * $p < 0,05$ respecto al Control.

El daño cardíaco por necrosis fue examinado por la tinción con TTC. Los resultados mostraron un tamaño de infarto de $58,2 \pm 6,3\%$ en los corazones sometidos a la injuria severa por I/R mientras que el área necrótica fue despreciable en corazones atontados y no isquémicos (Figura 15a). Adicionalmente la citotoxicidad celular fue evaluada por el ensayo de liberación de LDH. Como se muestra en la Figura 15b, el incremento en los niveles de LDH en el efluente, obtenidos a 10 min de reperfusión, sólo fue significativo en corazones sometidos al protocolo de injuria irreversible por I/R. Estos resultados son consistentes con lo ya establecido respecto a que un período de isquemia de hasta 20 min causa un daño tisular mínimo (207). La ausencia de incrementos en la apoptosis y en la muerte celular en el corazón atontado, sugiere que si bien algunas de las vías de señalización maladaptativas de la UPR están activadas, son inefectivas o están siendo superadas por las vías que conducen a la sobrevivida.

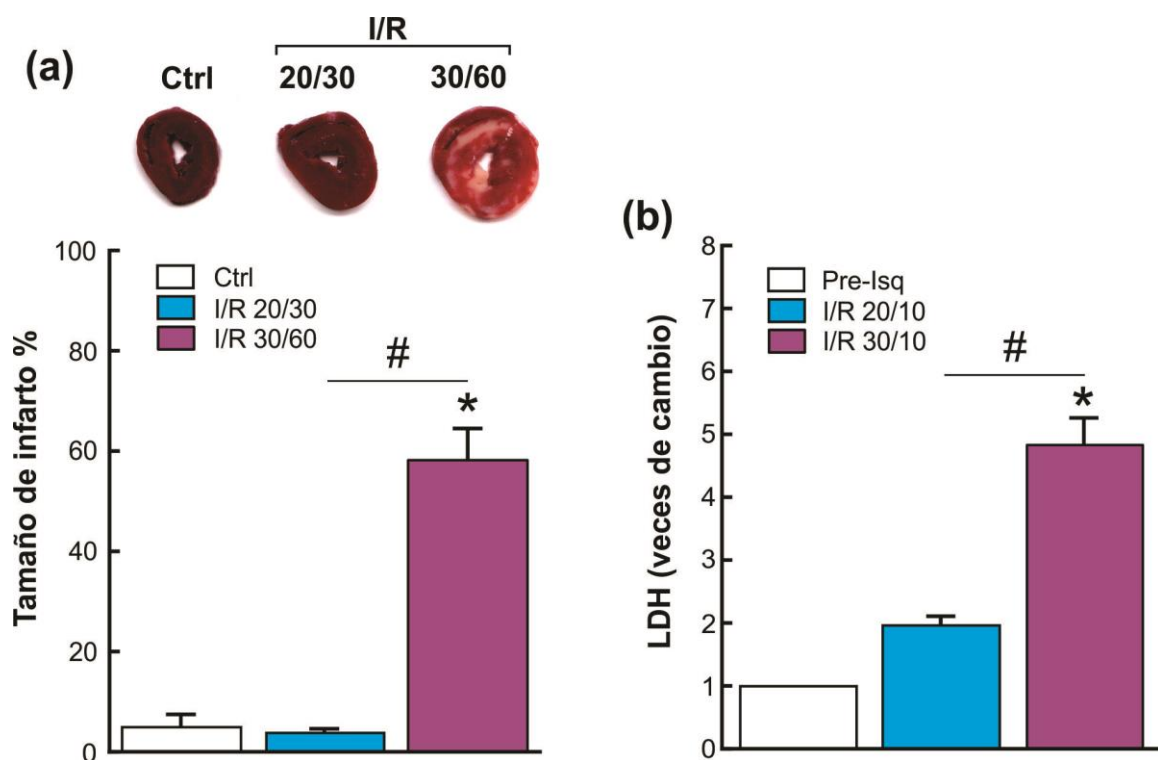


Figura 15. Evaluación del daño cardíaco en corazones sometidos a I/R. (a) Imágenes representativas de secciones de corazones de rata teñidos con TTC obtenidas de corazones no isquémicos (Control, Ctrl) y corazones sometidos a I/R 20/30 o I/R 30/60 y resultados totales del tamaño de infarto expresados como porcentaje del área total del ventrículo. Los resultados representan los valores promedios \pm ES de 3 corazones/grupo. (b) Resultados totales de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) medidos en Pre-Isquemia (Pre-Isq) y luego de 10 minutos de reperfusión en protocolos de I/R. Los resultados representan los valores promedios \pm ES de 4-10 corazones/grupo. * $p < 0,05$ respecto a Control. # $p < 0,05$ vs. I/R 30/60.

5.3. Impacto funcional del estrés de retículo endoplasmático en el corazón atontado

Para establecer el impacto funcional del estrés de RE en la recuperación post-isquémica del miocardio atontado, utilizamos dos chaperonas de diferente naturaleza química, TUDCA y 4-PBA. Ambas chaperonas químicas han sido extensamente empleadas como inhibidores del estrés de RE en diferentes modelos (208, 209) incluyendo la injuria irreversible por I/R (195, 196, 210-212).

En primer lugar, evaluamos la capacidad de TUDCA y 4-PBA en disminuir la activación de la UPR en nuestras condiciones experimentales, midiendo la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés de RE en corazones sometidos a I/R 20/30 en presencia de cada una de las chaperonas. Como se muestra en la Figura 16, tanto TUDCA como 4-PBA, previnieron significativamente el incremento de los niveles de ARNm de sXBP1 y GRP78 inducidos por I/R, confirmando la efectividad de estas chaperonas como inhibidores del estrés de RE.

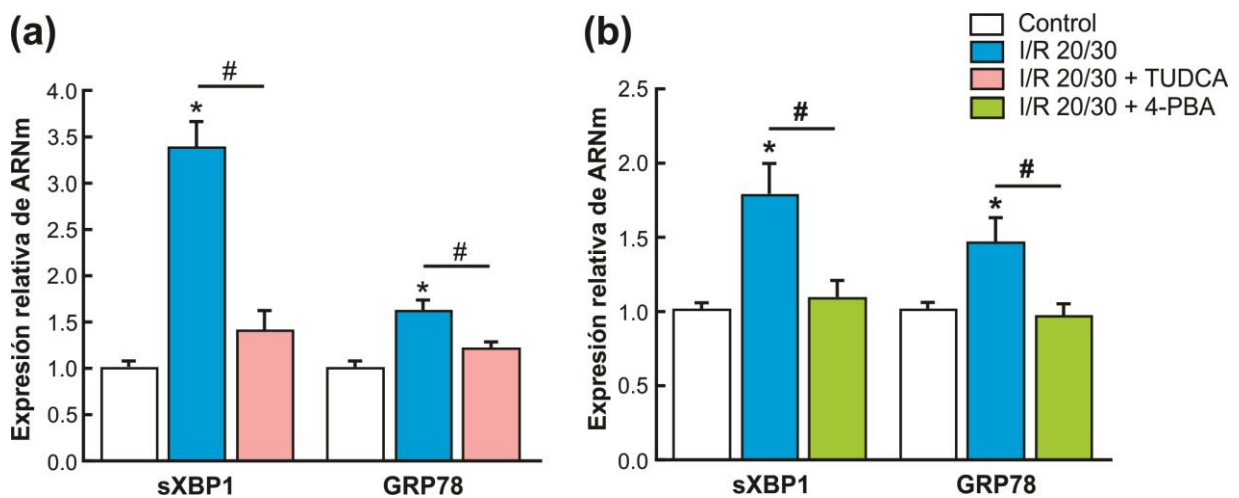


Figura 16. Efecto de las chaperonas químicas sobre los marcadores de estrés de RE. Resultados totales de los niveles de expresión de ARNm de sXBP1 y GRP78, en corazones no isquémicos (Control) o corazones sometidos a I/R en ausencia (I/R 20/30) y presencia de 30 μ M TUDCA (I/R 20/30 + TUDCA) (a) o 3 mM 4-PBA (I/R 20/30 + 4-PBA) (b). Los resultados representan los valores promedios \pm ES de 4-10 corazones/grupo. * $p < 0.05$ respecto a Control. # $p < 0,05$ vs. I/R 20/30.

Las Figura 17a-c muestra el curso en el tiempo de diferentes parámetros mecánicos utilizados para caracterizar la función ventricular izquierda durante la I/R. El tratamiento con TUDCA mejoró significativamente la recuperación post-isquémica de la contractilidad, medida como la máxima velocidad de desarrollo de la presión (+dP/dt) y aceleró la relajación, evidenciada por el acortamiento del tiempo al 50% de la relajación ($t_{1/2}$), comparado con los corazones no tratados (Figuras 17a y b). Adicionalmente TUDCA mitigó la contractura inducida por la reperfusión, como lo indica la disminución de la presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo (PFDVI, Figura 17c).

Como se muestra en la Figura 18a-c, el tratamiento con la otra chaperona, 4-PBA, también incrementó la recuperación contráctil, aceleró la relajación y disminuyó la contractura inducida por la reperfusión, respecto a los corazones sometidos a I/R en ausencia de 4-PBA.

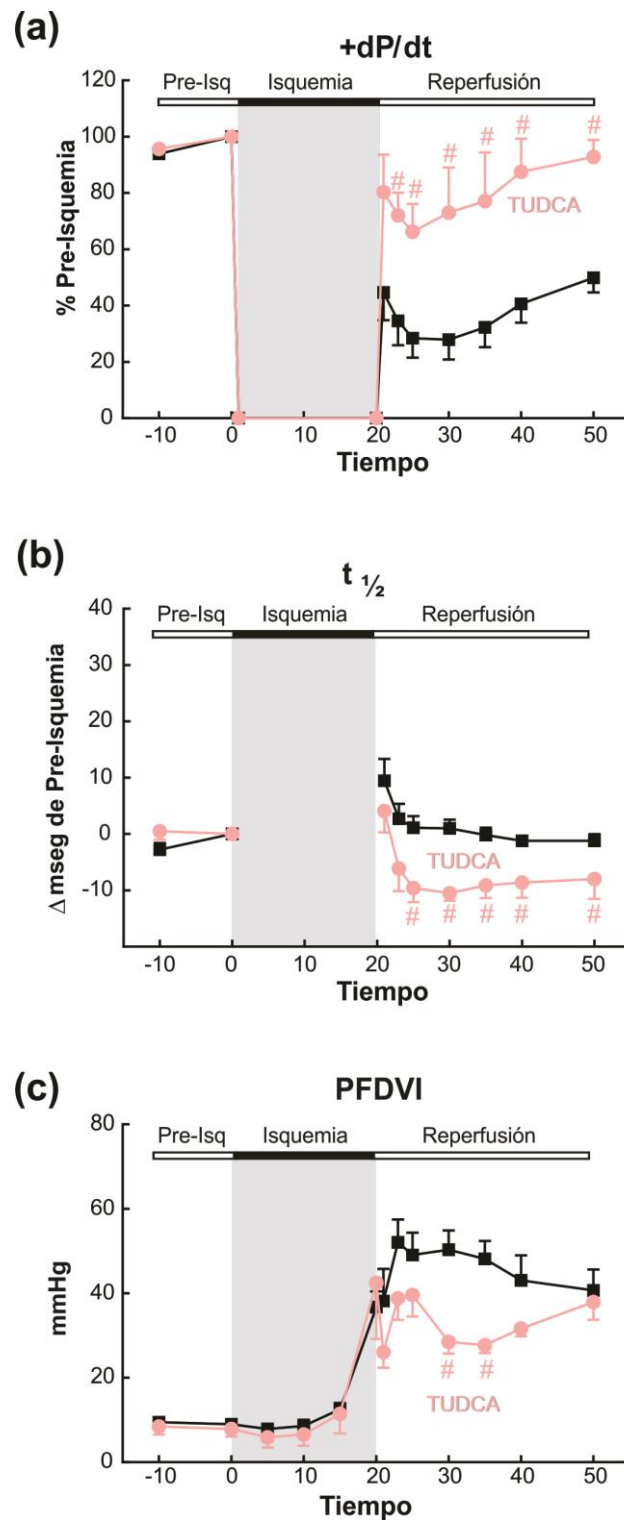


Figura 17. Efectos de TUDCA sobre los parámetros mecánicos durante la I/R. Curso en el tiempo de la velocidad máxima de desarrollo de la presión del VI (+dP/dt) (a), tiempo medio de relajación ($t_{1/2}$) (b) y presión de fin de diástole del VI (PFDVI) (c), de corazones sometidos a I/R en ausencia (I/R 20/30) o presencia de 30 μ M TUDCA (I/R 20/30 + TUDCA), suministrado al inicio de la reperfusión. Los resultados representan los valores promedios \pm ES de 3-10 corazones/grupo. # $p < 0,05$ vs. I/R 20/30.

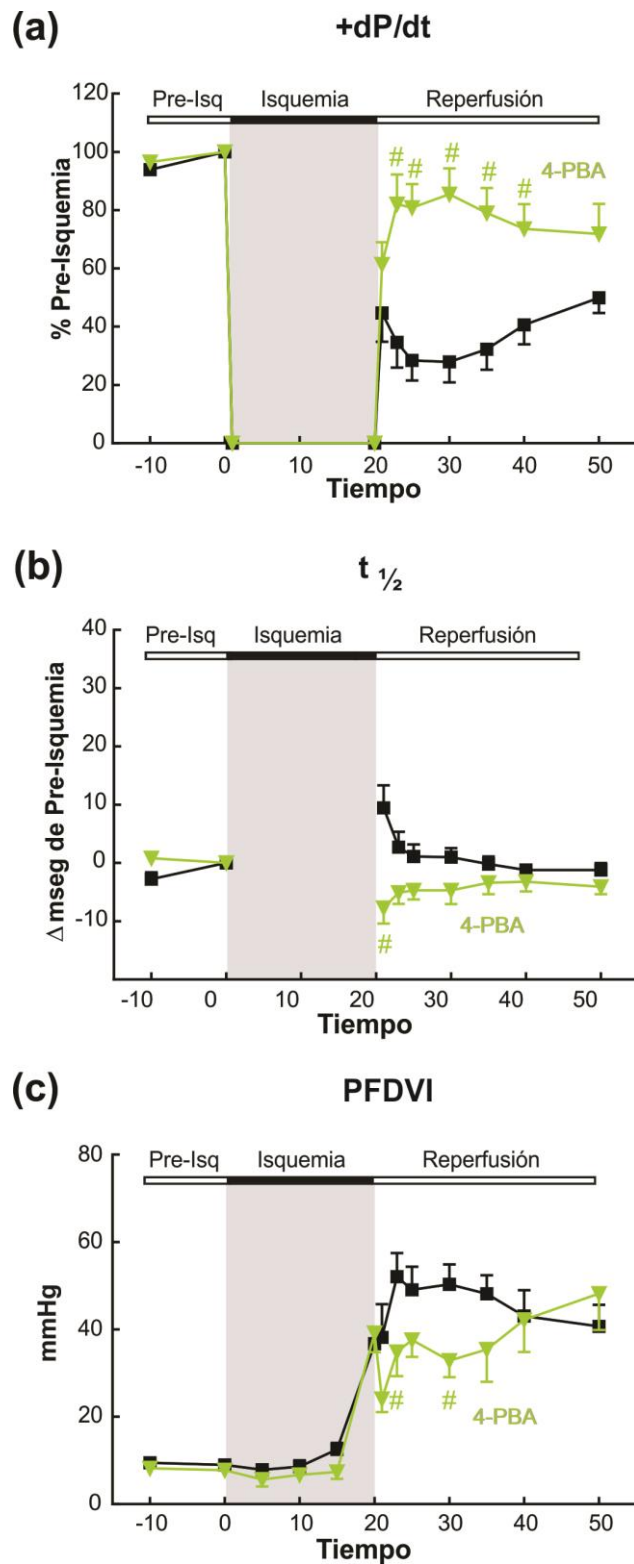


Figura 18. Efectos de 4-PBA sobre los parámetros mecánicos durante la I/R. Curso en el tiempo de la velocidad máxima de desarrollo de la presión del VI (+dP/dt) (a), tiempo medio de relajación ($t_{1/2}$) (b) y presión de fin de diástole del VI (PFDVI) (c), de corazones sometidos a I/R en ausencia (I/R 20/30) o presencia de 3 mM 4-PBA (I/R 20/30 + 4-PBA), suministrado al inicio de la reperusión. Los resultados representan los valores promedios \pm ES de 4-10 corazones/grupo. # $p < 0,05$ vs. I/R 20/30.

La Tabla 1 muestra que las chaperonas no modificaron los parámetros mecánicos basales, indicando que sus efectos beneficiosos durante la reperfusión pueden atribuirse a la inhibición del estrés de RE desencadenado por la I/R.

	PDVI mmHg	+dP/dt mmHg/seg	t_{1/2} mseg	PFDVI mmHg
Control	91,8 ± 4,8	3479,8 ± 266,2	48,6 ± 1,4	6,31 ± 1,75
PBA (n=5)	96,4 ± 5,8	3846,5 ± 194,2	42,7 ± 4,2	5,48 ± 1,52
Control	85,8 ± 9,4	2945,0 ± 429,8	50,7 ± 1,8	5,79 ± 0,83
TUDCA (n=3)	99,2 ± 6,6	3725,9 ± 453,0	52,5 ± 4,8	5,37 ± 0,67

Tabla 1. Efectos del TUDCA y 4-PBA sobre los parámetros mecánicos de corazones perfundidos no sometidos a I/R. Se muestran los valores (media ± ES) obtenidos al final del período de estabilización (Control) y luego de 10 minutos de perfusión con las chaperonas (30 μM TUDCA y 3 mM 4-PBA). PDVI: presión desarrollada por el VI; +dP/dt: velocidad máxima de desarrollo de la presión del VI; t_{1/2}: tiempo medio de relajación y PFDVI: presión de fin de diástole del VI.

Dado que las acciones cardioprotectoras de TUDCA y 4-PBA han sido vinculadas a la disminución del estrés oxidativo (196, 213), evaluamos sus efectos en el estrés oxidativo inducido por I/R. Los productos de peroxidación lipídica (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS) fueron medidos como marcadores de daño oxidativo. Como se muestra en la Figura 19, la cantidad de TBARS aumentó significativamente en los corazones sometidos a I/R respecto a los corazones no isquémicos. La administración de TUDCA o 4-PBA durante la reperfusión no fue capaz de disminuir el estrés oxidativo inducido por la I/R. En conjunto, estos resultados indican que la inhibición del estrés de RE puede mejorar la recuperación post-isquémica de la función cardíaca. La protección ejercida por TUDCA y 4-PBA frente a la disfunción mecánica asociada a la I/R es independiente del estrés oxidativo. Entonces, el efecto protector de estas chaperonas podría estar mediado por una mejora en el manejo de Ca^{+2} durante la I/R.

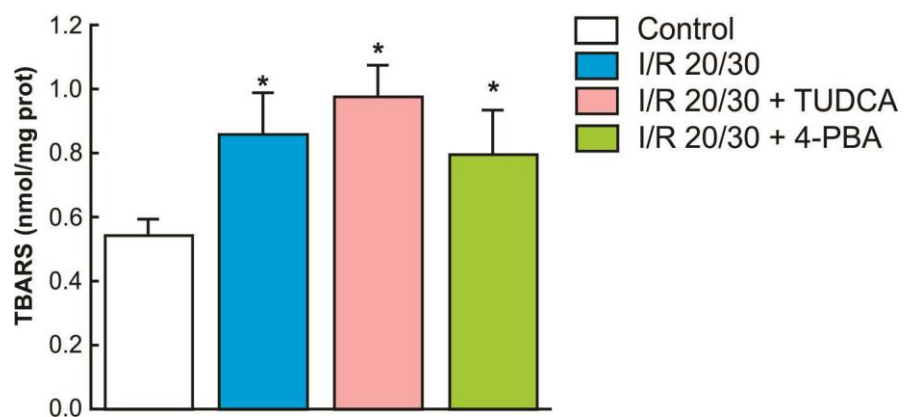


Figura 19. Efectos del TUDCA y 4-PBA sobre el estrés oxidativo. Cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en Control (corazones no isquémicos) e I/R 20/30 en ausencia o presencia de TUDCA o 4-PBA. Los resultados se expresan como valores promedios \pm ES de 3-10 corazones. * $p < 0,05$ respecto al Control.

5.4. Participación del translocón en la disfunción contráctil del corazón atontado

Evidencias experimentales en diferentes líneas celulares demuestran que el estrés de RE generado por inductores farmacológicos, promueve la pérdida de Ca^{+2} de esta organela (214-216). Se ha propuesto que el translocón es uno de los principales canales involucrados en esta pérdida (214, 215). A fin de evaluar si esta fuga de Ca^{+2} a través del translocón contribuye a la disfunción contráctil que se observa en el atontamiento, se perfundieron corazones en presencia de emetina, un inhibidor de dicho canal. La Figura 20a y b muestra que la emetina aumentó la recuperación contráctil (+dP/dt) y disminuyó la contractura (PFDVI) respecto a los corazones con I/R sin tratamiento. Este efecto protector de la emetina se asoció con una disminución del estrés de RE, sin descenso del estrés oxidativo. Como muestra la Figura 20c la emetina previno el incremento de los niveles de ARNm de sXBP1 y GRP78, mientras que no modificó el grado de peroxidación lipídica inducidos por la I/R. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos luego del tratamiento con las chaperonas químicas, TUDCA y 4-PBA (Figuras 17 y 18).

Estos experimentos sugieren que, de manera similar a lo que ocurre en líneas celulares con activadores farmacológicos de estrés de RE (214, 215), en el corazón *ex vivo* sometido a una injuria por I/R moderada, el estrés de RE está asociado a una pérdida de Ca^{+2} a través del translocón. Esta pérdida podría contribuir a la sobrecarga citosólica de Ca^{+2} promotora de la disfunción contráctil del atontamiento. Estos hallazgos indican además que, en una situación fisiopatológica compleja como la I/R, donde múltiples factores pueden desencadenar el estrés de RE, la sola prevención de la pérdida de Ca^{+2} a través del translocón parece ser suficiente para atenuar el estrés de RE y disminuir el deterioro contráctil post-isquémico. Por lo tanto, este mecanismo podría convertirse en un importante blanco terapéutico para mitigar el atontamiento miocárdico.

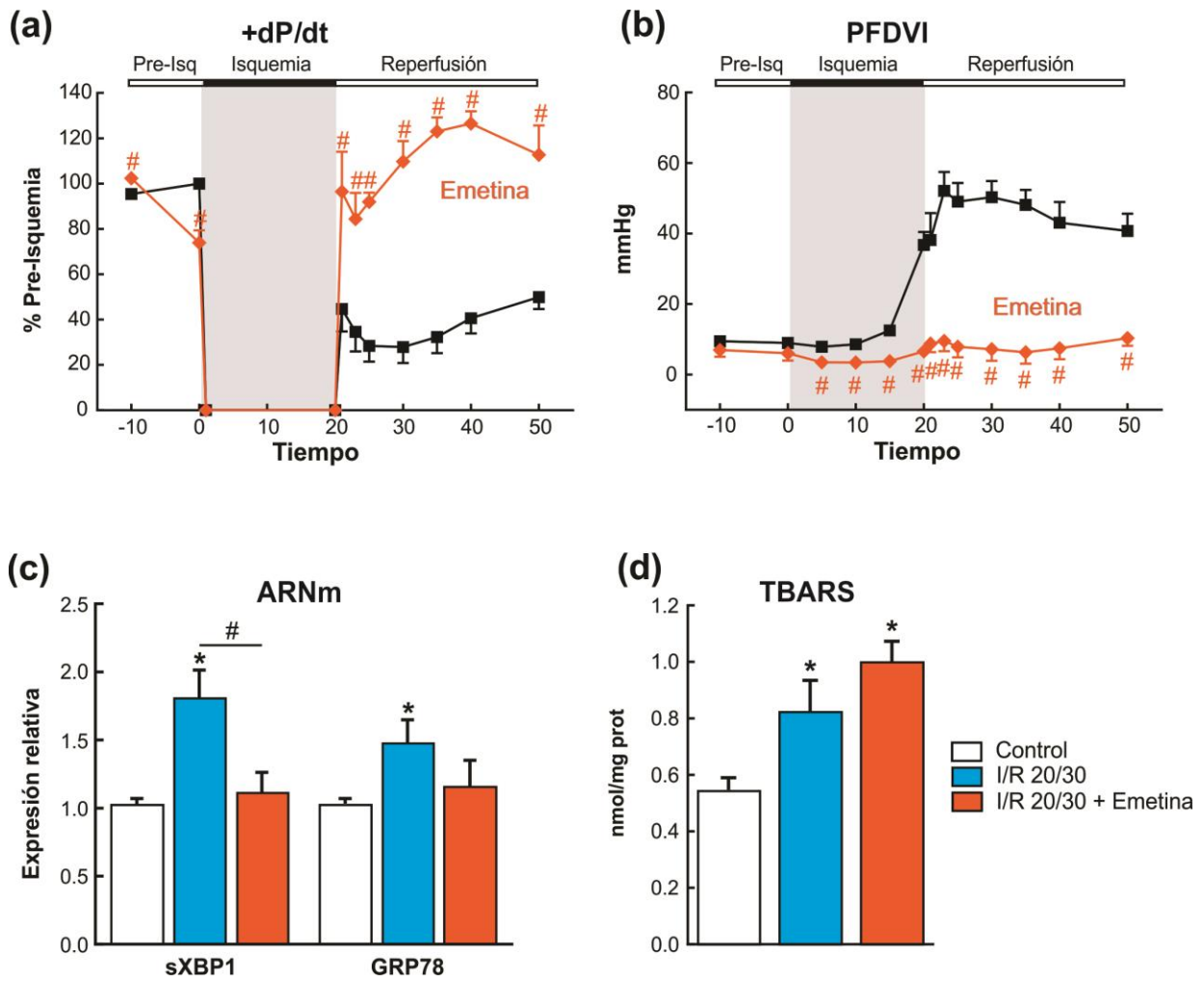
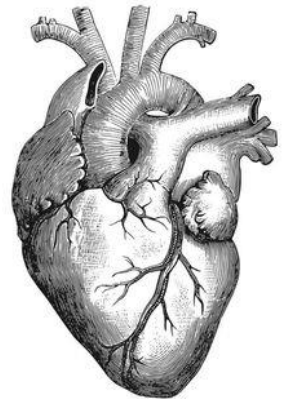


Figura 20. Efectos de la emetina durante la I/R. Curso en el tiempo de la velocidad máxima de desarrollo de la presión del VI (+dP/dt) (a) y presión de fin de diástole del VI (PFDVI) (b), de corazones sometidos a I/R en ausencia o presencia de 0,5 μ M Emetina, suministrado 5 min antes de la isquemia. Los resultados representan los valores promedios \pm ES de 4-10 corazones/grupo. (c) Resultados totales de los niveles de expresión de ARNm de sXBP1 y GRP78, en corazones no isquémicos (Control) o corazones sometidos a I/R en ausencia (I/R 20/30) y presencia de 0,5 μ M Emetina (I/R 20/30 + Emetina). Los resultados representan los valores promedios \pm ES de 4-8 corazones/grupo. (d) Cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en Control (corazones no isquémicos), I/R 20/30 y I/R 20/30 + Emetina. Los resultados se expresan como valores promedios \pm ES de 5-10 corazones. * $p < 0,05$ respecto al Control. # $p < 0,05$ vs. I/R 20/30.

6. Discusión



La maniobra de restablecimiento del flujo sanguíneo miocárdico por desobstrucción de la arteria ocluida mediante el uso de trombolíticos o intervenciones coronarias, es el tratamiento de elección para pacientes con infarto de miocardio. Sin embargo, aunque beneficiosa, la reperfusión desencadena paralelamente una serie de fenómenos que pueden conducir a la muerte del tejido aun potencialmente viable. Por ello es de suma importancia conocer los fenómenos deletéreos desencadenados por la restitución del flujo con el fin de desarrollar tratamientos cardioprotectores. Estas estrategias podrían ser empleadas en el momento de la revascularización a fin de mejorar el resultado clínico, cuando ya no es posible modificar el tiempo de isquemia. Este trabajo de Tesis aporta evidencias de la participación de un fenómeno que ocurre durante la injuria moderada por I/R sin muerte celular, el estrés de RE, cuya prevención resultó ser beneficiosa en la recuperación contráctil post-isquémica.

6.1. En el atontamiento miocárdico se desencadenan vías adaptativas y pro-apoptóticas de la UPR

Períodos breves de isquemia miocárdica, a pesar de no provocar daños irreversibles pueden generar un deterioro de la función contráctil y la aparición de arritmias letales en la reperfusión. Los mecanismos moleculares propuestos para explicar estas alteraciones, incluyen la generación de EROs/ERNs y la sobrecarga intracelular de Ca^{+2} (80). Estas dos perturbaciones celulares también alteran la función del RE, provocando estrés de RE y disparando la UPR (33, 72). Diversa evidencia experimental indica que la UPR puede tanto atenuar como agravar el daño miocárdico en el contexto de injuria severa por I/R (171). Sin embargo, no hay estudios que examinen en el miocardio atontado la respuesta al estrés de RE y los procesos celulares regulados por éste. Es por ello que nos propusimos estudiar la presencia del estrés de RE y sus consecuencias funcionales, en esta entidad nosológica.

Los resultados obtenidos demuestran por primera vez que un insulto de I/R moderado es suficiente para generar estrés de RE y gatillar la UPR en corazones perfundidos de rata. Los análisis de los niveles de ARNm y de proteínas de diferentes efectores de la respuesta al estrés de RE, nos permiten concluir que las tres vías de la UPR están activadas: 1) la fosforilación incrementada de eIF2 α , es una lectura molecular temprana de la activación de la vía de PERK (36), 2) el aumento en los niveles del ARNm del gen de XBP1 resulta de la activación de la vía de ATF6 (65) y 3) el incremento en los niveles del ARNm de sXBP1, de la fosforilación de JNK y el clivaje de caspasa-12,

marcan la activación de la vía de IRE1 (45, 65, 67). Finalmente, el incremento de los niveles de ARNm de GRP78, un efector inducido por las 3 vías de la UPR, nos confirma la presencia del estrés de RE en el corazón atontado.

De acuerdo a lo propuesto en los objetivos de este Trabajo de Tesis, comparamos la UPR detectada en el atontamiento con aquella que ocurre en respuesta a la injuria irreversible por I/R, insulto conocido como generador de estrés de RE y activador de la UPR (171). En ambos protocolos de I/R encontramos sobre-expresados los ARNm de XBP1-total, sXBP1 y GRP78, así como la activación de JNK y caspasa-12. Las diferencias surgieron a nivel del ARNm de CHOP y en la fosforilación de eIF2 α . La expresión del marcador pro-apoptótico CHOP, aumentó sólo en la injuria severa por I/R. Nuestros resultados indican que es la mayor duración del insulto isquémico el determinante de este incremento. La fosforilación de eIF2 α , por el contrario, aumentó en el atontamiento y no en la injuria severa por I/R. El motivo de la falta de este aumento podría atribuirse a la activación de GADD34, una fosfatasa activada por CHOP, encargada de desfosforilar eIF2 α y por lo tanto reactivar la síntesis proteica (163, 217).

La UPR inducida por el protocolo de atontamiento miocárdico activó respuestas tanto adaptativas como pro-apoptóticas (Figura 21). La fosforilación de eIF2 α limita la carga de proteínas mal plegadas en el RE y de esta manera alivia el estrés. El aumento de sXBP1 promueve la transcripción de genes que codifican para proteínas adaptativas como la chaperona GRP78, cuyos niveles de ARNm aumentados tras la I/R refuerzan la idea de una respuesta adaptativa. Por otra parte en nuestro protocolo de atontamiento, sin infarto ni aumento de apoptosis, se detectó la activación de caspasa-12 y JNK, dos moléculas inicialmente ligadas a la apoptosis inducida por estrés de RE (218-220). Estos resultados, aunque en principio contradictorios, podrían tener su explicación en diversas evidencias experimentales. En células en las que se silenció la caspasa-12 o en ratones deficientes de esta enzima, se demostró que la caspasa residente del RE no contribuye activamente a la apoptosis (221-224). Además, la caspasa-12 parece tener una actividad enzimática muy limitada y dirigida específicamente hacia su pro-enzima y no a otras caspasas de la cascada apoptótica (225). De este modo el procesamiento de caspasa-12, a pesar de ser utilizado como marcador del estrés de RE, sería un epifenómeno de la UPR. El rol de la activación de JNK en la respuesta al estrés de RE también ha sido reconsiderado (226-228). Actualmente se acepta que la señalización de JNK tendría efectos opuestos dependiendo del tiempo de la respuesta al estrés de RE. Se ha demostrado que la fase temprana y transitoria de la activación de JNK protege a células

que sufren estrés de RE a través de la expresión de genes anti-apoptóticos (226) y la inducción de la autofagia (227, 228). En contraste, la fase tardía de la activación de JNK es pro-apoptótica a través de los mecanismos descritos en la Introducción (226, 229). Teniendo en cuenta esta evidencia experimental y nuestros resultados, podemos especular que en el corazón atontado, tanto la activación de caspasa-12 como la fosforilación de JNK, o bien no desempeñan un rol pro-apoptótico o están siendo superadas por las vías que conducen a la supervivencia.

En conclusión, el balance final de las vías de la UPR activadas en nuestro modelo de atontamiento miocárdico, pone de manifiesto un predominio de las respuestas adaptativas por sobre las pro-apoptóticas (Figura 21).

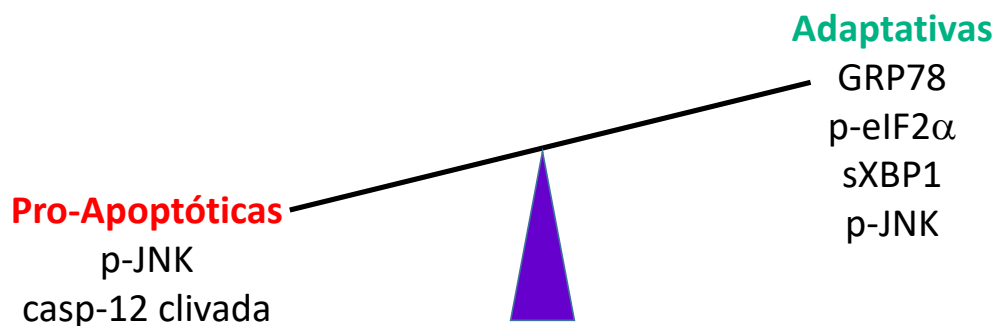


Figura 21. Activación de vías adaptativas y pro-apoptóticas de la UPR en I/R 20/30.

Un interrogante que surgió en nuestro estudio fue si la isquemia por sí sola era responsable de generar estrés de RE tal como se había demostrado en modelos celulares (173, 178). Los resultados obtenidos mostraron que la isquemia era capaz de inducir aumentos en los niveles del ARNm de GRP78 y no de sXBP1. La ausencia de aumento de este último marcador, específico de la vía de IRE1, podría indicar que la misma no está aún activada y que la regulación positiva de la expresión de GRP78 se debe a la activación de ATF6 y/o PERK. Este patrón de respuesta sugiere que existe una dinámica temporal diferente en la activación de las vías de la UPR, en línea con lo propuesto por otros grupos de investigación (171, 206). Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten descartar que sean los distintos estímulos estresores de la isquemia y de la reperfusión, los que promueven la activación diferencial de las vías.

6.2. El estrés de RE contribuye a la disfunción contráctil del atontamiento miocárdico

La participación del estrés de RE en diversas patologías ha sido inferida mediante el uso de herramientas farmacológicas, como las chaperonas químicas TUDCA y 4-PBA, y a través de la manipulación de los genes centrales de la UPR (208, 209). Para dar respuesta a otro de los objetivos de este trabajo de Tesis y desentrañar el rol que el estrés de RE está cumpliendo en el corazón atontado, utilizamos dos inhibidores del mismo, TUDCA y 4-PBA. Trabajos previos demostraron que la inhibición del estrés de RE por estas chaperonas, disminuyó el área de infarto y mejoró la función contráctil en corazones sometidos a injuria severa por I/R (período isquémico de 30 minutos o mayor) (195, 196, 210-212). En determinados casos, estos efectos beneficiosos se asociaron con la reducción del estrés oxidativo (196). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con estos fármacos también fue beneficioso en los corazones atontados. TUDCA y 4-PBA, que como era de esperar redujeron la expresión de marcadores de la UPR, aumentaron la contractilidad y disminuyeron la contractura. Estos hallazgos ponen en evidencia por primera vez un rol funcional y deletéreo del estrés de RE en la injuria moderada por I/R, independiente de la muerte celular por apoptosis. El efecto de la chaperonas no se asoció a cambios en el estrés oxidativo, a diferencia de lo encontrado en la injuria irreversible por I/R (196). Por lo tanto podemos concluir que el estrés de RE no contribuye al aumento del estrés oxidativo presente en la injuria reversible por I/R, aunque no podemos descartar que este estrés oxidativo haya participado en la inducción del estrés de RE.

Dado que los mecanismos que subyacen a la patogénesis del atontamiento son el aumento del estrés oxidativo y la sobrecarga de Ca^{+2} , descartado el primero, estudiamos si los efectos deletéreos del estrés de RE podrían estar relacionados con trastornos en el manejo del Ca^{+2} .

6.3. La inhibición del translocón mejora la recuperación contráctil del corazón atontado

Según reseñamos en la Introducción, estudios de nuestro grupo demostraron que en corazones de ratón sometidos a un protocolo de atontamiento, ocurre una depleción de Ca^{+2} del RS que contribuye a la sobrecarga citosólica de este ion al inicio de la reperfusión (99). Por otro lado evidencias experimentales en líneas celulares no musculares indican que inductores farmacológicos del estrés de RE, como taspargina o tunicamicina, promueven la liberación de Ca^{+2} del RE (214-216). Estas observaciones nos llevaron a especular que el estrés de RE podría estar colaborando, a

través de la pérdida de Ca^{+2} , con la sobrecarga citosólica de este ion al inicio de la reperfusión que se manifiesta en la disfunción contráctil del corazón atontado.

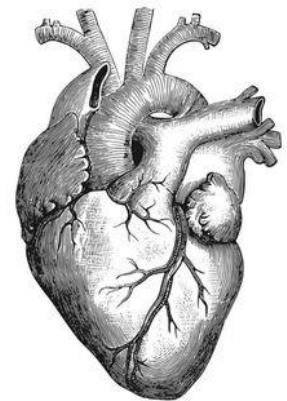
Estudios en células no miocíticas han demostrado que el translocón, un complejo proteico de la membrana reticular involucrado en el transporte de proteínas nacientes desde el citoplasma hacia la luz del RE, es a su vez un canal de pérdida pasiva de Ca^{+2} . Esta pérdida, aunque discutida en condiciones basales (230, 231), adquiere relevancia en respuesta a los inductores del estrés de RE (214-216). Se ha sugerido que el translocón permanece “sellado” desde su lado luminal por GRP78, pero cuando la chaperona es reclutada por las proteínas mal plegadas, se favorece la pérdida de Ca^{+2} (214, 216, 232). La presencia del translocón en el músculo cardíaco y el papel funcional que desempeña durante el estrés de RE inducido por la I/R, no se conoce.

Para evaluar el rol del translocón en la disfunción contráctil de la injuria moderada por I/R, utilizamos emetina como herramienta farmacológica. La emetina, al inhibir la elongación durante la síntesis proteica, induce la formación de complejos entre los polipéptidos nacientes y los ribosomas que bloquean el translocón, evitando de esta manera la fuga de Ca^{+2} (200). Nuestros resultados demuestran que la administración de emetina evitó la contractura isquémica y mejoró la recuperación contráctil durante la reperfusión, sin disminuir el estrés oxidativo inducido por la I/R. En consecuencia, podemos sugerir que al evitar la salida de Ca^{+2} por el translocón se limita la sobrecarga citosólica de Ca^{+2} y esto se traduce en una mejora de la función mecánica del corazón atontado.

El hecho de que la administración de emetina en nuestro modelo experimental previno el aumento de marcadores de la UPR sugiere que la depleción de Ca^{+2} por el translocón es condición suficiente para generar estrés de RE. Estos resultados concuerdan con los publicados por otros laboratorios utilizando otros inductores de estrés RE y diferentes tipos celulares (214, 215).

De los resultados obtenidos durante la evaluación del impacto funcional del estrés de RE en el atontamiento surge que el estrés de RE produce fuga de Ca^{+2} de la organela y que a su vez esta pérdida ocasiona estrés de RE. Estos hallazgos abonan el concepto planteado por otros investigadores de que la pérdida de Ca^{+2} puede ser tanto causa como consecuencia del estrés de RE (215).

7. Conclusiones



En conclusión, como se esquematiza en la Figura 22, nuestros resultados muestran que en el corazón atontado se desencadena el estrés de RE, con estimulación de las 3 vías de la UPR y activación de efectores que participan de respuestas tanto adaptativas como pro-apoptóticas. La ausencia de muerte celular en el corazón atontado indicaría un predominio de las vías adaptativas. Pero es la pérdida de Ca^{+2} por el translocón producida durante el estrés de RE, lo que parece ser responsable del detrimento de la recuperación contráctil post-isquémica. Este trabajo de Tesis sugiere que la prevención del estrés de RE por la utilización de chaperonas químicas o por inhibición del translocón, puede ser una herramienta terapéutica para disminuir el deterioro de la función contráctil en situaciones clínicas como la reperfusión luego de terapias de revascularización o luego de la trombolisis subsecuente a un infarto agudo de miocardio (233).

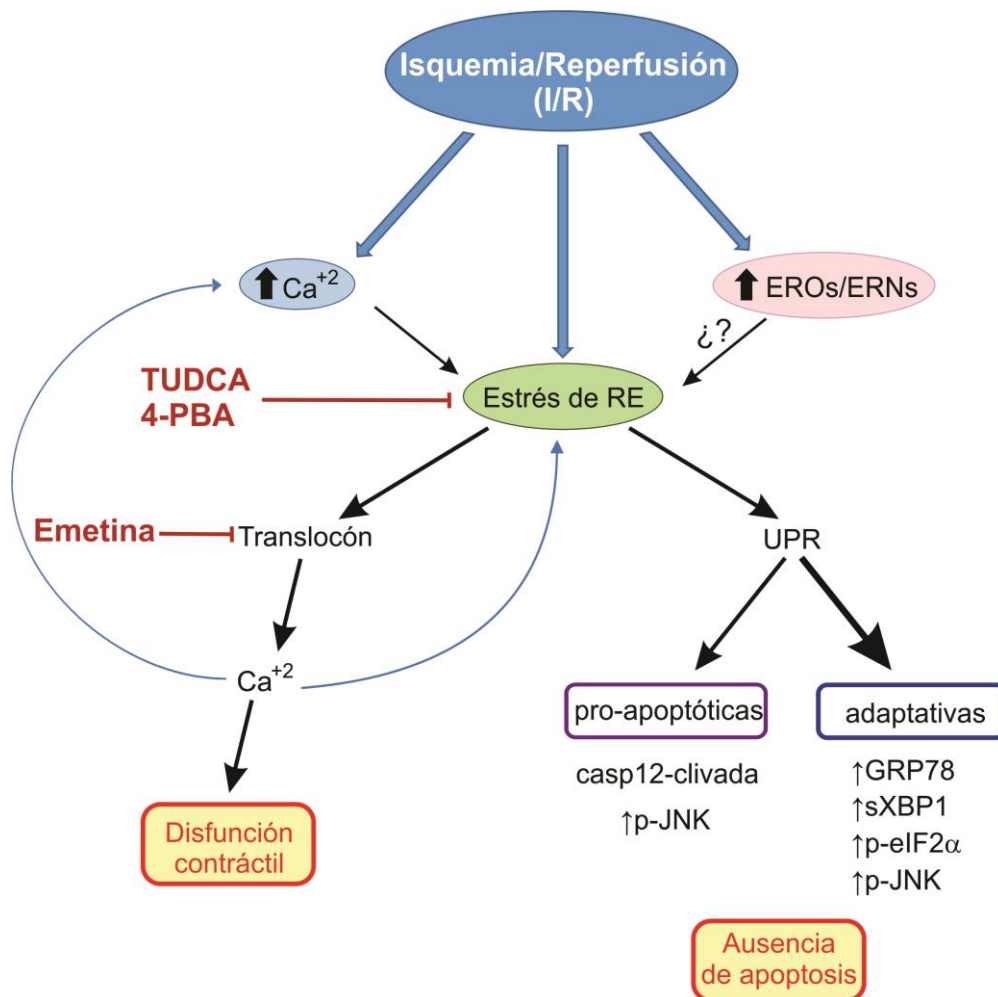
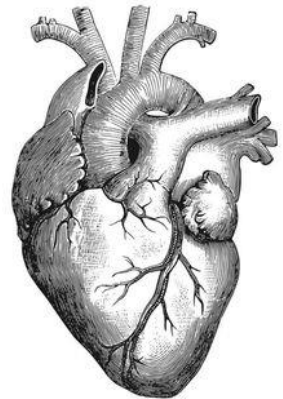


Figura 22. Estrés de RE y atontamiento.

8. Bibliografía



1. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
2. Michalak M, Opas M. Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends Cell Biol*. 2009;19(6):253-9.
3. Porter KR, Claude A, Fullam EF. A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *J Exp Med*. 1945;81(3):233-46.
4. Palade GE, Siekevitz P. Liver microsomes; an integrated morphological and biochemical study. *J Biophys Biochem Cytol*. 1956;2(2):171-200.
5. Simmen T, Lynes EM, Gesson K, Thomas G. Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta*. 2010;1798(8):1465-73.
6. Watson ML. The nuclear envelope; its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J Biophys Biochem Cytol*. 1955;1(3):257-70.
7. Maggio R, Siekevitz P, Palade GE. Studies on isolated nuclei. I. Isolation and chemical characterization of a nuclear fraction from guinea pig liver. *J Cell Biol*. 1963;18:267-91.
8. Franke WW. Structure and function of nuclear membranes. *Biochem Soc Symp*. 1977(42):125-35.
9. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(1):79-94.
10. Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, et al. Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol*. 2001;154(5):961-72.
11. Lièvremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem*. 1997;272(49):30873-9.
12. Van PN, Peter F, Söling HD. Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles. *J Biol Chem*. 1989;264(29):17494-501.
13. Lucero HA, Lebeche D, Kaminer B. ERcalcostorin/protein-disulfide isomerase acts as a calcium storage protein in the endoplasmic reticulum of a living cell. Comparison with calreticulin and calsequestrin. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9857-63.
14. Vertel BM, Walters LM, Mills D. Subcompartments of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Biol*. 1992;3(5):325-41.
15. Glembotski CC. Roles for the sarco-/endoplasmic reticulum in cardiac myocyte contraction, protein synthesis, and protein quality control. *Physiology (Bethesda)*. 2012;27(6):343-50.
16. Walter P, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 1981;91(2 Pt 1):551-6.
17. Reid DW, Nicchitta CV. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(4):221-31.
18. Walter P, Ibrahim I, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 1981;91(2 Pt 1):545-50.

19. Gilmore R, Blobel G, Walter P. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol.* 1982;95(2 Pt 1):463-9.
20. Meyer DI, Krause E, Dobberstein B. Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein". *Nature.* 1982;297(5868):647-50.
21. Rapoport TA. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature.* 2007;450(7170):663-9.
22. Evans EA, Gilmore R, Blobel G. Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(3):581-5.
23. Seiser RM, Nicchitta CV. The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33820-7.
24. Potter MD, Nicchitta CV. Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33828-35.
25. Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.* 2006;13(3):374-84.
26. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(12):2277-93.
27. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol.* 2014;204(6):869-79.
28. van der Zand A, Gent J, Braakman I, Tabak HF. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell.* 2012;149(2):397-409.
29. van Geest M, Lolkema JS. Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(1):13-33.
30. Cymer F, von Heijne G, White SH. Mechanisms of integral membrane protein insertion and folding. *Journal of molecular biology.* 2015;427(5):999-1022.
31. Rutkowski DT, Hegde RS. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol.* 2010;189(5):783-94.
32. Dufey E, Sepulveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;307(7):C582-94.
33. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2010;107(9):1071-82.
34. Wang S, Binder P, Fang Q, Wang Z, Xiao W, Liu W, et al. Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *British journal of pharmacology.* 2018;175(8):1293-304.
35. Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, et al. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol.* 1998;18(12):7499-509.
36. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999;397(6716):271-4.
37. Cox JS, Shamu CE, Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell.* 1993;73(6):1197-206.
38. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 1998;12(12):1812-24.

39. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998;17(19):5708-17.
40. Niwa M, Sidrauski C, Kaufman RJ, Walter P. A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. *Cell.* 1999;99(7):691-702.
41. Zhu C, Johansen FE, Prywes R. Interaction of ATF6 and serum response factor. *Mol Cell Biol.* 1997;17(9):4957-66.
42. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* 1998;273(50):33741-9.
43. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 1999;10(11):3787-99.
44. Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(9):436-43.
45. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000;287(5453):664-6.
46. Bernales S, Schuck S, Walter P. ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 2007;3(3):285-7.
47. Clarke R, Cook KL, Hu R, Facey CO, Tavassoly I, Schwartz JL, et al. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate. *Cancer Res.* 2012;72(6):1321-31.
48. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44(4):654-61.
49. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2656-64.
50. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):89-102.
51. Shiu RP, Pouyssegur J, Pastan I. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(9):3840-4.
52. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* 1983;306(5941):387-9.
53. Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell.* 1986;46(2):291-300.
54. Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(10):469-76.
55. Doroudgar S, Glembotski CC. New concepts of endoplasmic reticulum function in the heart: programmed to conserve. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;55:85-91.
56. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2(6):326-32.
57. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 2000;6(5):1099-108.
58. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell.* 2001;7(6):1165-76.

59. Luo S, Baumeister P, Yang S, Abcouwer SF, Lee AS. Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37375-85.
60. Cullinan SB, Diehl JA. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2004;279(19):20108-17.
61. Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27013-20.
62. Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, Welihinda A, Kaufman RJ. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2000;14(21):2725-36.
63. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:739-89.
64. Karagöz GE, Acosta-Alvear D, Nguyen HT, Lee CP, Chu F, Walter P. An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1. *Elife.* 2017;6.
65. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107(7):881-91.
66. Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem.* 2004;136(3):343-50.
67. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* 2001;276(17):13935-40.
68. Wang Q, Groenendyk J, Paskevicius T, Qin W, Kor KC, Liu Y, et al. Two pools of IRE1 α in cardiac and skeletal muscle cells. *Faseb j.* 2019;33(8):8892-904.
69. Carreras-Sureda A, Jana F, Urra H, Durand S, Mortenson DE, Sagredo A, et al. Non-canonical function of IRE1 α determines mitochondria-associated endoplasmic reticulum composition to control calcium transfer and bioenergetics. *Nat Cell Biol.* 2019;21(6):755-67.
70. Nadanaka S, Okada T, Yoshida H, Mori K. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2007;27(3):1027-43.
71. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 2002;3(1):99-111.
72. Groenendyk J, Sreenivasaiiah PK, Kim DH, Agellon LB, Michalak M. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res.* 2010;107(10):1185-97.
73. Jin JK, Blackwood EA, Azizi K, Thuerauf DJ, Fahem AG, Hofmann C, et al. ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart. *Circ Res.* 2017;120(5):862-75.
74. Thuerauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 α and ATF6 β on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22865-78.
75. Correll RN, Grimes KM, Prasad V, Lynch JM, Khalil H, Molkenstein JD. Overlapping and differential functions of ATF6 α versus ATF6 β in the mouse heart. *Sci Rep.* 2019;9(1):2059.
76. Piper HM, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(2):S644-8.

77. Garcia-Dorado D, Piper HM. Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation. *Cardiovasc Res.* 2006;69(1):1-3.
78. Heyndrickx GR, Baig H, Nellens P, Leusen I, Fishbein MC, Vatner SF. Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. *Am J Physiol.* 1978;234(6):H653-9.
79. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982;66(6):1146-9.
80. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999;79(2):609-34.
81. Nixon JV, Brown CN, Smitherman TC. Identification of transient and persistent segmental wall motion abnormalities in patients with unstable angina by two-dimensional echocardiography. *Circulation.* 1982;65(7):1497-503.
82. Homans DC, Sublett E, Elsperger KJ, Schwartz JS, Bache RJ. Mechanisms of remote myocardial dysfunction during coronary artery occlusion in the presence of multivessel disease. *Circulation.* 1986;74(3):588-96.
83. Jeroudi MO, Cheirif J, Habib G, Bolli R. Prolonged wall motion abnormalities after chest pain at rest in patients with unstable angina: a possible manifestation of myocardial stunning. *American heart journal.* 1994;127(5):1241-50.
84. Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res.* 1997;80(3):393-9.
85. Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res.* 1998;82(2):261-71.
86. Vanden Berghe T, Kaiser WJ, Bertrand MJ, Vandenabeele P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Mol Cell Oncol.* 2015;2(4):e975093.
87. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox biology.* 2015;6:524-51.
88. Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Roberts R. Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation.* 1985;72(4):915-21.
89. Piper H. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research.* 1998;38(2):291-300.
90. Piper H. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research.* 2004;61(3):365-71.
91. Hendrikx M, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Van Hecke P, Vanstapel F, et al. New Na(+)-H+ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca²⁺ overload in isolated perfused rabbit heart. 1994;89(6):2787-98.
92. Insete J, Barba I, Hernando V, Garcia-Dorado D. Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. 2009;81(1):116-22.
93. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17(11):1029-42.
94. Park CO, Xiao XH, Allen DG. Changes in intracellular Na⁺ and pH in rat heart during ischemia: role of Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol.* 1999;276(5):H1581-90.

95. Anderson SE, Murphy E, Steenbergen C, London RE, Cala PM. Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. *Am J Physiol.* 1990;259(6 Pt 1):C940-8.
96. Nawada R, Murakami T, Iwase T, Nagai K, Morita Y, Kouchi I, et al. Inhibition of sarcolemmal Na⁺,K⁺-ATPase activity reduces the infarct size-limiting effect of preconditioning in rabbit hearts. *Circulation.* 1997;96(2):599-604.
97. Van Emous JG, Schreur JH, Ruigrok TJ, Van Echteld CJ. Both Na⁺-K⁺ ATPase and Na⁺-H⁺ exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(2):337-48.
98. Grinwald PM, Brosnahan C. Sodium imbalance as a cause of calcium overload in post-hypoxic reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19(5):487-95.
99. Valverde CA, Korniyev D, Ferreiro M, Petrosky AD, Mattiazzi A, Escobar AL. Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2010;85(4):671-80.
100. Inserte J. Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism*1. 2004;64(1):105-14.
101. Yoshikawa Y, Hagihara H, Ohga Y, Nakajima-Takenaka C, Murata KY, Taniguchi S, et al. Calpain inhibitor-1 protects the rat heart from ischemia-reperfusion injury: analysis by mechanical work and energetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(4):H1690-8.
102. Armstrong SC, Latham CA, Shivell CL, Ganote CE. Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(6):1165-79.
103. Pedrozo Z, Sanchez G, Torrealba N, Valenzuela R, Fernandez C, Hidalgo C, et al. Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(3):356-62.
104. French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK, et al. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(1):H128-36.
105. Thomas SA, Fallavollita JA, Lee TC, Feng J, Canty JM. Absence of troponin I degradation or altered sarcoplasmic reticulum uptake protein expression after reversible ischemia in swine. *Circ Res.* 1999;85(5):446-56.
106. Kim SJ, Kudej RK, Yatani A, Kim YK, Takagi G, Honda R, et al. A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca²⁺ handling. *Circ Res.* 2001;89(9):831-7.
107. Pérez NG, Marbán E, Cingolani HE. Preservation of myofilament calcium responsiveness underlies protection against myocardial stunning by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 1999;42(3):636-43.
108. Valverde CA, Mundiña-Weilenmann C, Reyes M, Kranias EG, Escobar AL, Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of intracellular Ca²⁺ after perfusion arrest in isolated, perfused mouse heart. *Cardiovasc Res.* 2006;70(2):335-45.
109. Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res.* 2014;114(3):524-37.
110. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* 2014;2:702-14.
111. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94(3):909-50.
112. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:93-136.

113. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13.
114. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(5):687-706.
115. Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ, Diebold I, Altenhöfer S, Radermacher KA, et al. NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Med (Berl).* 2012;90(12):1391-406.
116. Doerries C, Grote K, Hilfiker-Kleiner D, Luchtefeld M, Schaefer A, Holland SM, et al. Critical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. *Circ Res.* 2007;100(6):894-903.
117. Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, et al. Broad suppression of NADPH oxidase activity exacerbates ischemia/reperfusion injury through inadvertent downregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Circ Res.* 2013;112(8):1135-49.
118. Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends in cardiovascular medicine.* 2014;24(5):202-5.
119. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17(2):145-52.
120. Thompson-Gorman SL, Zweier JL. Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem.* 1990;265(12):6656-63.
121. Gonzalez DR, Treuer AV, Castellanos J, Dulce RA, Hare JM. Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(37):28938-45.
122. Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM. Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1980;12(8):797-808.
123. Schoenberg MH, Fredholm BB, Haglund U, Jung H, Sellin D, Younes M, et al. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiol Scand.* 1985;124(4):581-9.
124. Kogure K, Watson BD, Busto R, Abe K. Potentiation of lipid peroxides by ischemia in rat brain. *Neurochem Res.* 1982;7(4):437-54.
125. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2012;133(2):230-55.
126. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):H1269-75.
127. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(2):C227-41.
128. Tatarková Z, Aplán P, Matejovicová M, Lehotský J, Dobrota D, Flameng W. Effect of ischemia and reperfusion on protein oxidation in isolated rabbit hearts. *Physiol Res.* 2005;54(2):185-91.
129. Metzger J, Lauterburg BH. Effect of allopurinol on oxidant stress and hepatic function following ischemia and reperfusion in the rat. *Liver.* 1988;8(6):344-9.
130. Jackson RM, Veal CF. Effects of hypoxia and reoxygenation on lung glutathione system. *Am J Physiol.* 1990;259(2 Pt 2):H518-24.
131. Shivakumar BR, Kolluri SV, Ravindranath V. Glutathione homeostasis in brain during reperfusion following bilateral carotid artery occlusion in the rat. *Mol Cell Biochem.* 1992;111(1-2):125-9.

132. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007;75(2):283-90.
133. Tullio F, Angotti C, Perrelli MG, Penna C, Pagliaro P. Redox balance and cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(6):392.
134. Penna C, Angotti C, Pagliaro P. Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(6):647-62.
135. Wink DA, Miranda KM, Katori T, Mancardi D, Thomas DD, Ridnour L, et al. Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(6):H2264-76.
136. Tocchetti CG, Stanley BA, Murray CI, Sivakumaran V, Donzelli S, Mancardi D, et al. Playing with cardiac "redox switches": the "HNO way" to modulate cardiac function. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(9):1687-98.
137. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.
138. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* 2004;19:124-8.
139. Dos Santos A, Gurfinkelti E. Troponinas cardíacas en los síndromes coronarios agudos. *Rev Argent Cardiol.* 1999;67:391-8.
140. Bel M. Marcadores biológicos de necrosis miocárdica. In: Soldevila JG, Ordóñez Llanosc J, editors. *Rev Esp Cardiol* 2003. p. 703-20.
141. Zhu H, Sun A. Programmed necrosis in heart disease: Molecular mechanisms and clinical implications. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;116:125-34.
142. Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;35:14-23.
143. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
144. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73(4):1907-16.
145. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 2002;277(37):34287-94.
146. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656.
147. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):26-35.
148. Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2006;281(40):29652-9.
149. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
150. Li MX, Dewson G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. *F1000Prime Rep.* 2015;7:42.
151. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74(4):609-19.
152. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res.* 2012;111(9):1198-207.
153. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-32.

154. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 2002;9(2):423-32.
155. Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31199-203.
156. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*. 1999;144(2):281-92.
157. Cheng TC, Hong C, Akey IV, Yuan S, Akey CW. A near atomic structure of the active human apoptosome. *Elife*. 2016;5.
158. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412(6842):95-9.
159. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998;391(6662):43-50.
160. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000;256(1):12-8.
161. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001;21(4):1249-59.
162. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 2007;129(7):1337-49.
163. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*. 2001;153(5):1011-22.
164. Li SY, Gilbert SA, Li Q, Ren J. Aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) ameliorates chronic alcohol ingestion-induced myocardial insulin resistance and endoplasmic reticulum stress. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(2):247-55.
165. Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, et al. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 2009;186(6):783-92.
166. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 2002;16(11):1345-55.
167. Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton JP, Xu W, Hagen A, et al. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*. 2009;138(3):562-75.
168. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2009;186(3):323-31.
169. Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*. 2006;313(5783):104-7.
170. Maurel M, Dejeans N, Taouji S, Chevet E, Grosset CF. MicroRNA-1291-mediated silencing of IRE1alpha enhances Glypican-3 expression. *RNA*. 2013;19(6):778-88.
171. Wang X, Xu L, Gillette TG, Jiang X, Wang ZV. The unfolded protein response in ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;117:19-25.
172. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T, et al. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(4):1406-11.

173. Thuerlauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 2006;99(3):275-82.
174. Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, Horio E, Miura M, Tsujita K, et al. C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):1124-32.
175. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation.* 2010;122(4):361-9.
176. Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, Isomura T, et al. X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(6):1280-9.
177. Martindale JJ, Fernandez R, Thuerlauf D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA, et al. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res.* 2006;98(9):1186-93.
178. Doroudgar S, Thuerlauf DJ, Marcinko MC, Belmont PJ, Glembotski CC. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem.* 2009;284(43):29735-45.
179. Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Okada S, Minamino T, Terasaki F, et al. ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(1):113-20.
180. Blackwood EA, Azizi K, Thuerlauf DJ, Paxman RJ, Plate L, Kelly JW, et al. Pharmacologic ATF6 activation confers global protection in widespread disease models by reprogramming cellular proteostasis. *Nat Commun.* 2019;10(1):187.
181. Vitadello M, Penzo D, Petronilli V, Michieli G, Gomirato S, Menabò R, et al. Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia. *FASEB J.* 2003;17(8):923-5.
182. Vekich JA, Belmont PJ, Thuerlauf DJ, Glembotski CC. Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(2):259-67.
183. Thuerlauf DJ, Hoover H, Meller J, Hernandez J, Su L, Andrews C, et al. Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase-2 expression is regulated by ATF6 during the endoplasmic reticulum stress response: intracellular signaling of calcium stress in a cardiac myocyte model system. *J Biol Chem.* 2001;276(51):48309-17.
184. Glembotski CC, Rosarda JD, Wiseman RL. Proteostasis and Beyond: ATF6 in Ischemic Disease. *Trends Mol Med.* 2019;25(6):538-50.
185. Wang ZV, Deng Y, Gao N, Pedrozo Z, Li DL, Morales CR, et al. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell.* 2014;156(6):1179-92.
186. Zeng L, Xiao Q, Chen M, Margariti A, Martin D, Ivetic A, et al. Vascular endothelial cell growth-activated XBP1 splicing in endothelial cells is crucial for angiogenesis. *Circulation.* 2013;127(16):1712-22.
187. Matsui Y, Kyoj S, Takagi H, Hsu CP, Hariharan N, Ago T, et al. Molecular mechanisms and physiological significance of autophagy during myocardial ischemia and reperfusion. *Autophagy.* 2008;4(4):409-15.
188. Bi X, Zhang G, Wang X, Nguyen C, May HI, Li X, et al. Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78 Protects Heart From Ischemia/Reperfusion Injury Through Akt Activation. *Circ Res.* 2018;122(11):1545-54.
189. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation.* 2000;101(6):660-7.

190. Yamashita K, Kajstura J, Discher DJ, Wasserlauf BJ, Bishopric NH, Anversa P, et al. Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1. *Circ Res.* 2001;88(6):609-14.
191. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, et al. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation.* 2001;104(3):330-5.
192. Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA. Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 24):5675-8.
193. Ouyang YB, Xu LJ, Emery JF, Lee AS, Giffard RG. Overexpressing GRP78 influences Ca²⁺ handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress. *Mitochondrion.* 2011;11(2):279-86.
194. Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(1):39-50.
195. Wang G, Huang H, Zheng H, He Y, Zhang Y, Xu Z, et al. Zn²⁺ and mPTP Mediate Endoplasmic Reticulum Stress Inhibition-Induced Cardioprotection Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Biol Trace Elem Res.* 2016;174(1):189-97.
196. Jian L, Lu Y, Lu S, Lu C. Chemical Chaperone 4-Phenylbutyric Acid Reduces Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Med Sci Monit.* 2016;22:5218-27.
197. Lemmens-Gruber R, Karkhaneh A, Studenik C, Heistracher P. Cardiotoxicity of emetine dihydrochloride by calcium channel blockade in isolated preparations and ventricular myocytes of guinea-pig hearts. *Br J Pharmacol.* 1996;117(2):377-83.
198. Engin F, Hotamisligil GS. Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12 Suppl 2:108-15.
199. Cortez L, Sim V. The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion.* 2014;8(2):197-202.
200. Ong HL, Liu X, Sharma A, Hegde RS, Ambudkar IS. Intracellular Ca²⁺ release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflugers Arch.* 2007;453(6):797-808.
201. Salas MA, Valverde CA, Sánchez G, Said M, Rodriguez JS, Portiansky EL, et al. The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(6):1298-306.
202. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
203. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
204. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-34.
205. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
206. Erguler K, Pieri M, Deltas C. A mathematical model of the unfolded protein stress response reveals the decision mechanism for recovery, adaptation and apoptosis. *BMC Syst Biol.* 2013;7:16.
207. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013;123(1):92-100.
208. Samali A, Fitzgerald U, Deegan S, Gupta S. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Int J Cell Biol.* 2010;2010:830307.

209. Sarvani C, Sireesh D, Ramkumar KM. Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases. *Pharmacol Res.* 2017;119:412-21.
210. Luo T, Kim JK, Chen B, Abdel-Latif A, Kitakaze M, Yan L. Attenuation of ER stress prevents post-infarction-induced cardiac rupture and remodeling by modulating both cardiac apoptosis and fibrosis. *Chem Biol Interact.* 2015;225:90-8.
211. Wang ZH, Liu JL, Wu L, Yu Z, Yang HT. Concentration-dependent wrestling between detrimental and protective effects of H₂O₂ during myocardial ischemia/reperfusion. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1297.
212. Yu Y, Sun G, Luo Y, Wang M, Chen R, Zhang J, et al. Cardioprotective effects of Notoginsenoside R1 against ischemia/reperfusion injuries by regulating oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-related signaling pathways. *Sci Rep.* 2016;6:21730.
213. Oveson BC, Iwase T, Hackett SF, Lee SY, Usui S, Sedlak TW, et al. Constituents of bile, bilirubin and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration. *J Neurochem.* 2011;116(1):144-53.
214. Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, Katsogiannou M, Slomianny C, Roudbaraki M, et al. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J.* 2013;27(4):1600-9.
215. Paredes RM, Bollo M, Holstein D, Lechleiter JD. Luminal Ca²⁺ depletion during the unfolded protein response in *Xenopus* oocytes: cause and consequence. *Cell Calcium.* 2013;53(4):286-96.
216. Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, et al. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J.* 2012;31(15):3282-96.
217. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004;18(24):3066-77.
218. Fujita E, Kouroku Y, Jimbo A, Isoai A, Maruyama K, Momoi T. Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. *Cell Death Differ.* 2002;9(10):1108-14.
219. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000;403(6765):98-103.
220. Wang Q, Zhang H, Zhao B, Fei H. IL-1beta caused pancreatic beta-cells apoptosis is mediated in part by endoplasmic reticulum stress via the induction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biochem.* 2009;324(1-2):183-90.
221. Obeng EA, Boise LH. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005;280(33):29578-87.
222. Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, et al. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature.* 2004;429(6987):75-9.
223. Saleh M, Mathison JC, Wolinski MK, Bensinger SJ, Fitzgerald P, Droin N, et al. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature.* 2006;440(7087):1064-8.
224. Sharma R, Gow A. Minimal role for caspase 12 in the unfolded protein response in oligodendrocytes in vivo. *J Neurochem.* 2007;101(4):889-97.
225. Roy S, Sharom JR, Houde C, Loisel TP, Vaillancourt JP, Shao W, et al. Confinement of caspase-12 proteolytic activity to autoprocessing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(11):4133-8.
226. Brown M SN, Suwara M, Sutcliffe LK, Mihai AD, Ali AA, Watson JN, Schröder M. An initial phase of JNK activation inhibits cell death early in the endoplasmic reticulum stress response. *J Cell Sci* 2016;129:2317-28.
227. Cheng X, Liu H, Jiang CC, Fang L, Chen C, Zhang XD, et al. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy through IRE1/JNK/beclin-1 in breast cancer cells. *Int J Mol Med.* 2014;34(3):772-81.

228. Raciti M, Lotti LV, Valia S, Pulcinelli FM, Di Renzo L. JNK2 is activated during ER stress and promotes cell survival. *Cell Death Dis.* 2012;3:e429.
229. Ventura JJ, Hübner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell.* 2006;21(5):701-10.
230. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, et al. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 18):4135-42.
231. Amer MS, Li J, O'Regan DJ, Steele DS, Porter KE, Sivaprasadarao A, et al. Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(4):H910-6.
232. Alder NN SY, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. . The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. . *J Cell Biol* 2005;168:389-99.
233. Pomblum VJ, Korbmayer B, Cleveland S, Sunderdiek U, Klocke RC, Schipke JD. Cardiac stunning in the clinic: the full picture. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010;10(1):86-91.