
ROL DE LAS MITOCONDRIAS Y DE LAS ESPECIE REACTIVAS DE OXIGENO EN LA PROGRESION DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA

ROLE OF MITOCHONDRIA AND REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE PROGRESSION OF HEART FAILURE

Gustavo Guzmán Montesana; Alejandra Baez; Roque Cordoba; Ricardo Domínguez; Silvina Lo Presti; Walter Rivarola; Patricia Pons; Ricardo Fretes; Patricia Paglini-Oliva.

Resumen

La Insuficiencia Cardiaca Congestiva (ICC), estaría asociada a alteraciones mitocondriales y al aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS). Para esclarecer estos aspectos estudiamos la estructura, función mitocondrial como así la presencia de enzima oxido nitrosintasa inducible (iNOS) y la lipoperoxidación de membranas, mediante el ion peroxidonitrito (ONOO⁻), en el músculo cardíaco y esquelético de pacientes con ICC. Se incluyeron 25 pacientes que fueron sometidos a cirugía cardiovascular a los que se realizaron biopsias endomio-cardíaca y de músculo esquelético. Se los estratificó en: grupo con ICC (n=18) y grupo control (n=7). En dichas biopsias se analizó actividad enzimática del complejo III mitocondrial por espectrofotometría, medida en mM.ubiquinona-1.mg prot, mientras que la morfología mitocondrial se analizó con microscopio electrónico Zeiss. La lipoperoxidación de membranas se midió por la presencia de ONOO⁻ por inmunohistoquímica. El test estadístico utilizado fue ANOVA. El músculo cardíaco de los pacientes con ICC mostró un área mitocondrial disminuida (78%) con respecto al control (160,37µm² ±9,87); (936,81µm²±78,48) p<0.0001. También se observó una reducción (70%) en la actividad del complejo III comparada con el control (1,9 10⁻² mM ubiq.mim-1.mg prot±12,6); (5,79 10⁻²mM ubiq.mim-1.mg prot±36,6) p<0,001, situación similar a la observada en el músculo esquelético de los pacientes con ICC. Mientras que la presencia de ONOO⁻ estuvo significativamente aumentado en el grupo de paciente con ICC (p<0.05). Las alteraciones ultraestructurales y funcionales encontradas en las mitocondrias de pacientes con ICC y el aumento de ROS, se encuentran involucradas en la fisiopatología de la ICC.

Palabras claves: Mitocondrias • Insuficiencia cardíaca • iNOS • lipoperoxidación de membranas.

Abstract

Congestive heart failure (CHF) would be associated with mitochondrial abnormalities and increased of reactive species of oxygen (ROS). To clarify these issues we studied the structure, function of the mitochondrial enzyme nitro oxide synthase inducible (iNOS) and lipoperoxidation of membranes, one of their products through the peroxide nitrite ion (ONOO⁻), in the heart muscle of patients with heart failure congestive (ICC) grade III and IV (according to New York Heart Association). We included 25 patients who underwent cardiovascular surgery to biopsies of the heart muscle. They were stratified into a group with CHF (n = 18) and control group (n = 7). In dichas biopsies analyzed the enzymatic activity of mitochondrial complex III spectrophotometrically, which was measured in mM.ubiquinona-1.mg prot, while the mitochondrial morphology was analyzed by the Zeiss electron microscope, the areas

were quantified with program Axionvision 4.6. Lipoperoxidation of membranes was measured by the presence of ONOO- by immunohistochemistry against primary antibody against 3-nitrotyrosine was used lab kit system biogenic streptavidin biotin peroxidase (SBA) and coloring triaminobenzidine (TAB), it is made with semiquantification intensity SCORE test. The statistical test used was ANOVA. The heart muscle of patients with CHF showed that the mitochondrial area was reduced by 78% compared with the control ($160.37 \mu\text{m}^2 \pm 9.87$) ($936.81 \mu\text{m}^2 \pm 78.48$) $p < 0.0001$. There was also a 70% reduction in complex III activity compared to control ($1.9 \cdot 10^{-2} \text{ mM ubiq.mim-prot } 1.\text{mg} \pm 12.6$) ($5.79 \cdot 10^{-2} \text{ mM ubiq.mim-prot } 1.\text{mg} \pm 36.6$) $p < 0.001$. The presence of ONOO- was significantly increased in patients with CHF ($p < 0.05$). Alterations ultrastructural and functional mitochondria found in patients with CHF and increased ROS are involved in the measures of pathophysiology CCI and whites should be taken into account for future therapies of this condition.

Introducción

La comprensión de los mecanismos que conducen a la insuficiencia cardiaca, es uno de los mayores retos de la cardiología actual. Interpretar las vías neurohormonales y como éstas interactúan a nivel celular y molecular, es el comienzo para alcanzar este gran objetivo. ⁽¹⁾

El corazón es un órgano con un gran consumo de energía por ello es altamente oxidativo; este vital recurso es aportado por las mitocondrias que representan aproximadamente el 30% del volumen total de los cardiomiocitos y le proveen el 90% de la energía que ellos requieren(). Tal actividad oxidativa los hacen blancos de las especies reactivas del oxígeno (ROS). ⁽¹⁾

Involucrado en la vía de síntesis del ROS, moléculas inestables, se encuentran la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), de las cuales se reconocen dos isoformas: las constitutivas (NOS endotelial eNOS, NOS neural nNOS) y las inducibles (iNOS) ¹. El rol principal de las NOS es la síntesis del óxido nítrico (NO) el cual participa de forma importante en el funcionamiento cardiaco provocando efectos vasculares como vasodilatación y no vasculares como su intervención en la regulación de la producción de energía en la cadena respiratoria ².

La mayor parte del oxígeno utilizado por los miocitos es reducido a agua por vía del complejo IV mitocondrial. En esta reducción del O₂ pueden producir radicales libres dependientes del oxígeno

(ROS) como ser aniones superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales hidroxilo (OH); por otro lado la reacción del anión superóxido origina los peroxinitritos (ONOO-) llamado especies reactivas del nitrito (ERN) que son altamente citotóxicos ya que causan la oxidación de los fosfolípidos de membrana, proteínas y material genético ³, estos han sido implicados en una amplia gama de condiciones patológicas incluyendo lesión de isquemia, enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento. En virtud de los efectos tóxicos que estas biomoléculas producen a nivel celular, existen enzimas (basureros) como: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSHPx), catalasa y otros antioxidantes no enzimáticos capaces de prevenir de los efectos tóxicos de los ROS. Sin embargo si la producción de ROS es excesiva el estrés oxidativo puede tener un efecto perjudicial sobre la función y la integridad de los tejidos biológicos ⁴.

Estudios experimentales y clínicos han sugerido que el estrés oxidativo es uno de los principales participantes en la remodelación y fracaso miocárdico, estos hechos se asocian a que los corazones con insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) presentan un incremento de ROS y reducción de enzimas anti-oxidantes, además este aumento crónico de radicales dependiente del oxígeno en la mitocondria puede conducir a un ciclo catastrófico de daños en el ADN mitocondrial (ADNmt), así como la disminución funcional del

miocardio mediada a través de una lesión celular. Especies reactivas de oxígeno pueden inducir hipertrofia del miocito, apoptosis y fibrosis intersticial mediante la activación de metaloproteinasas de matriz. Estos eventos celulares juegan un papel importante en el desarrollo y la progresión de la remodelación miocárdica⁵.

También se han hallado en músculo cardíaco alteraciones a nivel ultraestructural, principalmente en la estructura y función mitocondrial⁶⁻⁷; en miocardiopatías hipertrofiadas y dilatadas se identifican defectos en la cadena respiratoria y en la fosforilación oxidativa^{8,9}, así como mutaciones en el citocromo c y de-lesiones del DNA mitocondrial, cuya relación con la cardiopatía aún no ha sido explicada^{7,9,10}; los defectos de conducción y las arritmias se han detectado en pacientes que también tenían alteraciones en la β oxidación.

Por otro lado se han postulados que las alteraciones mitocondriales para el músculo cardíaco serían acompañados de daños similares en la misma organela del músculo esquelético¹¹.

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue establecer la influencia del ROS (medida por el ion peroxidinitrito y la enzima iNOS) sobre la estructura y función mitocondrial de músculo cardíaco y esquelético en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) grado III y IV según New York Heart Association (NYHA), hecho que contribuiría por un lado a la mejor comprensión de los factores involucrados en la progresión de la ICC y por otro conocer el estado celular del corazón mediante una biopsia de cualquier músculo estriado.

Materiales y Métodos

Pacientes

Fueron incluidos en este estudio aquellos pacientes que fueron sometidos a cirugía cardiovascular por diferentes motivos; a ellos se les confeccionó una historia clínica con datos epidemiológicos, metabólicos, hábitos tóxicos, signos y síntomas de los diferentes grado de insuficiencia cardíaca congestiva como así también fármacos utilizados para su tratamiento. De

ellos se obtuvo una muestra de ventrículo izquierdo y de músculo esquelético (músculo pectoral mayor) de 1 mm².

Criterios de inclusión

Pacientes control (n= 7)

1. Paciente menores 40 años, de ambos sexos.
2. Fracción de Eyección > 60%.
3. Sin enfermedad reumatológicas.
4. Con comunicación Interauricular como diagnóstico previo a la cirugía.

Pacientes con miocardiopatías (n=18)

1. Pacientes mayores de 40 años, ambos sexos.
2. Enfermedad Cardiovascular Secundaria.
3. ICC grado III – IV según la NYHA.
4. Sin enfermedades reumatológicas o inmunológicas.

Preparación del material para microscopía electrónica.

Las biopsias de miocardio y músculo esquelético de los pectorales, se fijaron en solución de Karnovsky compuesto de una mezcla de formaldehído al 4 % y glutaraldehído 1.5% en el tampón cacodilato 0.1 M durante un período mínimo de 2 hs a temperatura ambiente. El glutaraldehído al 25% fue previamente purificado por destilación y el formaldehído preparado por depolimerización de paraformaldehído en solución acuosa a 80° y con ligera alcalinización. A continuación, el tejido fue lavado 3 veces en tampón cacodilato y tratado con tetróxido de osmio al 1% en la misma solución tampón a temperatura ambiente durante 1-2 hs. Luego, el material fue deshidratado en soluciones acuosas de acetona de graduaciones crecientes (50%, 70% y 90%) durante 5 minutos en cada uno de ellas y el proceso fue completado con 3 pasajes, de 15 minutos cada uno, en acetona 100% destilada y deshidratada sobre tamiz molecular N° 3 (Merck). La inclusión de las células se realizó en una mezcla de resina epóxicas compuesta de: Araldita 506 (48.5%), Anhidrido dodecenilsuccínico (DDSA) (48.5%), Dibutilftalato (DBP) (0.5%), Acelerador

dimetilaminobenceno (BDMA) (2.5%).

Estudios ultraestructurales

El examen se llevó a cabo con microscopio electrónico de transmisión Zeiss. La randomización fotográfica no fue completa ya que fueron excluidas aquellas que presentaron artefacto de técnicas. La decisión de excluirlas fue tomada por dos observadores expertos. El área fotografiada fue magnificada a 10000 y 27800 X y magnificaciones mayores fueron utilizadas para detalles específicos. De la biopsia de 1 mm² se le realizaron los cortes y se eligieron 10 cortes seriados a los que se tomaron en promedio 2.5 micrografías por corte. Los cambios estructurales observados se analizaron con el programa axion-vision 4.6, referenciados a una escala de 1 µm, a través del ello se determino el área promedio ocupadas por las mitocondrias y diámetro promedios de las mitocondrias en los diferentes tejidos.

Aislamiento mitochondrial

La biopsia de músculo esquelético y cardiaco fueron lavados y suspendidos en un buffer a 4°C inmediatamente homogeneizado. Los homogenatos fueron centrifugados a 1500 g, 4°C por 20 min y el sobrenadante transferido a un nuevo tubo, se centrifugó nuevamente a 10000 g 4°C por 5 m. El pellet obtenido se lavó con el buffer y centrifugó a 10000 g 4°C por 10 m dos veces. El pellet rico en mitocondrias se resuspendió en buffer (relación tejido/buffer: 1/1) y las alícuotas se guardaron a -80°C. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford. Esta fracción sirvió para determinar:

Estudio de actividad funcional

Actividad de la cadena respiratoria a través del complejo III (ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa): las mitocondrias fueron suspendidas en 50 mM Tris-HCL de buffer, pH 7.4 que contenía 1mM EDTA, 250 mM sacarosa, 2mM KCN y 50 µM citocromo c oxidado. Después de la adición de 80µM de DB (DBH₂) reducido, se midió la reducción de citocromo c a 550 nm (ϵ 19.0 mM⁻¹ cm⁻¹).

Los resultados de la actividad enzimática se expresaron en µM de ubiquinona min⁻¹ mg prot.

Estudio de inmunohistoquímica

La expresión proteica de NOSi se analizó usando anticuerpos Ig G policlonal específicos contra el ex-tremo amino terminal de iNOS (Santa Cruz Biotechnology Company, Inc. Sc8310).

Los cortes se desparafinaron con xilol y rehidrataron en una serie sucesiva de alcoholes (100°, 96°, 70°, 50°) hasta llegar a PBS 1X pH 7,3. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 15 minutos.

Los sitios de unión inespecífica de las inmunoglobulinas fueron bloqueados por un preincubado de 15 minutos con 5% de SBF (GIBCO BRL, Grand Island, N. Y.) diluido en PBS, y se lavó 3 veces con PBS.

Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario, anti IgG de humano contra NOSi obtenido en conejo en una dilución 1:200 durante la noche a 4°C.

Luego de descartar el anticuerpo primario y secar alrededor del corte se colocó el anticuerpo secundario, anti-IgG Biotinilado en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS y se secó.

Se colocó la Peroxidasa conjugada con Estreptavidina por 20 minutos a temperatura ambiente, y luego de lavar y secar se incubó con la solución del sustrato de la Peroxidasa y el cromógeno, DAB (3,3'diaminobencidina) en Peróxido de Hidrógeno 0,3% H₂O₂ en Buffer Tris 0,05M pH 7,6 controlando en microscopio hasta obtener coloración, aproximadamente 1 minuto.

Análisis de la producción de Nitrotirosina

Se realizó en cortes de 5µm montados en vidrios con gelatina la inmunomarcación para la nitrotirosina como un índice de estrés oxidativo.

Los cortes se desparafinaron con xilol y rehidrataron en una serie sucesiva de alcoholes (100°, 96°, 70°, 50°) hasta llegar a PBS 1X pH 7,3. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó

con peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 15 minutos.

Los sitios de unión inespecífica de las inmunoglobulinas fueron bloqueados por un preincubado de 1 hora con 20% de SBF (GIBCO BRL, Grand Island, N. Y.) diluido en PBS.

Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal anti – nitrotirosina de conejo 1/100 (24 horas en cámara húmeda a 4 °C)

Luego de descartar el anticuerpo primario lavar con PBS, se secó alrededor del corte se colocó el anti-cuerpo secundario, multilinker, anti-IgG Biotinilado en PBS por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó tres veces con PBS y se secó.

Se colocó la Peroxidasa conjugada con Estreptavidina por 20 minutos a temperatura ambiente, y luego de lavar y secar se incubó con la solución del sustrato de la Peroxidasa y el cromógeno, DAB (3,3'diaminobencidina) con Peróxido de Hidrógeno 0,3 % H₂O₂ en Buffer Tris 0,05M pH 7,6 controlando en microscopio hasta obtener coloración, aproximadamente 1 minutos.

Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos utilizados fueron ANOVA y X², estableciéndose diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados

Morfología de las mitocondrias del músculo cardíaco

Se analizaron las diferencias encontradas en las mitocondrias aisladas de ventrículo izquierdo del grupo con ICC grado funcional de la NYHA III – IV y se compararon con las del grupo control.

Se observó un marcado polimorfismo ultraestructurales (figura 1) en el grupo con ICC siendo los aspectos como lisis y dilatación de crestas, aumento de matriz (edema) los hallazgos más representativos; también se observó una reducción del área total ocupadas por las mitocondrias del 78% en los pacientes con ICC vs control $160,37\mu\text{m}^2 \pm 9,87$; $936,81\mu\text{m}^2 \pm 78,48$ respectiva-

mente (figura 2) $p < 0.0001$. Alteraciones similares se observaron en el músculo esquelético (figura 1) con una reducción del área mitocondrial total en un 75% con respecto al control $90,86\mu\text{m}^2 \pm 6,87$; $550,62\mu\text{m}^2 \pm 56,48$ respectivamente $p < 0.0001$.

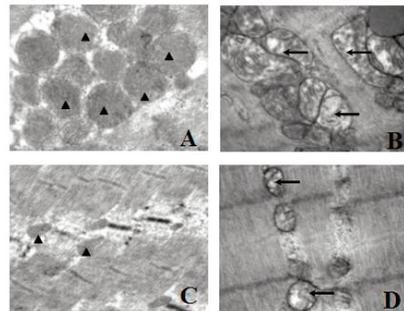


Figura 1
A mitocondrias (triángulos) de miocardio ventricular, de pacientes control. Imagen a x 27800.
B mitocondrias (flecha) de ventrículo obtenida de pacientes con ICC se observan dispersas con variabilidad acentuada en la forma y tamaño. Algunas presentan cambios severos tales como

Es de marcar que el área ocupada por las mitocondrias en el músculo cardíaco es notablemente mayor que el área ocupada por dicho organelo en músculo esquelético, respetando una relación 1,7:1 esta tendencia se mantiene tanto en el grupo control como en el grupo con ICC (figura 3) $p < 0.0001$.

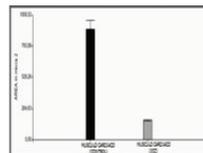


Figura 2. Área ocupadas por mitocondrias obtenidas de pacientes control (n 5) y con insuficiencia cardíaca (n 8), los datos consignados corresponde a la media ± ES.

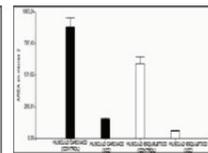


Figura 3 Área ocupadas por mitocondrias en músculo cardíaco y esquelético obtenidas de pacientes control (n 5) y con insuficiencia cardíaca (n 8), los datos consignados corresponde a la media ± ES.

Actividad enzimática del CIII

Se observó una reducción del 70% en la actividad del complejo III (figura 4) en pacientes con ICC grado funcional de la NYHA III – IV comparado con el control $1,9 \cdot 10^{-2} \text{ mM ubiq.mim-1.mg prot} \pm 12,6$; $5,79 \cdot 10^{-2} \text{ mM ubiq.mim-1.mg}$

prot±36,6, p<0,001.

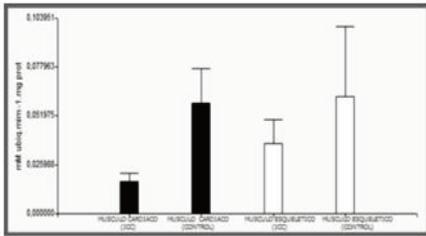


Figura 4. Actividad enzimática mitocondrial del complejo III, en músculo cardíaco y esquelético. Obtenido de pacientes control (n 3) y grupo con insuficiencia cardíaca (n 6), los datos consignados corresponde a la media±E.S.

Análisis Inmunohistoquímico

Con el objetivo de demostrar la producción de ROS se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos que demostraron a través de la lipoperoxidación y la presencia de la enzima oxidonitrosintasa inducible (iNOS) una marcación intensa de distribución difusa en más del 80% para nitrotirosina e iNOS en el músculo cardíaco del grupo con ICC en comparación con el grupo control (Tabla 1). La marcación para iNOS estuvo presente en membrana y citoplasma en cambio la nitrotirosina solo en citoplasma.

	GRUPO CON ICC (n5)				GRUPO CONTROL (n2)			
	MC		ME		MC		ME	
	iNOS	ONOO-	iNOS	ONOO-	iNOS	ONOO-	iNOS	ONOO-
INTENSIDAD	+++ (34.7%) ++ (56.7%) + (8.6%)	+++ (24.5%) ++ (50.5%) + (24.5%)	+++ (0%) ++ (61.1%) + (38.9%)	+++ (0%) ++ (58%) + (42%)	+++ (0%) ++ (30%) + (70%)	+++ (0%) ++ (27%) + (73%)	+++ (0%) ++ (25%) + (75%)	+++ (0%) ++ (20%) + (80%)
DISTRIBUCION	100% DIFUSO	100% DIFUSO	100% DIFUSO	100% DIFUSO	82% DIFUSO 18% FOCAL	100% DIFUSO	100% DIFUSO	
PATRON	CITOPL Y MEMB	CITOPL	CITOPL Y MEMB	CITOPL	CITOP Y MEMB	CITOPL Y MEMB	CITOPL	

+++ intenso, ++ moderado, + leve. CITOPL. (citoplasma) MEMB. (membrana)

Por otro lado en el músculo esquelético de estos mismos pacientes se observó una leve marcación difusa en todos los casos con una distribución similar a la observada en miocardio, no mostrando diferencia con el grupo control (figura 5).

Tabla 1. Estudio inmunohistoquímicos de oxidonitrosintasa inducible (iNOS) y nitrotirosina en músculo cardíaco (MC) y esquelético (ME) de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) y pacientes control

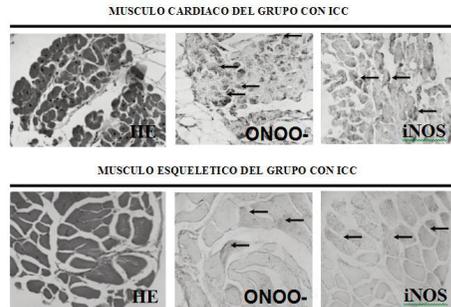


Figura 5. Análisis inmunohistoquímico que muestra mayor expresión de nitrotirosina (ONOO-) e iNOS músculo

Discusión

El corazón es un tejido altamente oxidativo y esencialmente dependiente de la energía que aportan las mitocondrias para contraerse y llevar a cabo otras actividades metabólicas, representan aproximadamente el 30% del volumen total de los cardiomiocitos y le proveen el 90% de la energía.

La producción de energía por parte de las mitocondrias dependen de factores genéticos del DNA mitocondrial¹²⁻¹³ que modulan el normal funcionamiento de la actividad enzimática de la organela y de factores ambientales que incluyen los aportes de azúcares, lípidos, proteínas y oxígeno¹⁴.

Cambios en la estructura y la función de las mitocondrias se han encontrado cada vez más asociados con las enfermedades cardiovasculares como hipertrofia y la miocardiopatía dilatada,^{8,9} muerte súbita, miocardiopatía isquémica, alcohólica y miocarditis.

En el presente trabajo se observaron que los pacientes portadores de ICC grado III-IV presentaron en musculo cardíaco una reducción del área ocupada por las mitocondrias del 78% con respecto al control (p<0.0001), también se observaron en dichos organoides degeneración

hidrópica, alteraciones en membrana externa y crestas mitocondriales sugieren un daño grave e irreversible de la mitocondria, imposibilitando a ésta a mantener un potencial de membrana mitocondrial efectivo debido a la pérdida del gradiente transmembrana. La disminución en la capacidad de generar energía se puede presuponer por una disminución en la superficie de la membrana interna (crestas) que es el sitio de anclaje de la cadena respiratoria. Estos sitios claves de lesión condicionaría una alteración en la homeostasis mitocondrial y celular, motivo por el cual se activaría las vías apoptóticas del miocardio que conducen directa o indirectamente al remodelado cardíaco ¹⁵.

Alteraciones estructurales similares se encontraron en el músculo esquelético de los pacientes con ICC como ser una disminución del área ocupada por las mitocondrias del 72% como respecto del control ($p < 0.0001$) patrón similar al observado por otros autores en el modelo experimental realizado en ratones ¹⁶. Este paralelismo permitiría inferir de manera relativamente sencilla el estado celular del corazón del paciente con ICC, mediante biopsia de cualquier músculo estriado ^{17,18}.

En nuestro trabajo se observó que el grupo con ICC, presentó una marcada caída en la actividad enzimática del CIII con respecto al control ($p < 0.0001$). Algunos estudios han demostrado que la cadena respiratoria mitocondrial es una fuente de ROS y que los complejos CI y CIII son los sitios fundamentales para la génesis de radicales libres ⁴. También esta alta tasa metabólica induce a la producción de ROS y de especies reactivas del nitrógeno RNS que en condiciones de normalidad se encuentran en un equilibrio homeostático.

Los ROS son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón de lábil unión en el orbital externo, lo que les da una configuración espacial que genera inestabilidad. Son extraordinariamente re-activos y de vida media corta. Estos ROS son elaborados continuamente como productos del metabolismo normal de las células y se inactivan por un conjunto de mecanismos

cuya función es equilibrar la producción de ROS y antioxidantes para minimizar y retardar la aparición de daños ²⁰.

Debido a la alta inestabilidad atómica de los ROS, pueden sustraer un átomo de H⁺ dejándolo oxidado y produciendo que determinadas moléculas pierdan su función específica en la célula. Cuando esto ocurre en las membranas lipídicas celulares, la oxidación de un ácido graso lo convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula. Este proceso es conocido como lipoperoxidación y permite cuantificar la concentración de los lípidos hidroperoxidados y por ende de ROS, a través de sus productos (ej. nitotorosina) ²¹.

Nuestro trabajo observamos que los miocardiocitos expresaron una marcación intensa del ONOO⁻ en el 80% de caso con ICC comparado con el control, situación que no se observó con el músculo esquelético.

La formación de los ONOO⁻ esta vinculada a la reacción del NO intramitocondrial con el oxígeno el cual estaría aumentado por el bloqueo del complejo IV ²²; dicho bloqueo se observa en proceso que tiende a aumentar desmesuradamente el NO. La síntesis del NO se debe a las enzimas NOS constitucionales e inducibles, estas últimas aumentan en procesos como enfermedad coronaria, diabetes, procesos crónicos. ^{23,24} La iNOS en fases iniciales de la ICC presenta función protectora, aunque si se da lugar a un exceso las consecuencias pueden ser fatales debido al bloqueo de la cadena respiratoria ²⁵.

Otro hallazgo observado en este trabajo fue que tejido miocárdico del grupo con ICC presentó una marcación intensa (80%) de la iNOS con respecto al control, no mostrando dicha diferencia en el músculo esquelético.

Entonces se observa una relación entre la mayor marcación de la iNOS y la expresión de nitrotirosina en los miocitos, sugiriendo que en este momento el efecto beneficioso del NO se torna peligroso, debido al aumento crónico de radicales libres ²⁶, deviniendo el fracaso energético mitocondrial y activando diferentes vías de muerte celulares dentro del miocardio ^{27,28}.

En el presente trabajo se observó una severa alteración estructural en las mitocondrias del músculo ven-tricular izquierdo en paciente que presentaban ICC grado III – IV con respecto al control, asociado a una reducción de la actividad del complejo III y una marcación aumentada de la iNOS y nitrotirosina, observaciones que muestran una clara relación fisiopatológica entre ellas y permiten entender en parte los procesos celulares y moleculares de la insuficiencia cardiaca.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo con subsidios de la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba y Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba.

Bibliografía

1. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001, 357:593.
2. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligan JJ. Nitric Oxide and cardiac function: ten years after, and continuing 2003, *Cir.* 93: 388.
3. J.M. McCord, Oxygen-Derived Free Radicals in Post-Ischemic Tissue Injury, *New Eng. J. Med.* 1985 312:159-163.
4. Tsutsi H. Oxidative stress in heart failure : the role of mitochondria. *Int. Med.* 2006, 40, 1177-1182.
5. Anilkumar N, Sirker A, Shah AM. Redox sensitive signaling pathways in cardiac remodeling, hypertrophy and failure *Front Biosci.* 2009 14:3168-87.
6. Garg, N. *M Front in Bioscience* 2005, 10:1341-1345.
7. Marín-García J, Goldenthal MJ, Ananthkrishnan R, Pierpont MF. *J Card Fail* 2000, 6: 321-329.
8. Rustin P, Lebidois J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaud JF et al. *J Pediatr* 1994, 124: 224-228.
9. Arbustini E, Diegoli M, Fasani R, Grasso M, Morbini P, et al. *Am J Pathol* 1998, 153: 1501-1510.
10. Schon EA, Bonilla E, DiMauro S. *J Bioenerg Biomembr* 1997, 29: 131-149.
11. Marin- Garcia J. *J Inherit Metab Dis* 1997, 20:

674-680.

12. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, DE Brujin et al. *Nature* 1981, 290: 457-465.
13. Shadel GS, Clayton DA. *Annu Rev Biochem* 1997, 66: 409-435.
14. Marin- Garcia J. *Rev Esp Cardiol* 2002, 55: 1293-1310.
15. Kumar S, Kain V, Sitasawad SL: *Cardiotoxicity of calmidazolium chloride is attributed to calcium aggravation, oxidative and nitrosative stress and apoptosis. Free Radic Biol Med.* 2009.
16. Garg N. *Mitochondrial disorders in chagasic cardiomyopathy. Front Biosci.* 2005, 10:1341-1354.
17. Marin-Garcia J, Pi Y, Goldenthal MJ. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006, 20: 477-49
18. Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. *Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. Circ Res* 2001;88:529-535.
19. Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M., Giuliano, G., Pich, M., Paolucci, U., Castelli, G.. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2002, 959, 199-213.
20. Halliwell B, Whiteman M: *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. Br J Pharmacol,* 2004, 142:231-55
21. Le Chen, Qizhi Gong, James P. and A.A. Knowlton: *Mitochondrial OPA1, Apoptosis and Heart Failure. Car-diovasc Res:* 2009, 181v1-181.
22. Kuzcaya N, Weissmann N, Harrison D G, Dikalov S. *Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols. J Biol. Chem.* 2003, 278: 22546.
23. Guillermo Zalba, Fortuño Ana, Díez Javier: *Oxidative stress and atherosclerosis in early chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant,* 2006, 21:2686-2690.
24. Liu Shang Xi, Hou Fan Fan, Guo Zhi Jian, Nagai Ryoji, Zhang Wei Ru, Liu Zhi Qiang, Zhou Zhan Mei, Zhou Mei, Di Xie , Wang Guo Bao, Zhang Xun: *Advanced Oxidation Protein Products Accelerate Atherosclerosis Through Promoting Oxidative Stress and Inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 2006, 26:1156-1162.

25. Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Boveris A. Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic* 2000, Res 33:747
26. Wen JJ, Bhatia V, Popov VL, Garg NJ. *Am J Pathol*. 2006, 169:1953-1964.
27. Long X, Goldenthal MJ, Wu GM, Marin-Garcia J. *Mol Cell Cardiol*. 2004, 37: 63-70.
28. Viatkina G, Vandanajay B, Arpad G, Papaconstantinou J. *Biochim Biophys* 2004, 689: 162-173;.