



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Papel de la mitofagia en la aparición y progreso de la patología cardíaca

Alberto Fernández Palomares

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2015-16

Treball tutelat per Ana María Proenza Arenas
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:
MITOFAGIA, DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL, DAÑO CARDÍACO

ABSTRACT

Autophagy is considered as a conserved process for recycling cell components. The macroautophagy is the type of autophagy best characterized. Cardiac mitochondria are responsible for generating energy in the form of ATP through oxidative phosphorylation and are crucial for cardiac function. Cardiomyocytes have quality control mechanisms in place to ensure a network of functional mitochondria. Damaged mitochondria are degraded by a process called mitophagy, where the organelle is engulfed by an autophagosome and subsequently delivered to a lysosome for degradation. Scientific evidence suggests that mitophagy is important for maintaining cellular homeostasis, and reduced mitophagy leads to inadequate removal of dysfunctional mitochondria. The aim of this study is to review the molecular mechanisms that regulate mitophagy in the heart and its implication in the cardiac physiopathology.

RESUMEN

La autofagia es considerada como un mecanismo conservado que permite el reciclaje de componentes celulares. La macroautofagia es el tipo de autofagia mejor caracterizada. Las mitocondrias del tejido cardíaco son responsables de generar energía en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa, siendo cruciales para la función cardíaca. Los cardiomiocitos tienen diversos mecanismos de control de calidad que permiten asegurar un correcto funcionamiento de las mitocondrias. Las mitocondrias que se encuentran dañadas son degradadas por un proceso denominado mitofagia, en el que la mitocondria es fagocitada un autofagosoma para ser procesada en el compartimento lisosomal. La evidencia científica sugiere que la mitofagia es bastante importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, con lo que alteraciones en dicho proceso conducen a una inadecuada eliminación de mitocondrias defectuosas. El eje central del actual trabajo es revisar los mecanismos moleculares que modulan la mitofagia en el tejido cardíaco, como asimismo su papel en la fisiopatología cardíaca.

ÍNDICE

1. OBJETIVO.....	5
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. LA AUTOFAGIA COMO MECANISMO DE RENOVACIÓN CELULAR.....	5
2.2. LA MITOFAGIA COMO MECANISMO DE CONTROL DE CALIDAD MITOCONDRIAL EN EL MIOCARDIO.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. LA MITOFAGIA MEDIADA POR PINK1 Y PARKIN.....	11
4.2. LA MITOFAGIA MEDIADA POR BNIP3 Y NIX.....	13
4.3. PAPEL DE LA MITOFAGIA EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA.....	14
4.4. PAPEL DE PARKIN Y PINK1 EN LA PATOLOGÍA CARDÍACA.....	16
4.5. MITOFAGIA Y RADICALES LIBRES.....	19
4.6. PAPEL DE LA MITOFAGIA EN LA CARDIOMIOPATÍA DIABÉTICA.....	21
5. CONCLUSIONES.....	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	25

ABREVIATURAS

AMPK (proteína quinasa activada por AMP); **BNIP3** (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3); **Drp1** (dynamin-related protein 1); **ERO** (especies reactivas del oxígeno); **GAPDH** (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); **LC3** (1A/1B-light chain 3); **MME** (membrana mitocondrial externa); **NIX** (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like); **PINK1** (PTEN-induced putative kinase 1).

1. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es la realización de una revisión bibliográfica del papel de la mitofagia en la fisiopatología cardíaca, utilizando como herramienta para este fin artículos científicos publicados hasta el momento en revistas científicas de merecido reconocimiento a nivel internacional recogidos en el *Science Citation Index*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA AUTOFAGIA COMO MECANISMO DE REVONACION CELULAR

La autofagia se define como la digestión de componentes celulares a través del aparato lisosomal, proceso bastante conservado desde el punto de vista evolutivo en todos los organismos eucariotas^{1,2}.

La autofagia funciona a niveles basales, conocida como autofagia basal, pero determinados estímulos lesivos, tales como una disminución de nutrientes, de factores de crecimiento o una acumulación de componentes dañados, pueden suponer un aumento importante en la activación del proceso¹. En estas condiciones, la autofagia pasa a denominarse autofagia inducida. Por tanto, la autofagia puede considerarse como un elemento esencial en la homeostasis celular que interviene en la degradación de componentes para su reciclaje o conseguir energía en situaciones de deficiencia energética o ausencia de determinados nutrientes, en la eliminación de proteínas mal plegadas que pueden comprometer la funcionalidad celular o en la renovación de orgánulos dañados^{2,3}.

Este proceso fue descrito por vez primera en levaduras gracias al descubrimiento de los genes relacionados con la autofagia, pero los mecanismos que gobiernan la autofagia en organismos eucariotas superiores no están completamente dilucidados³.

En organismos eucariotas, se han identificado hasta tres clases de autofagia: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Como se refleja en la figura 1, la microautofagia supone la fagocitosis directa de estructuras celulares por parte del lisosoma, mientras que en la macroautofagia, el material a degradar queda englobado en un compartimento delimitado por una doble membrana^{2,3}. La autofagia mediada por chaperonas implica la eliminación específica de proteínas en los

lisosomas, proceso mediado por un complejo translocador que mantiene a dichas proteínas en su estado desplegado para facilitar el proceso^{1,3}.

El mecanismo de la macroautofagia, el mejor estudiado de todos, se lleva a cabo en una serie de fases que tienen como objetivo secuestrar a los componentes del citoplasma en vesículas para su posterior eliminación lisosomal. La primera fase consiste en la formación de una pequeña doble membrana, denominada fagoforo².

Esta estructura tiene la capacidad de reconocer tanto moléculas como orgánulos dañados para su eliminación y puede originarse a partir de la membrana del retículo endoplasmático o aparato de Golgi. El fagoforo se somete a una elongación hasta que se origina un compartimento cerrado denominado autofagosoma. Cuando el autofagosoma se fusiona con la membrana de los lisosomas se genera una estructura compleja que recibe el nombre de autofagolisosoma. Así pues, todo el material contenido en el autofagosoma es procesado por las hidrolasas lisosomales^{4,5}.

Los estudios sobre autofagia se encuentran en pleno crecimiento, debido a su papel en enfermedades tan importantes como: procesos cancerosos, inflamatorios, inmunitarios, infecciosos o en el envejecimiento⁵.

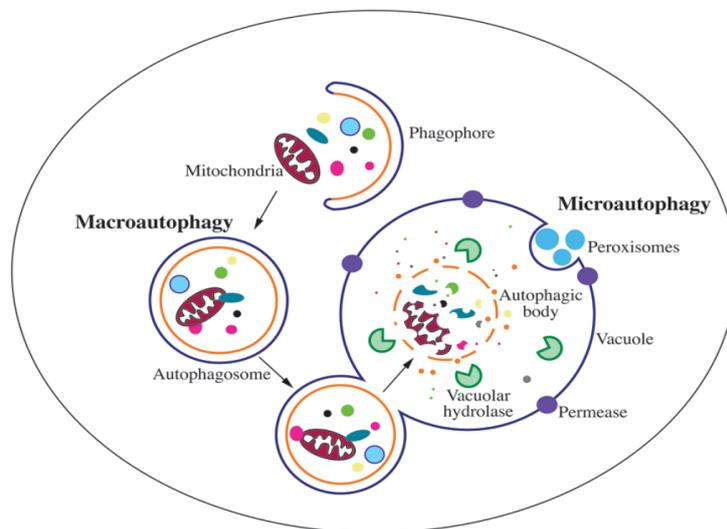


Figura 1. Representación general de los procesos de microautofagia y macroautofagia. En la microautofagia, los componentes seleccionados a degradar son directamente fagocitados por la membrana del lisosoma. Sin embargo, en la macroautofagia, los componentes a degradar son secuestrados en vesículas de doble membrana, formando el autofagosoma. La posterior fusión de los autofagosomas con los lisosomas supone la degradación de los componentes de su interior debido a la actividad de las hidrolasas lisosomales. Fuente: Feng Y et al., 2014.

Se han identificado varios tipos concretos de autofagia en función de las proteínas o componentes celulares a degradar⁵. La degradación selectiva de mitocondrias, habitualmente conocida como mitofagia, eje central del presente trabajo, tiene un papel transcendental en el bienestar celular, puesto que es la principal ruta degradativa en el recambio mitocondrial.

2.2. LA MITOFAGIA COMO MECANISMO DE CONTROL DE CALIDAD MITOCONDRIAL EN EL MIOCARDIO

Las mitocondrias son compartimentos celulares que intervienen en muchos procesos celulares, tales como la fosforilación oxidativa, metabolismo energético, síntesis de aminoácidos o de lípidos, en la homeostasis de ciertos iones o en la termogénesis⁶. Sin embargo, la función más importante es la de proporcionar energía a los sistemas celulares eucariotas a través de la fosforilación oxidativa. Debido al elevado consumo energético del cardiomiocito, existe una estrecha relación entre la función cardíaca y la mitocondrial^{6,7}. La evidencia señala que el metabolismo energético mitocondrial desempeña un papel crítico en diversas enfermedades cardíacas⁸. Es más, la mitocondria juega un papel clave tanto en la apoptosis como en la autofagia, de manera tal que la mitofagia forma parte de los mecanismos de control de calidad mitocondrial, fundamental en la eliminación de mitocondrias dañadas antes de poner en marcha el programa de muerte celular⁹. La renovación mitocondrial es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis celular, observándose en el tejido cardíaco, nervioso, hepático o renal que cada mitocondria es sustituida por una de nueva cada 3 o 4 semanas¹⁰. Cuando todos aquellos procesos asociados en la calidad mitocondrial no funcionan de manera adecuada se origina una situación de disfunción mitocondrial, la cual se encuentra ligada al desarrollo de enfermedades del corazón, miopatías, trastornos musculares, obesidad, diabetes, procesos cancerosos e, incluso, en el envejecimiento^{10,11}. Por este motivo, los cardiomiocitos han desarrollado numerosos mecanismos de control de calidad para asegurar una homeostasis mitocondrial, evitando el daño celular generalizado¹². Como se puede apreciar en la figura 2, los mecanismos de control implicados en la calidad mitocondrial son bastante numerosos,

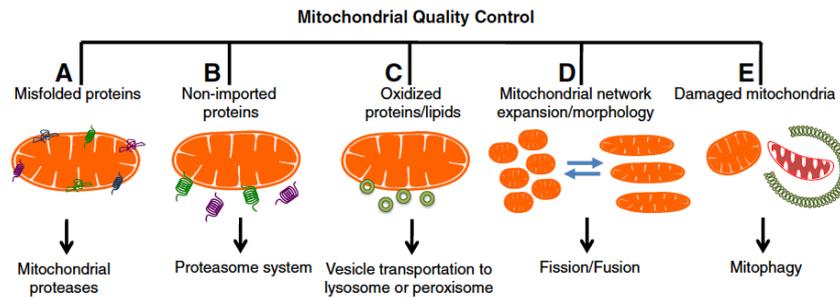


Figura 2. Mecanismos de control de calidad mitocondrial. Los mecanismos responsables de mantener la homeostasis mitocondrial engloban a proteasas mitocondriales, sistemas proteolíticos, transporte de vesículas derivadas de las mitocondrias, eventos de fusión-fisión y mitofagia. Fuente: Palikaras K et al., 2014.

aunque de manera particular los que presentan transcendencia en el miocardio son la mitofagia, seguido de los eventos de fusión-fisión. Primero de todo, cabe destacar que las mitocondrias tienen su propio sistema proteolítico que es responsable de la degradación de proteínas desplegadas o disfuncionales⁸. En levaduras o en eucariotas superiores, las proteasas dependientes de ATP actúan como sensoras del estado de plegamiento de sus sustratos, mediando la posterior degradación de todas aquellas proteínas que no se encuentren en su estado nativo. Aparte de la degradación proteolítica de las proteínas mitocondriales, un reciente estudio ha demostrado una ruta concreta en la que determinadas vesículas originadas en la mitocondria tienen la capacidad de secuestrar componentes que se encuentran modificados (o alterados) para su consiguiente procesamiento lisosomal⁹. Esta ruta trabaja bajo condiciones normales pero se encuentra más activa en situaciones de estrés oxidativo. La dinámica mitocondrial, que comprende los procesos de fusión-fisión, ejerce un papel más que relevante en la mitofagia. Parece ser que la *dynamin-related protein 1* (Drp1) es responsable, junto a otras proteínas, de fragmentar previamente a la mitocondria para su adecuada incorporación en el fagoforo^{10,11}. Al mismo tiempo, las proteínas de la membrana mitocondrial externa (MME) que promueven la fusión son marcadas con residuos de ubiquitina para su posterior degradación por el proteasoma del citoplasma¹⁰. Se han encontrado dos rutas de mitofagia en el miocardio: una mediada por *PTEN-induced putative kinase 1* (PINK1) y Parkin, y otra modulada por *BCL2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3) y *BCL2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 3-like* (NIX). La vía mejor estudiada y caracterizada es en la que intervienen las proteínas PINK1 y Parkin^{11,12}.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada para la realización del presente trabajo se basa en la utilización de artículos científicos seleccionados mediante bases de datos bibliográficas. Ante todo, se ha utilizado un conjunto de páginas web con el objetivo de tener una visión generalizadora tanto del proceso de mitofagia como de sus implicaciones en la patología cardíaca. Tras haber conseguido este objetivo, se ha procedido a realizar una búsqueda en la base de datos científica *PubMed* hasta el mes de mayo de 2016. Para ello, se ha empleado la herramienta de *Advanced Search*, en donde las palabras claves fueron "*Autophagy*" o "*Mitophagy AND heart*". Cabe destacar que adicionalmente se ha añadido, junto al nombre general de mitofagia, el proceso patológico a estudiar o el nombre de algunas proteínas clave, tal como se puede observar en la tabla 1.

En cuanto a la búsqueda de la bibliografía o selección de estudios en *PubMed*, se encuentra totalmente limitada a la lengua inglesa. De todo el conglomerado de estudios, se eliminaron todos aquellos que no presentaban como tema principal el proceso de mitofagia. La selección, por tanto, se ha llevado a cabo en base a la lectura del *abstract* de los diferentes artículos o revisiones.

Como se puede observar en el gráfico 1, el término de mitofagia comienza a aparecer alrededor del año 1974 en la base de datos *PubMed*. A partir de aquí, comienza a despertar el interés de este proceso por parte de la comunidad científica, aumentando de manera considerable los artículos en los cuales se habla de este proceso. En dicho gráfico se puede observar la evolución de la publicación de artículos con el paso del tiempo, desde 1974 hasta la actualidad.

Abajo, se ha incorporado una serie de gráficos en los que se pueden observar las distintas búsquedas por palabras clave en *PubMed* (solamente de mitofagia o aspectos relacionados con ella), expresadas en porcentajes (gráfico 2).

La herramienta utilizada para las referencias bibliográficas utilizadas en este trabajo ha sido la plataforma *Mendeley*.

BÚSQUEDA	PALABRAS CLAVE	FILTRO	RESULTADOS
1	<i>Autophagy</i>	Publication dates (5 years)	3182
2	<i>(Mitophagy) AND heart</i>	Publication dates (5 years)	241
3	<i>(Mitophagy) AND PINK1</i>	Publication dates (5 years)	292
4	<i>(Mitophagy) AND Parkin</i>	Publication dates (5 years)	445
5	<i>(Mitophagy) AND heart failure</i>	Publication dates (5 years)	62
6	<i>(Mitophagy) AND ROS</i>	Publication dates (5 years)	377
7	<i>(Mitophagy) AND diabetic heart</i>	Publication dates (5 years)	13

Tabla 1. Estrategia de búsqueda bibliográfica. Cabe destacar que a la hora de buscar estudios relacionados con la autofagia, solamente se ha tenido en cuenta revisiones para intentar disminuir la cantidad de estudios (de 16897 a 3182).

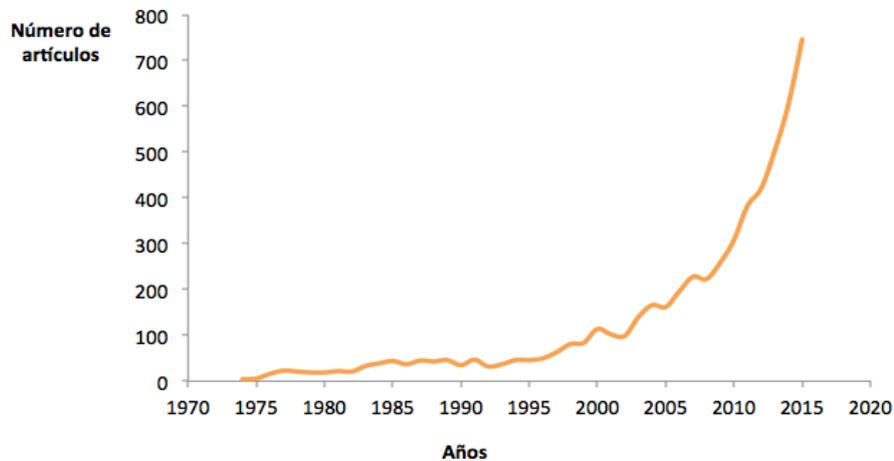


Gráfico 1. Evolución del número de artículos de la mitofagia a lo largo de los años.

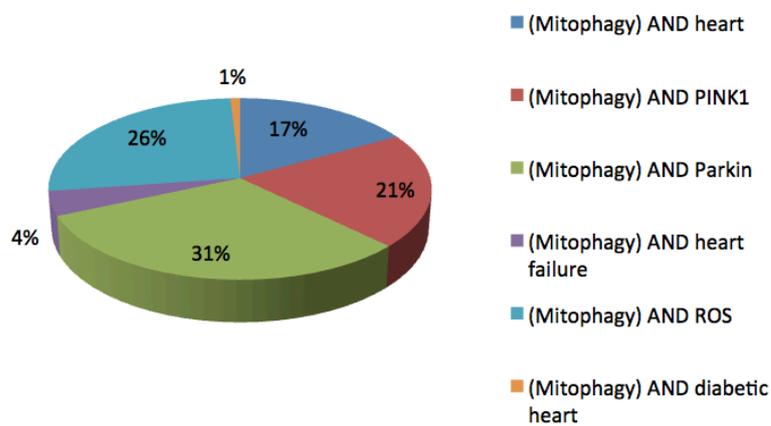


Gráfico 2. Búsquedas por palabras clave en porcentajes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. LA MITOFAGIA MEDIADA POR PINK1 Y PARKIN

PINK1 es una proteína que contiene una secuencia de localización mitocondrial, un segmento transmembrana y un dominio con actividad Ser/Thr quinasa^{8,9,10}. Cuando la mitocondria es funcional, PINK1 inmediatamente es translocada a la mitocondria y procesada por proteasas mitocondriales (figura 3), concretamente por *presenilins-associated rhomboid like protein*, situada en la membrana mitocondrial interna y *mitochondrial processing peptidase*, localizada en la matriz^{13,15}. La *mitochondrial processing peptidase* tiene la misión de eliminar la secuencia de localización mitocondrial de PINK1, mientras que *presenilins-associated rhomboid like protein* está más relacionada con su degradación proteolítica. De esta manera, la fragmentación de esta proteína en condiciones normales determina que sus niveles sean indetectables en la mitocondria. Sin embargo, cuando el potencial de membrana se encuentra disminuido ante una disfunción mitocondrial, PINK1 escapa de su degradación, de tal manera que queda estabilizada en la MME junto a otras proteínas, tales como la *translocase of outer mitochondrial membrane 7* o *siha E3 ubiquitin protein ligase family member 3*^{9,10,11}. Una vez translocada, PINK1 se homodimeriza y autofosforila en residuos de Ser228 y Ser402 para convertirse en su forma activa, paso crítico para su papel en la mitofagia¹⁰.

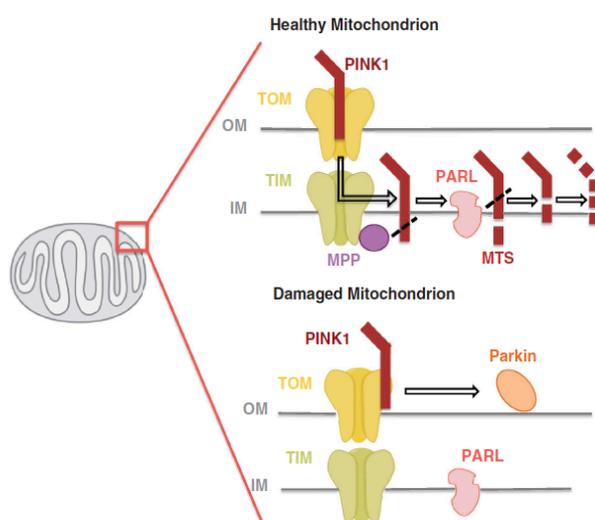


Figura 3. Papel de PINK1 en mitocondrias funcionales y disfuncionales. En mitocondrias funcionales, PINK1 es rápidamente procesada por las peptidasas mitocondriales, mientras que en mitocondrias disfuncionales, con un potencial de membrana alterado, se estabiliza en la MME para iniciar la mitofagia. Fuente: Ashrafi G et al., 2013.

Por otra parte, Parkin es una proteína con actividad ubiquitina ligasa de tipo E3 de localización citoplasmática bajo condiciones normales. Cuando se genera una alteración en el potencial de membrana mitocondrial, reflejado en la figura 4, Parkin se transloca hacia la mitocondria, donde tiene la misión de ubiquitinar a proteínas residentes en la MME y, por tanto, marcarlas para su degradación por el proteosoma^{9,10,13}. Se han identificado varios sustratos de Parkin, entre los que se incluyen: *voltage-dependent anion channel 1*, mitofusinas, *mammalian mitochondrial Rho 1* o varias translocasas de la membrana mitocondrial. La presencia de residuos de ubiquitina en determinadas proteínas residentes de la MME permite que la proteína p62 interacciona tanto con proteínas marcadas con residuos de ubiquitina y con el *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)* que reside en la membrana del fagoforo. Así pues, se pone de manifiesto la actividad adaptadora de esta proteína a la hora de posibilitar el reclutamiento de la mitocondria por parte del fagoforo^{12,14}. Otra proteína de la membrana del fagoforo que recientemente se ha propuesto como posible mediadora del proceso es la optineurina⁸. Una vez contenida en el interior del autofagosoma, la mitocondria se transporta a los lisosomas para su degradación^{9,10,11}.

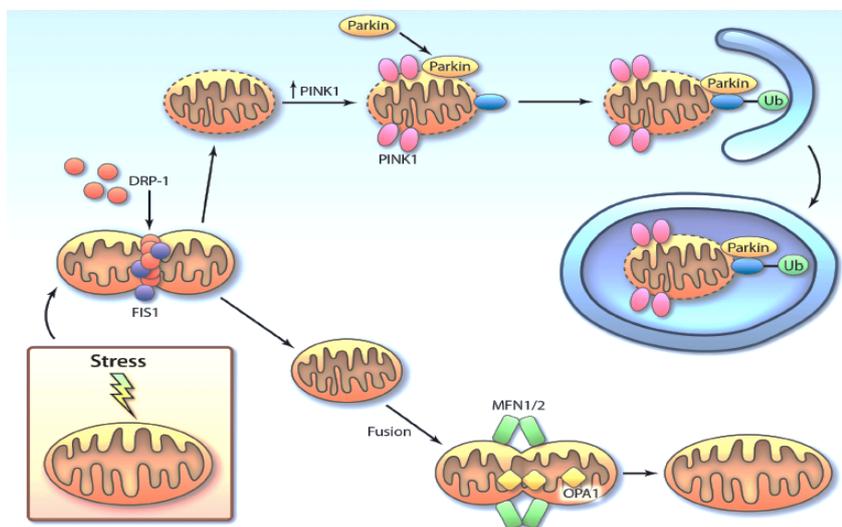


Figura 4. Mecanismo de la mitofagia mediado por PINK1 y Parkin. En una situación de daño mitocondrial, Drp1 media la fisión antes de iniciar la mitofagia. La disminución en el potencial de membrana es el desencadenante para la acumulación de PINK1 en la MME y el consiguiente reclutamiento de Parkin. Parkin provoca la adición de residuos de ubiquitina a determinadas proteínas, acontecimiento que marca a la mitocondria para su degradación por el autofagosoma. En condiciones normales, las mitocondrias se fusionan unas con otras, proceso modulado por las mitofusinas y la *optic atrophy protein 1*. Fuente: Kubli D et al., 2012.

Parkin presenta un dominio *N-terminal ubiquitin-like* que tiene la capacidad de inhibir su actividad ubiquitina ligasa. En su forma activa, PINK1 fosforila la posición Ser65 de dicho dominio, lo que es considerado como un evento crucial para su activación y, como consecuencia, para intervenir en la mitofagia. Dicha modificación estructural solamente tiene lugar cuando la funcionalidad de la mitocondria se ve comprometida^{10,12}.

4.2. LA MITOFAGIA MEDIADA POR BNIP3 Y NIX

La segunda vía mejor caracterizada para describir el panorama de la mitofagia es aquella en la que intervienen proteínas como BNIP3 o NIX. Ambas dos son proteínas que presentan un dominio BH3 y que se encuentran localizadas ambas dos en la MME. Estas proteínas, junto a *Fun14 domain containing 1* o el fosfolípido de membrana cardiolipina, son responsables de iniciar la otra vía alternativa de la mitofagia a través de un mecanismo molecular más sencillo¹³. Como se puede apreciar en la figura 5, dichos componentes mitocondriales tienen la capacidad de interactuar directamente con la proteína LC3, situada en la membrana del fagoforo. Este contacto que se establece entre mitocondria dañada y fagoforo queda posibilitado gracias a que las proteínas anteriores presentan un dominio de unión a LC3 descubierto en el citoplasma^{16,17,19}.

La cardiolipina es un fosfolípido que se sintetiza en la membrana mitocondrial interna y que se transloca a la MME cuando se genera una disminución en el potencial de membrana mitocondrial. Una vez situada en la MME, interactúa con la proteína LC3 del fagoforo, favoreciendo el inicio de la mitofagia¹⁴. Se ha demostrado que la cardiolipina interviene tanto en la regulación de la mitofagia como de la muerte celular programada en función de su estado de peroxidación^{15,17,18}.

De esta manera, cuando se encuentra peroxidada pone en marcha la vía apoptótica, mientras que si no lo está, participa en la mitofagia para evitar la muerte celular. Por otro lado, parece probable que *Fun14 domain containing 1* interactúe, aparte que con LC3, con el *γ-aminobutyric acid receptor-associated protein* de la membrana del fagoforo, pues presenta un dominio adicional de unión a dicha proteína^{14,15,20}.

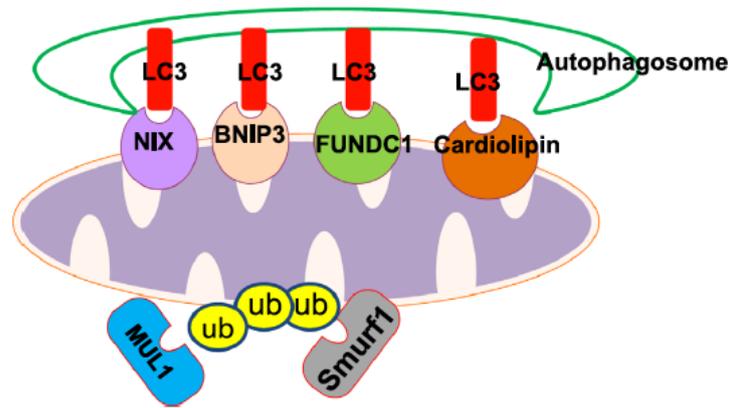


Figura 5. Mecanismo de la mitofagia mediado por BNIP3 y NIX. La vía alternativa de la mitofagia consiste en el contacto directo de la mitocondria con el fagoforo para su eliminación en los lisosomas. En la parte inferior de la figura aparecen proteínas con actividad ubiquitina ligasa de tipo E3, las cuales pueden ubiquitinar proteínas mitocondriales para inducir la mitofagia modulada por p62 (comentada anteriormente). Fuente: Ni H et al., 2015.

4.3. PAPEL DE LA MITOFAGIA EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

Como se ha mencionado anteriormente, los cardiomiocitos presentan diversos sistemas de control de calidad para asegurar un correcto funcionamiento mitocondrial. Desafortunadamente, dichos mecanismos se reducen durante el envejecimiento, lo que conduce a una inadecuada eliminación de las mitocondrias disfuncionales²¹. Esta condición es suficiente para causar una determinada cardiomiopatía que, si no se consigue aliviar, se traduce en una insuficiencia cardíaca. Determinadas mutaciones en los genes que codifican para PINK1 o Parkin ponen de manifiesto que tienen consecuencias negativas para el tejido cardíaco^{21,22}. Por ejemplo, la ausencia de PINK1 en ratones conduce a una disfunción mitocondrial cardíaca y a un aumento del estrés oxidativo. Dichos ratones acaban desarrollando hipertrofia cardíaca a la edad de 2 meses, una insuficiencia cardíaca y aumentan su mortalidad tras un infarto de miocardio²². Por otro lado, la ausencia de Parkin provoca un fenotipo totalmente diferente: los ratones tienen una función cardíaca normal cuando son jóvenes, pero acumulan mitocondrias defectuosas con la edad²¹. En un reciente estudio se ha demostrado que los ratones sometidos a un tratamiento con Doxorubicina muestran cardiotoxicidad. Este acontecimiento puede ser debido a que p53 se une y secuestra a Parkin en el citosol, lo que previene su translocación a la mitocondria²³.

Como resultado, se produce una alteración en la eliminación de mitocondrias dañadas y el consecuente desarrollo de disfunción cardíaca²⁴. Otros estudios han evidenciado que la ausencia de NIX provoca, entre otros efectos, una hipertrofia cardíaca y una disminución de la función cardíaca con la edad^{23,24}. En cuanto a las mitofusinas se refiere, sus deficiencias provocan un descenso de la mitofagia mediada por PINK1-Parkin, hipertrofia, una bajada en la contractilidad e insuficiencia cardíaca a las 30 semanas²⁴. Estas investigaciones en su conjunto demuestran que el mantenimiento mitocondrial a través de estos efectores es crucial para la homeostasis cardíaca y que la desregulación de la mitofagia conduce a la acumulación de mitocondrias defectuosas, pérdida de cardiomiocitos y disfunción contráctil^{23,24}.

Como se ha señalado anteriormente, la fisión mitocondrial es un proceso necesario para poder iniciar la mitofagia. En este sentido, numerosas investigaciones se han centrado en dilucidar el papel de ciertas proteínas que intervienen en el proceso, alteraciones de las cuales pueden comprometer al inicio de la mitofagia. A lo largo de estos años, la proteína Drp1 se muestra como una candidata sustancial en el proceso previo a la mitofagia, puesto que mutaciones concretas en el gen que codifica para dicha proteína pueden comportar alteraciones en el tejido cardíaco^{25,26}. Esta proteína es una pequeña GTPasa que es altamente codificada en el tejido cardíaco o cerebral. Se ha demostrado que es esencial para la funcionalidad cardíaca en condiciones normales, como también en respuesta a diversos estímulos lesivos²⁸. Así pues, la disminución en los niveles de Drp1 en ratones neonatos provoca una cardiomiopatía dilatada, que a su vez acaba con la muerte del animal^{28,29}.

En adultos, la disminución en sus niveles provoca una inhibición de la mitofagia, lo que origina una disfunción mitocondrial con la consecuente muerte celular del tejido cardíaco²⁸. Otros estudios apuntan que mutaciones puntuales en el gen que codifica para dicha proteína provocan, dependiendo del cambio, nuevamente cardiomiopatía dilatada, acompañada de una morfología mitocondrial anormal y una mitofagia defectuosa, o defectos en la fisión mitocondrial, con persistentes niveles elevados de lactato en el plasma²⁹.

Todo este conjunto de datos ponen de manifiesta la importancia que tiene regular de manera estricta el proceso de mitofagia. En el caso del deterioro de la función cardíaca, al disminuir la actividad de ciertas proteínas reguladoras del proceso, se produce un

descenso generalizado de la mitofagia. Una reducción en la mitofagia causa la acumulación de mitocondrias disfuncionales, las cuales generarían radicales libres en elevadas cantidades, como también liberarían proteínas de muerte celular, disparando la muerte de los cardiomiocitos^{26,28,29}.

4.4. PAPEL DE PARKIN Y PINK1 EN LA PATOLOGÍA CARDÍACA

Aunque hace diez años se identificara a Parkin como una proteína altamente codificada en el tejido cardíaco, todavía queda camino a recorrer para entender su *modus operandi* en dicho tejido³⁰. Parece que dicha proteína no es fundamental para

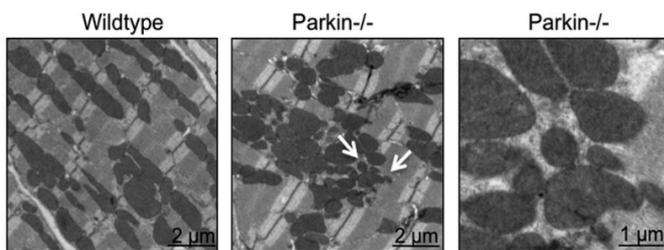


Figura 6. Comparación de mitocondrias de ratones con fenotipo mutado y normal a través de microscopía electrónica de transmisión. Se puede observar que el fenotipo mutado muestra mitocondrias más pequeñas y desorganizadas, en comparación con el fenotipo normal.

Fuente: Gottlieb et al., 2011.

el recambio natural que sufren las mitocondrias mediante autofagia en el tejido cardíaco³⁰. Aunque la deficiencia en la proteína resulte en mitocondrias mucho más pequeñas o desorganizadas, como se observa en la figura 6, no afecta a la funcionalidad mitocondrial propiamente dicha²⁸. Estudios

recientes han demostrado que ratones deficientes en dicha proteína presentan una mejoría más lenta tras sufrir un infarto de miocardio, pero también muestran una mitofagia alterada con la consiguiente acumulación de mitocondrias disfuncionales tras ser infartados^{31,32}. Estos datos sugieren que esta proteína juega un papel crítico en la adaptación del miocardio frente al estrés, potenciando la mitofagia. Estudios recientes han demostrado que ratones deficientes en dicha proteína presentan una mejoría más lenta tras sufrir un infarto de miocardio, pero también muestran una mitofagia alterada con la consiguiente acumulación de mitocondrias disfuncionales tras ser infartados, como se observa en la figura 7. Estos datos sugieren que esta proteína juega un papel crítico en la adaptación del miocardio frente al estrés, potenciando la mitofagia³⁴. La eliminación de mitocondrias a través de la autofagia es considerado como un proceso vital para el mantenimiento de mitocondrias funcionales en los sistemas celulares.

El decrecimiento de la autofagia conduce a la acumulación de mitocondrias disfuncionales, circunstancia asociada al envejecimiento o al desarrollo de una insuficiencia cardíaca³⁵. Por ejemplo, el detenimiento de la autofagia en el tejido cardíaco debido a la delección de *autophagy-related protein 5* conduce a un aumento en la población de mitocondrias disfuncionales con la consiguiente disfunción cardíaca. De manera similar, la delección de *autophagy-related protein 7* en el músculo esquelético resulta en la acumulación de

mitocondrias alteradas junto a un incremento en los niveles de radicales libres³⁶. Estas investigaciones sugieren que las mitocondrias, tanto en el músculo cardíaco como en el esquelético, son frecuentemente eliminadas mediante autofagia, con lo que alteraciones en dicho proceso conllevan a la acumulación de mitocondrias defectuosas. Parkin se ha identificado como un importante regulador de la autofagia mitocondrial, pero numerosos estudios apuntan a que no es crucial para la renovación mitocondrial bajo condiciones normales^{36,37}. Debido a que la supervivencia celular depende de la capacidad de eliminar mitocondrias disfuncionales, parece probable que diversas proteínas o vías de señalización pueden promover la activación de dicha vía³⁷.

Por ende, dicha proteína parece que juega un papel importante en la adaptación al estrés. En un estudio se ha encontrado deterioro mitocondrial generalizado tras un infarto de miocardio en ratones deficientes en dicha proteína, pero en cardiomiocitos normales se detectaron solamente unas pocas mitocondrias disfuncionales³⁸. Este acontecimiento pone de manifiesto que Parkin estaría implicada en el mantenimiento de la función mitocondrial en respuesta a agentes estresores. Recientes estudios han demostrado que la mitofagia mediada por dicha proteína tiene un papel más que relevante en el preconditionamiento isquémico. Este fenómeno no es más que una estrategia que intenta reducir el daño producido por un período de isquemia. Habitualmente, en el preconditionamiento la protección se logra haciendo períodos de isquemia y posterior reperusión antes de la isquemia que genera el daño. Así el tejido es condicionado para tolerar mejor una isquemia sostenida^{37,38}. Estos estudios

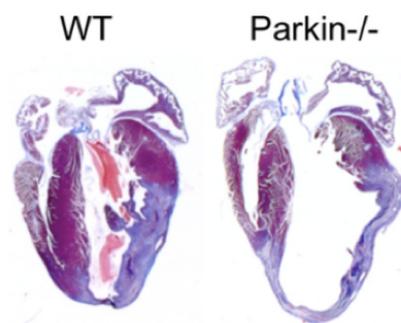


Figura 7. Comparación entre el tejido cardíaco de un fenotipo mutado y salvaje 7 días después de un infarto de miocardio.

Fuente: Kubli et al., 2012.

mostraron que este mecanismo inducía la translocación de dicha proteína a la mitocondria y que los ratones deficientes mostraban resistencia a la cardioprotección. Parkin es el candidato más elemental para añadir residuos de ubiquitina a determinadas proteínas de la mitocondria dañada en cuestión, tras su previa translocación^{34,35}. La proteína p62 parece ser que es la primera en interaccionar con otras proteínas ubiquitinizadas para, posteriormente, permitir la formación del autofagosoma alrededor de la mitocondria a degradar. Así pues, se ha demostrado un aumento de proteínas mitocondriales ubiquitinizadas alrededor de la zona de infarto en ratones salvajes³⁵. Sin embargo, en ratones deficientes en Parkin, se ha detectado una reducción en el número de proteínas ubiquitinizadas, con lo que el mecanismo de formación del autofagosoma también se encuentra reducido³⁹. Tal como se ha comentado anteriormente, PINK1 es considerada una proteína esencial para permitir la activación de Parkin. Diversos estudios han demostrado que ante una alteración del potencial de membrana mitocondrial, PINK1 se acumula en la MME, lugar donde promueve el reclutamiento de Parkin. Curiosamente, ratones deficientes en una proteína u otra presentan diferentes fenotipos^{34,35,36}. Así, por ejemplo, como se ha comentado en el apartado de insuficiencia cardíaca, ratones deficientes en PINK1 presentan un aumento en la formación de radicales libres con su consiguiente disfunción mitocondrial en el miocardio. Dichos ratones acaban desarrollando disfunción e hipertrofia cardíaca a los 2 meses de edad^{34,36}. Por tanto, se podría atribuir a PINK1 como una proteína cardioprotectora en el tejido cardíaco, puesto que se encuentra asociada a la protección frente al daño originado por isquemia-reperfusión^{38,39}. Sus mutaciones provocan un aumento en la susceptibilidad del corazón a sufrir daño tras un período de isquemia-reperfusión porque empeora la funcionalidad de las mitocondrias. Su ausencia está relacionada con la despolarización de la membrana mitocondrial, alteraciones en la respiración mitocondrial o con el aumento de la producción de radicales libres, como se puede comprobar en la figura 8. Dicha proteína estaría implicada en promover la fosforilación de determinadas chaperonas mitocondriales que protegen frente a la muerte celular inducida por aumento de radicales libres o, como es sabido, en facilitar el acercamiento de

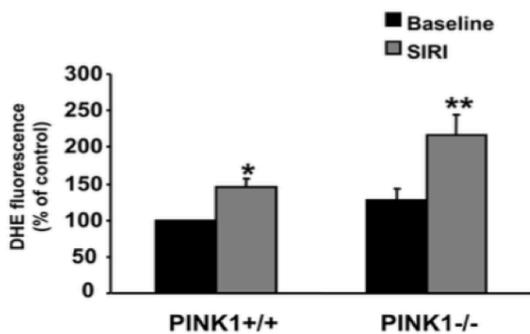


Figura 8. Comparación entre producción de radicales libres de un fenotipo mutado y salvaje. Los cardiomiocitos mutados presentan niveles similares de radicales libres en condiciones normales, pero reflejan un aumento en el daño por isquemia-reperfusión, respecto al fenotipo normal. Se ha utilizado dihidroetidio como marcador de estrés oxidativo. Fuente: Siddall et al., 2013.

determinadas proteínas hacia la mitocondria para iniciar la mitofagia⁴². Esto demuestra que, en condiciones normales, las mutaciones en PINK1 son más nocivas que mutaciones en Parkin, puesto que, en ausencia de estrés, ratones que son deficientes en Parkin muestran mitocondrias normales con una función cardíaca adecuada. Así pues, aunque PINK1 y Parkin trabajan conjuntamente en una misma vía común, parece posible que tengan funciones distintas en el miocardio⁴⁰. PINK1 parece importante en el mantenimiento de las funciones mitocondriales en el corazón bajo

condiciones normales, mientras que Parkin juega un papel decisivo en la adaptación del estrés promoviendo la mitofagia, evento que resulta beneficioso para conferir resistencia a la muerte celular^{39,41}. Sin embargo, tal como se ha descrito en distintos estudios, una activación prolongada de la mitofagia puede ser perjudicial porque puede llegar a producirse la muerte de los cardiomiocitos⁴².

4.5. MITOFAGIA Y RADICALES LIBRES

Las lesiones celulares provocadas por radicales libres son un importante mecanismo que se encuentran en numerosos procesos, sobretodo las lesiones debidas a compuestos químicos, al envejecimiento celular o por isquemia-reperfusión (cuando se recupera el flujo de sangre en un tejido tras una isquemia)⁴³. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) se generan en condiciones normales en las células durante la respiración mitocondrial, pero son eliminadas por los sistemas de defensa celulares. De esta forma, las células consiguen mantener un equilibrio en el que pueden existir radicales libres de forma provisional en concentraciones bajas, sin provocar lesiones⁴⁴. Pero cuando la fabricación de ERO aumenta o los sistemas de limpieza son ineficaces, se produce un aumento notable de estos radicales libres y se produce una situación que se conoce como estrés oxidativo^{43,44}. El estrés oxidativo se ha asociado a un

amplio abanico de procesos lesivos, entre los que se encuadran muchas enfermedades cardiovasculares. Estudios recientes han evidenciado el papel que podría tener el gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) en la micromitofagia⁴⁴. En este tipo concreto de mitofagia, las mitocondrias dañadas son degradadas por los lisosomas sin necesidad de la participación de proteínas receptoras. En respuesta a un aumento importante de ERO, GAPDH es bastante sensible a sufrir una modificación en su estructura, concretamente una oxidación en el residuo C152, situado en su centro activo, que resulta en la inactivación de la enzima^{45,46}.

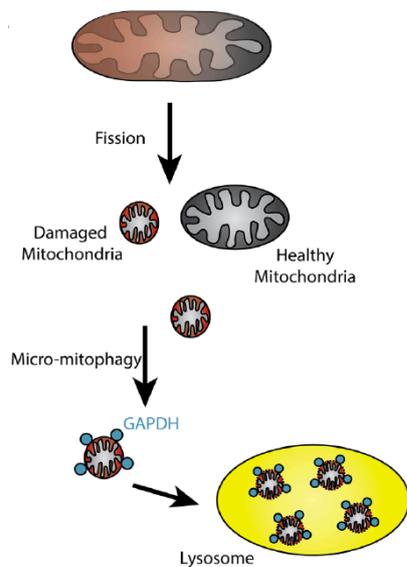


Figura 9. Activación de la micromitofagia mediada por GAPDH.

Fuente: Kornfeld et al., 2015.

Cuando el GAPDH se encuentra inactivo, adquiere un papel bastante atractivo en cuanto a mitofagia se refiere. Esta nueva conformación alterada de la enzima tiene la capacidad de actuar como un sensor para detectar mitocondrias dañadas. La unión de la enzima con la mitocondria promovería la eliminación de dicha mitocondria en los lisosomas, tal como se observa en la figura 9. Cabe destacar que el mecanismo por el que dicha enzima interacciona con la mitocondria se desconoce, aunque es bastante probable que se deba a sus propiedades fusogénicas⁴⁵. Por tanto, la eliminación de mitocondrias dañadas o

productoras de gran cantidad de ERO modulando a GAPDH puede constituir un punto clave en cuanto a protección celular se refiere, minimizando de esta manera los daños causados por radicales libres en las enfermedades cardiovasculares^{45,46}.

El aumento de radicales libres puede conllevar al mismo tiempo un incremento en la actividad de la isoforma delta de la proteína quinasa C. Tras un período de isquemia, justo en el comienzo de la reperfusión, el aumento de radicales libres favorece la translocación de esta isoforma al interior de la mitocondria, que a su vez potencia la generación de más radicales libres, lo que conlleva a una situación de disfunción mitocondrial con el consecuente aumento del estrés oxidativo^{44,46}. Asimismo, se ha demostrado en modelos de isquemia-reperfusión de ratones que esta isoforma tiene la capacidad de inducir una fosforilación en GAPDH. Este cambio tiene como

consecuencia un aumento del daño cardíaco, puesto que se bloquearía la entrada de la mitocondria defectuosa en la micromitofagia^{46,47}. Si se tratara de interrumpir la interacción que se establece entre la isoforma-enzima, se podría reducir el daño cardíaco causado por el bloqueo de la micromitofagia, inicialmente promovido por el aumento en los radicales libres^{46,47,48}.

4.6. PAPEL DE LA MITOFAGIA EN LA CARDIOMIOPATÍA DIABÉTICA

La diabetes es un factor de riesgo para el desarrollo de varias complicaciones cardiovasculares, todas ellas relacionadas en constituir las principales causas de muerte en pacientes con diabetes⁴⁹. La susceptibilidad de los pacientes diabéticos a sufrir daño cardíaco puede estar asociado a numerosos factores de riesgo, tales como la obesidad, hipercolesterolemia, aterosclerosis o hipertensión⁵⁰. Sin embargo, la

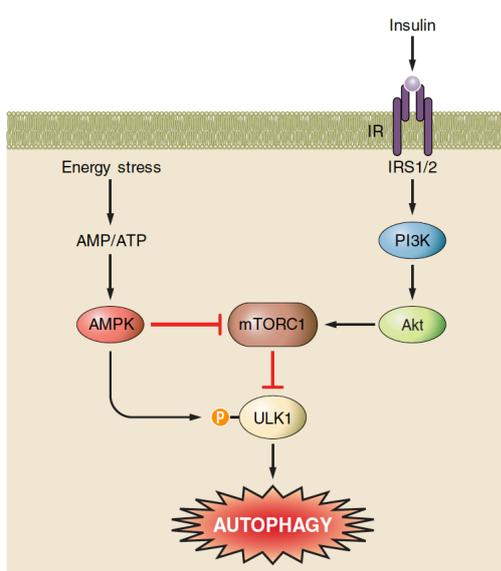


Figura 10. Vía de señalización reguladora de la autofagia en los cardiomiocitos.

Fuente: Delbridge LM et al., 2015.

cardiomiopatía diabética se postula como un factor causativo para desarrollar una insuficiencia cardíaca e incluso la muerte en dichos pacientes^{49,50}. La insulina estimula la síntesis proteica e inhibe el proceso de autofagia. En un primer momento se supuso que condiciones de deficiencia (diabetes de tipo 1) o de resistencia a la insulina (diabetes de tipo 2) podrían incrementar la actividad de la autofagia⁵⁰. Este acontecimiento puede ser

debido a que la diabetes, sea causada por deficiencia o resistencia a la insulina, viene acompañada por un aumento de los niveles de glucosa que pueden inhibir directamente a la autofagia. Este es el motivo por el que, parece ser, que la autofagia se encuentra reducida en lugar de incrementada en el corazón diabético, lo que refleja un efecto neto de la deficiencia de insulina, hiperglucemia u otros cambios asociados con la diabetes^{49,50}. A pesar de la deficiencia en insulina, la vía de mTORC1 se encuentra activada mientras que la de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) se encuentra inhibida, como se refleja en la figura 10. Estos cambios son los responsables de la disminución de la autofagia en el tejido

cardíaco en la diabetes de tipo 1⁵¹. Un estudio reciente sugiere un papel cardioprotector de la autofagia en modelos de ratones de diabetes de tipo 1.

Específicamente, el fármaco utilizado para la diabetes, metformina, hace incrementar la vía de señalización de la AMPK, lo que restauraría la actividad de la autofagia en el corazón diabético. Debido a que AMPK es un regulador positivo de la autofagia, se supuso que la metformina mejoraría la función cardíaca en la diabetes mediante el aumento de la actividad de la autofagia. Sin embargo, dado que la recuperación de la actividad de la autofagia condujo a daño cardíaco, el efecto cardioprotector de la metformina no puede ser mediado por la autofagia. Por tanto, la metformina estaría

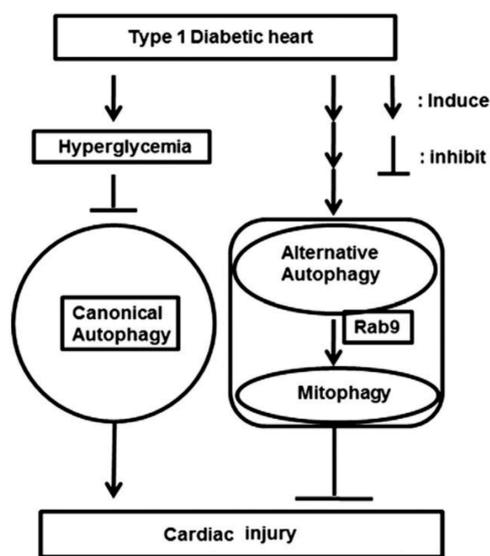


Figura 11. Activación de la vía alternativa de la autofagia en la diabetes de tipo 1. La inhibición de la autofagia es cardioprotectora en la diabetes de tipo 1, lo cual puede ser explicado por el incremento de la autofagia mediada por Rab9. Fuente: Kobayashi S et al., 2014.

vinculada en proteger al corazón diabético mediante otras rutas activadas por AMPK o cambios metabólicos^{52,53}. Entre otros ejemplos, dicha enzima inhibe todos aquellos procesos celulares que consumen energía, promueve la oxidación de los ácidos grasos o la biogénesis mitocondrial⁵³. Recientemente, se ha demostrado que la disminución de la autofagia en corazones diabéticos se encuentra asociada a un aumento de los niveles de Rab9, una pequeña proteína de unión a GTP implicada en la degradación mitocondrial durante el proceso de maduración de los eritrocitos^{49,50,54}. En la diabetes, la mitocondria se convierten en la principal fuente de generación o diana de ERO, por lo que todas aquellas mitocondrias dañadas deben ser eliminadas mediante mitofagia, sino podrían generar más cantidad, empeorando el daño cardíaco⁵². Dicha proteína parece ser importante en la mediación de la degradación mitocondrial en este tejido. Como se observa en la figura 11, la autofagia mediada por Rab9 supondría un modelo alternativo que permite mantener unos niveles relativamente normales de mitofagia para eliminar mitocondrias dañadas, limitando de esta manera el daño cardíaco⁵⁴.

No obstante a todo este paradigma, se requieren futuras investigaciones para dilucidar los mecanismos moleculares que regulan esta ruta alternativa de la autofagia, de modo que su potencial pueda ser utilizado para la cardiomiopatía diabética.

5. CONCLUSIONES

1. La mitofagia es un proceso sumamente importante en el mantenimiento de la homeostasis celular.
2. Las alteraciones en el proceso de mitofagia se encuentran estrechamente relacionadas en el desarrollo de enfermedades cardíacas, entre otras.
3. Las mutaciones que afectan a determinados componentes del aparato de la mitofagia suelen comportar una acumulación de mitocondrias disfuncionales, acontecimiento completamente asociado a un aumento del daño cardíaco.
4. La micromitofagia es un mecanismo concreto que permite menguar el daño cardíaco en un entorno en el que abundan los radicales libres.
5. Una mecanismo alternativo de la autofagia podría suponer un descenso del daño cardíaco en la diabetes de tipo 1.
6. Los mecanismos moleculares que tratan de unir a la mitofagia con el desarrollo de determinadas enfermedades cardíacas no están completamente definidos, por lo que se requieren estudios adicionales en un futuro.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹Feng, Y., He, D., Yao, Z. & Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24, 24–41 (2014).
- ²Feng, Y., Yao, Z. & Klionsky, D. J. How to control self-digestion: Transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology* 25, 354–363 (2015).
- ³Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B. & Kroemer, G. Metabolic control of autophagy. *Cell* 159, 1263–1276 (2014).
- ⁴Mizumura, K., Choi, A. M. K. & Ryter, S. W. Emerging role of selective autophagy in human diseases. *Frontiers in Pharmacology* 5, (2014).
- ⁵Ryter, S. W., Koo, J. K. & Choi, A. M. K. Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 17, 329–337 (2014).
- ⁶Yoshii, S. R. & Mizushima, N. Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1853, 2797–2801 (2015).
- ⁷Stotland, A. & Gottlieb, R. A. Mitochondrial quality control: Easy come, easy go. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1853, 2802–2811 (2015).
- ⁸Ni, H. M., Williams, J. A. & Ding, W. X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology* 4, 6–13 (2015).
- ⁹Durcan, T. M. & Fon, E. A. The three "P's" of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes and Development* 29, 989–999 (2015).
- ¹⁰Eiyama, A. & Okamoto, K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology* 33, 95–101 (2015).
- ¹¹Redmann, M., Dodson, M., Boyer-Guittaut, M., Darley-Usmar, V. & Zhang, J. Mitophagy mechanisms and role in human diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 53, 127–33 (2014).
- ¹²Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Experimental Gerontology* 56, 182–188 (2014).
- ¹³Campello, S., Strappazzon, F. & Cecconi, F. Mitochondrial dismissal in mammals, from protein degradation to mitophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 451–460 (2014).
- ¹⁴Zhu, J., Wang, K. Z. Q. & Chu, C. T. After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy* 9, 1663–1676 (2013).
- ¹⁵Ashrafi, G. & Schwarz, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* 20, 31–42 (2013).
- ¹⁶Hammerling, B. C. & Gustafsson, Å. B. Mitochondrial quality control in the myocardium: Cooperation between protein degradation and mitophagy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 75, 122–130 (2014).
- ¹⁷Jimenez, R. E., Kubli, D. A. & Gustafsson, Å. B. Autophagy and mitophagy in the myocardium: Therapeutic potential and concerns. *British Journal of Pharmacology* 171, 1907–1916 (2014).
- ¹⁸Thomas, R. L. & Gustafsson, Å. B. Mitochondrial Autophagy. *Circ. J.* 77, 2449–2454 (2013).
- ¹⁹Kubli, D. A. & Gustafsson, Å. B. Mitochondria and mitophagy: The yin and yang of cell death control. *Circulation Research* 111, 1208–1221 (2012).
- ²⁰Nishida, K., Taneike, M. & Otsu, K. The role of autophagic degradation in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 78, 73–79 (2015).
- ²¹Le Chen, & Knowlton, a. a. Mitochondrial Dynamics in Heart Failure. *Congest. Hear. Fail.* 17, 257–261 (2011).

- ²²Mukherjee, U. A., Ong, S. B., Ong, S. G. & Hausenloy, D. J. Parkinson's disease proteins: Novel mitochondrial targets for cardioprotection. *Pharmacol. Ther.* 156, 34–43 (2015).
- ²³Marunouchi, T. & Tanonaka, K. Cell Death in the Cardiac Myocyte. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1094–7 (2015).
- ²⁴Shires, S. E. & Gustafsson, Asa B. Mitophagy and heart failure. *Journal of Molecular Medicine* 93, 253–262 (2015).
- ²⁵Biala, A. K. & Kirshenbaum, L. A. The interplay between cell death signaling pathways in the heart. *Trends in Cardiovascular Medicine* 24, 325–331 (2014).
- ²⁶Gottlieb, R. A., Mentzer, R. M. & Linton, P. J. Impaired mitophagy at the heart of injury. *Autophagy* 7, 1573–1574 (2011).
- ²⁷Vasquez-trincado, C. *et al.* Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J. Physiol.* 3, 509–525 (2015).
- ²⁸Kageyama, Y. *et al.* Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. *EMBO J.* 33, 2798–813 (2014).
- ²⁹Ikeda, Y. *et al.* Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circ. Res.* 116, 264–278 (2015).
- ³⁰Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F. & Youle, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803 (2008).
- ³¹Chen, Y. & Dorn, G. W. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340, 471–5 (2013).
- ³²Huang, C. *et al.* Preconditioning involves selective mitophagy mediated by parkin and p62/SQSTM1. *PLoS One* 6, (2011).
- ³³Kubli, D. A. *et al.* Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction. *J. Biol. Chem.* 288, 915–926 (2013).
- ³⁴Kubli, D. A., Quinsay, M. N. & Gustafsson, Asa B. Parkin deficiency results in accumulation of abnormal mitochondria in aging myocytes. *Commun. Integr. Biol.* 6, (2013)
- ³⁵Scarffe, L. A., Stevens, D. A., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Parkin and PINK1: Much more than mitophagy. *Trends in Neurosciences* 37, 315–324 (2014).
- ³⁶Hoshino, A. *et al.* Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat. Commun.* 4, 2308 (2013).
- ³⁷McLelland, G. L., Soubannier, V., Chen, C. X., McBride, H. M. & Fon, E. A. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J.* 33, 282–295 (2014).
- ³⁸Givvimani, S., Pushpakumar, S., Veeranki, S. & Tyagi, S. C. Dysregulation of Mfn2 and Drp-1 proteins in heart failure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 92, 583–91 (2014).
- ³⁹Andres, A. M., Stotland, A., Queliconi, B. B. & Gottlieb, R. A. A time to reap, a time to sow: Mitophagy and biogenesis in cardiac pathophysiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 78, 62–72 (2015).
- ⁴⁰Ding, W. X. & Yin, X. M. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological Chemistry* 393, 547–564 (2012).
- ⁴¹Ong, S.-B., Hall, A. R. & Hausenloy, D. J. Mitochondrial dynamics in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 400–14 (2013).
- ⁴²Siddall, H. K. *et al.* Loss of PINK1 Increases the Heart's Vulnerability to Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS One* 8, (2013).
- ⁴³Wang, Y., Nartiss, Y., Steipe, B., McQuibban, G. A. & Kim, P. K. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* 8, 1462–1476 (2012).

- ⁴⁴Kurihara, Y. *et al.* Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J. Biol. Chem.* 287, 3265–3272 (2012).
- ⁴⁵Kornfeld, O. S. *et al.* Mitochondrial Reactive Oxygen Species at the Heart of the Matter: New Therapeutic Approaches for Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* 116, 1783–1799 (2015).
- ⁴⁶Cai, Z. & Yan, L.-J. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* 1, 15–26 (2013).
- ⁴⁷Kohr, M. J., Murphy, E. & Steenbergen, C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-nitrosylase in the heart. *PLoS One* 9, (2014).
- ⁴⁸Yogalingam, G., Hwang, S., Ferreira, J. C. B. & Mochly-Rosen, D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) phosphorylation by protein kinase C δ (PKC δ) inhibits mitochondria elimination by lysosomal-like structures following ischemia and reoxygenation-induced injury. *J. Biol. Chem.* 288, 18947–18960 (2013).
- ⁴⁹Kubli, D. A. & Gustafsson, A. B. Unbreak my heart: targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal* 22, 1527–1544 (2015).
- ⁵⁰Gottlieb, R. A., Mentzer, R. M. & Linton, P. J. Impaired mitophagy at the heart of injury. *Autophagy* 7, 1573–1574 (2011).
- ⁵¹Delbridge, L. M. D., Mellor, K. M., Taylor, D. J. R. & Gottlieb, R. a. Myocardial autophagic energy stress responses - macroautophagy, mitophagy and glycopagy. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 3010, ajpheart.00002.2015 (2015).
- ⁵²Xu, X. *et al.* Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. *J. Biol. Chem.* 288, 18077–18092 (2013).
- ⁵³Giricz, Z., Mentzer Jr., R. M. & Gottlieb, R. A. Autophagy, myocardial protection, and the metabolic syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol* 60, 125–132 (2012).
- ⁵⁴Kobayashi, S. & Liang, Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1852, 252–261 (2015).