



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

APOPTOSIS EN EL CORAZÓN PREDIABÉTICO: Rol de la mitocondria y la comunicación Retículo Sarcoplasmático-mitocondria

Tesista: Lic. Marilén Federico

Director/a: Dra. Julieta Palomeque

Año: 2021

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a las instituciones que me brindaron la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Al Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) que me otorgaron las becas que me permitieron realizar el trabajo de tesis. El mayor agradecimiento a la UNLP y a la Facultad de Ciencias Exactas que me otorgaron mi título de Licenciada en Bioquímica, y me dieron la oportunidad de realizar un doctorado de forma gratuita. Otro enorme agradecimiento al Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC), a la Facultad de Ciencias Médicas y sus respectivos directivos, por abrirme sus puertas para usar instalaciones, equipos y permitirme formarme y conocer científicos y no científicos increíbles.

Agradecer a mi directora: **Dra. Julieta Palomeque:**

Julieta me guio todos estos años en mi tránsito por el doctorado, me enseñó a trabajar y a buscar a las personas indicadas para trabajar y aprender. Julieta no sólo me motivó a seguir adelante en momentos donde los experimentos no acompañan el progreso, sino también en momentos personales complejos. Ella tiene una personalidad tan particular, que muchos no entenderán, tan especial que me ayudó a conseguir becas, a escribir trabajos, a escribir la tesis, entre muchas otras. Por esto le agradezco infinitamente por aceptarme como su becaria y por su lucha incansable por mi progreso, forma parte de mi familia en el laboratorio y la aprecio más allá de lo laboral.

Quiero agradecer a la **Dra. Alicia Mattiazzi:**

Alicia es uno de los más grandes ejemplos que la ciencia Argentina tiene hoy en día, está jubilada hace años, pero trabaja más que cualquiera en el CIC. Ella promueve la ciencia día a día y lleva una lucha incansable para realizarla. En mi caso en particular me ha dado tanto como es imposible nombrar, desde cosas materiales imprescindibles para realizar experimentos, hasta su conocimiento y discusión de todos los resultados de la tesis. Agradezco infinitamente haber podido aprovechar sus conocimientos y su pasión por la ciencia.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares:

Agradezco a los directivos y gente del CIC en general, tanto investigadores, como becarios y personal de apoyo. Un agradecimiento particular a todo el personal de apoyo, que me enseñó a trabajar, a usar equipamiento del CIC, y por la ayuda en general que hacen el día a día: Mónica

Rando, Omar Castillo, Omar Velez, Luciana Sapia, Caro Cianccio, Lucia Pagola, Juan Lofeudo, Ramiro Martínez, Leandro Di Cianni, Iván Lucaroni y Guillermina Mangioni.

Me gustaría también dedicarles unos renglones de agradecimiento a aquellas personas del CIC que me ayudaron tanto experimentalmente como aportando sus conocimientos, buena voluntad y consejos, sin ser su trabajo, para ayudarme a aprender y crecer durante este doctorado; Leandro Sommese, Charly, Luis, Celeste, Vero, Irene, Caro Jaquenod, Caro Cianccio, Male, Ale Ciocci, Ale Orłowski, Ale Ibañez, Sofi Espejo, Fio, Josh, Juan Felice, Ale Cely, Guille Nuozi, Sofi López, Fer Carrizo, Maite, y Romi.

Universidad de Buenos Aires: Tamara Vico, Silvia Álvarez y Virginia Vanasco

Un agradecimiento para las personas que me abrieron las puertas de su laboratorio en la UBA, me ayudaron con mucho de los experimentos que son parte de esta tesis, y a aprender mucho de la mitocondria. A Tamara Vico en especial agradecimiento por leer parte de la tesis y ayudarme con sus correcciones.

Laboratorio de análisis de imágenes: Enrique Portiansky

El agradecimiento más que especial para Enrique o Porti, como nos da el honor de llamarlo, que participó en todo el análisis de microscopía electrónica, me enseñó mucho de microscopía y del correcto análisis de imágenes. Gracias.

Anderson's Lab:

Agradezco al Dr. Mark Anderson por obsequiarnos la cepa de ratones AC3I para el uso de esta tesis y de los trabajos de investigación realizados.

Valdivia's Lab:

Quiero agradecer a Héctor Valdivia, Carmen Valdivia y Francisco Alvarado, por enseñarme sus conocimientos sobre el RyR2, sobre los experimentos de unión de rianodina, y por participar de los resultados de esta tesis.

Sheu's Lab:

Quiero agradecer al Dr. Shey-Shing Sheu por darme la posibilidad de viajar a Filadelfia, USA. El Dr. Sheu me abrió las puertas de su laboratorio sin conocerme sólo porque yo quería aprender. Y así fue. Le estoy muy agradecida por la oportunidad de aprendizaje de nuevas técnicas y conocimientos en el tema, pero además permitirme crecer en muchos aspectos, y

conocer personas increíbles. Personalmente, estoy especialmente agradecida con las personas que abrieron las puertas de su casa y me brindaron un hogar en un país extranjero; Celia, Sebastian, Sergio y Diana. Más aún, durante tiempos difíciles como fue una pandemia mundial. No sé si saben lo importante que fue para mí. Muchas gracias a todos ellos.

I want to thank Dr. Shey-Shing Sheu for give me the chance to travel to his lab in the USA, to learn new techniques and earn knowledge. Also, to let me know amazing people, and share incredible time with them even though he did not know me. I am very grateful to the people that opened their homes to help me during my three months there: Celia, Sebastian, Sergio, and Diana. They help me a lot in hard time as world pandemic. They do not know how much important it for me was. Thank you!

Quiero agradecer especialmente a mi familia: **Analia, Sergio, Abuelos, Hermanos, Sobrino, Cuñados, Primos y Tíos. Padre, madre, hermanos y sobrinos políticos.**

Ellos son las personas que no viven en una ciudad, tal vez no saben lo que es hacer un doctorado, o de que trata esta tesis, pero si vieron que trabajamos día y noche para esto. Ellos son las personas que uno quiere encontrarse en la vida, de las que se aprende a vivir, y por las que uno viaja la distancia que sea y los kilómetros que fueran necesarios para verles. Agradezco el apoyo incondicional que otorgan sin si quiera saberlo, a los que están hoy conmigo, y mando un abrazo a los que no están. Los quiero inmensamente.

A mis hermanos, un agradecimiento más que especial, porque siempre están ahí lejos y cerca, para un juego de mesa, para una película, para una foto y cualquier locura que se desee espontáneamente realizar. A mi abuela y abuelo (padres postizos) y a mi papá y mamá, mis referentes en el mundo, les agradezco por haberme dado la posibilidad económica, y el apoyo emocional que uno necesita para mudarse a los 18 años a una ciudad enorme a estudiar una carrera de 6 años. Por hacerme la persona que soy hoy en día, con mis virtudes y defectos, que me permiten perseverar y perseguir las cosas que creo que valen el esfuerzo. Ojalá pudiera devolverles un mínimo porcentaje de todo lo que me dieron y dan día a día.

Amigos. Quiero agradecer a mis amigos, los de “La Plata”, a los de Giles y los de mi pueblo: Marina, Nati, Dai, Ro, Romi Di Mattia, Juli, Agus, Emi, Gise Vespasiano, Vichu, Yuli, Khalo, Chino, Negro, Maqui, Rulo, Sofi Rivetti, Meli, Joaco, Gabi, Lucho, Manu, Cesar, Sofi Gómez,

Romi Crego, Tefi, Pau, Giya, Omin, Mati, Chaqui, Gise Feller, Tonga, Maite, Fer, Tami, los amigos de amigos, los amigos del CIC, los amigos del CETMIC. A todos ellos les quiero agradecer por acompañarme cada uno de su lugar, desde un mate, una charla, una cerveza, un viaje, una convivencia de pandemia, ellos son el cable a la realidad. Durante mis años de vida y en La Plata tuve la suerte de encontrarme con muchas personas muy buenas que se merecen la mayor de las felicidades. Gracias.

A mi compañero: Facundo

El agradecimiento para con él es casi indescriptible, ya que me acompañó tanto en parte de mi carrera para la licenciatura, ayudándome a estudiar para los finales, como en la carrera de doctorado, en la especialización docente, en la escritura de esta tesis, en los momentos personales difíciles, y en cada locura que la vida me permite. Es mi amigo, psicólogo, consejero y compañero de vida, el que siempre tiene la palabra justa, el que hace todo lo correcto siempre, lo que está bien, y todo lo que me hace bien. Ya lo sabe, pero le agradezco infinitamente por la ayuda y compañía que me da día a día.

Índice

| | |
|--|----|
| Capítulo 1. Introducción | 20 |
| 1.1. Diabetes mellitus y prediabetes | 20 |
| 1.2. Fisiopatología diabética | 22 |
| 1.3. Metabolismo Cardíaco y Diabetes Mellitus..... | 25 |
| 1.4. Apoptosis cardíaca | 28 |
| 1.5. Acoplamiento excitación-contracción y cardiomiopatía diabética | 29 |
| 1.6. Enzima Ca ²⁺ Calmodulina quinasa II y cardiomiopatía diabética | 31 |
| 1.7. Función mitocondrial en el corazón y cardiomiopatía diabética | 32 |
| 1.8. Construcción de la hipótesis de trabajo y objetivos..... | 33 |
| Capítulo 2. Modelo de prediabetes: Dieta rica en fructosa | 35 |
| 2.1. Introducción | 35 |
| 2.2. Materiales y Métodos..... | 40 |
| 2.2.1. Manejo de animales | 40 |
| 2.2.2. Modelo Animal | 40 |
| 2.2.3. Modelo Celular | 41 |
| 2.2.4. Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa..... | 42 |
| 2.2.5. Medida de tejido adiposo corporal..... | 42 |
| 2.2.6. Ecocardiografía | 43 |
| 2.3. Resultados | 44 |
| 2.3.1. Parámetros metabólicos | 44 |
| 2.3.2. Tolerancia a la glucosa alterada | 44 |
| 2.3.3. Presión arterial, parámetros morfométricos, y tejido adiposo | 46 |
| 2.3.4. Caracterización por ecocardiografía | 48 |
| 2.4. Conclusión y discusión | 49 |
| Capítulo 3. Apoptosis en el corazón prediabético | 51 |
| 3.1. Introducción | 51 |

| | |
|--|----|
| 3.1.1. Vía apoptótica Tipo I-Cascada extrínseca de apoptosis | 52 |
| 3.1.2. Vía apoptótica tipo II-Cascada intrínseca de apoptosis | 53 |
| 3.1.3. Muerte celular en la CMD | 55 |
| 3.2. Materiales y Métodos..... | 57 |
| 3.2.1. Determinación de la apoptosis por la técnica TUNEL | 57 |
| 3.2.2. Determinación de apoptosis mediante western blot..... | 58 |
| 3.2.3. Determinación de colágeno..... | 58 |
| 3.3. Resultados | 59 |
| 3.3.1. Apoptosis en el corazón prediabético | 59 |
| 3.3.2. La fibrosis en el corazón prediabético no se vio alterada | 61 |
| 3.4. Conclusión y discusión | 62 |
| Capítulo 4. Manejo del calcio en el corazón prediabético | 63 |
| 4.1. Introducción | 63 |
| 4.1.1. Regulación de la liberación de calcio desde el RS | 64 |
| 4.1.2. Regulación de la recaptación de Ca ²⁺ por el RS | 68 |
| 4.1.3. Alteraciones del manejo del calcio en prediabetes | 71 |
| 4.2. Materiales y Métodos..... | 73 |
| 4.2.1. Microscopia de epifluorescencia..... | 73 |
| 4.2.2. Medida de liberaciones espontáneas de calcio..... | 76 |
| 4.2.3. Ensayos de unión de rianodina tritiada | 77 |
| 4.3. Resultados | 79 |
| 4.3.1. Manejo del calcio citosólico | 79 |
| 4.3.2. Pérdidas espontáneas de calcio | 83 |
| 4.3.3. La actividad del RyR2 se encuentra aumentada en células HEK293 tratadas con alta glucosa y en corazones prediabéticos | 86 |
| 4.4. Conclusión y discusión | 88 |
| Capítulo 5. Remodelamiento del tejido cardiaco prediabético | 90 |

| | |
|--|-----|
| 5.1. Introducción | 90 |
| 5.1.1. Organización del tejido cardiaco | 90 |
| 5.1.2. Alteraciones en la organización tisular | 92 |
| 5.2. Materiales y Métodos..... | 94 |
| 5.2.1. Microscopia electrónica de transmisión..... | 94 |
| 5.2.2. Determinación de la expresión de proteínas | 94 |
| 5.3. Resultados..... | 95 |
| 5.3.1. Remodelamiento en el tejido cardiaco de animales prediabéticos..... | 95 |
| 5.3.2. El remodelamiento del tejido se acompaña de un acercamiento entre el RS y la mitocondria | 98 |
| 5.3.3. La disminución de distancia entre organelas se debe a un aumento de la expresión de proteínas que participan de esta comunicación | 99 |
| 5.4. Conclusión y Discusión | 101 |
| Capítulo 6. Rol de la mitocondria en el corazón prediabético..... | 103 |
| 6.1. Introducción | 103 |
| 6.1.1. Transportadores iónicos mitocondriales | 104 |
| Complejo MCU..... | 105 |
| mPTP..... | 106 |
| 6.1.2. Cadena transportadora de electrones y producción de ATP: fosforilación oxidativa | 108 |
| 6.1.3. Producción y eliminación de ROS..... | 113 |
| 6.1.4. Estructura y dinámica mitocondrial | 115 |
| 6.1.5. Mitocondrias en la CMD | 115 |
| 6.2. Materiales y Métodos..... | 117 |
| 6.2.1. Aislamiento de mitocondrias | 117 |
| 6.2.2. Determinación de <i>swelling</i> mitocondrial | 118 |
| 6.2.3. Cuantificación de huecos o <i>holes</i> mitocondriales..... | 118 |

| | |
|---|-----|
| 6.2.4. Determinación de la capacidad de retención de calcio | 119 |
| 6.2.5. Determinación del potencial de membrana mitocondrial | 120 |
| 6.2.6. Determinación del consumo de oxígeno mitocondrial | 122 |
| 6.2.7. Determinación de la producción de ATP | 123 |
| 6.2.8. Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno | 124 |
| 6.2.9. Análisis de la morfología mitocondrial..... | 125 |
| 6.2.10. Determinación de procesos de fisión y fusión | 126 |
| 6.3. Resultados | 127 |
| 6.3.1. La prediabetes altera la carga de Ca ²⁺ mitocondrial y genera swelling mitocondrial | 127 |
| 6.3.2. La prediabetes induce cambios en el potencial de membrana mitocondrial..... | 131 |
| 6.3.3. La prediabetes desencadena alteraciones en el metabolismo mitocondrial cardiaco | 132 |
| 6.3.4. La prediabetes afecta la morfología mitocondrial | 134 |
| 6.3.5. Los corazones prediabéticos presentan un desbalance en la dinámica mitocondrial | 137 |
| 6.4. Conclusión y Discusión | 139 |
| Capítulo 7. Rol de la enzima CaMKII en el corazón prediabético | 141 |
| 7.1. Introducción | 141 |
| 7.1.1. Estructura y activación de la enzima CaMKII..... | 141 |
| 7.1.2. Función de CaMKII en el acoplamiento excitación-contracción | 143 |
| 7.1.3. Efectos deletéreos de CaMKII en el corazón..... | 145 |
| 7.2. Materiales y Métodos..... | 147 |
| 7.2.1. Inhibidores de CaMKII | 147 |
| 7.2.2. Medida de estrés oxidativo: TBARS | 147 |
| 7.2.3. Medida de <i>sparks</i> en ratones AC3I..... | 148 |
| 7.3. Resultados..... | 150 |

| | |
|---|-----|
| 7.3.1. CaMKII se encuentra involucrada en el mecanismo de producción de la apoptosis. | 150 |
| 7.3.2. Mecanismo de activación de CaMKII en la cascada apoptótica..... | 152 |
| 7.3.3. La pérdida de calcio se encuentra aumentada debido a la actividad de CaMKII | 154 |
| 7.3.4. CaMKII es responsable de la mayor actividad de los RyR2 debido a la fosforilación en el sitio Ser ²⁸¹⁴ | 156 |
| 7.3.5. CaMKII se encuentra involucrada en el ordenamiento del tejido cardiaco | 158 |
| 7.3.6. La disminución de distancia entre RS-mitocondria es dependiente de la actividad de CaMKII | 159 |
| 7.3.7. CaMKII modula la expresión de proteínas que comunican el RS con las mitocondrias..... | 160 |
| 7.3.8. CaMKII es responsable de las alteraciones mitocondriales producidas en el corazón prediabético..... | 161 |
| 7.3.9. La inhibición de CaMKII previene los cambios morfológicos mitocondriales y los procesos de fisión..... | 166 |
| 7.4. Conclusión y discusión | 169 |
| Capítulo 8. DISCUSIÓN INTEGRAL | 171 |
| 8.1. Relevancia de la DM y prediabetes en Argentina..... | 171 |
| 8.2. La dieta rica en fructosa como modelo de prediabetes | 172 |
| 8.3. Apoptosis en el corazón prediabético | 174 |
| 8.4. Manejo de calcio en el corazón prediabético, un mediador de muerte celular | 175 |
| 8.5. Relación RS-mitocondrias y el rol mitocondrial en la patogénesis del corazón prediabético..... | 177 |
| 8.6. Alteraciones mitocondriales en el corazón prediabético | 180 |
| 8.7. Efectos deletéreos de CaMKII en la prediabetes | 181 |
| Relevancia clínica y limitaciones..... | 183 |
| APÉNDICE I: Materiales y Métodos Generales | 184 |
| Aislamiento de cardiomiocitos | 184 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Western blot | 185 |
| Preparación de homogenato | 185 |
| Preparación de las muestras | 186 |
| Electroforesis | 186 |
| Determinación de proteínas | 187 |
| Método de Lowry | 187 |
| Método de Bradford | 187 |
| Estadística | 188 |
| <i>Referencias</i> | 189 |

Lista de Abreviaturas

- [³H]Ry:** Rianodina tritiada
Δp: Fuerza protón motriz
ΔpH: Potencial químico
Δψ: Potencial de membrana mitocondrial
2D: 2 dimensiones
3D: 3 dimensiones
ABC: Área bajo la curva
AG: Ácido grasos
AGEs: Productos finales de glicosilación avanzada (*advanced glycation end products*)
AIF: Factor inductor de apoptosis (*apoptosis inducing factor*)
AM: Acetometilester
ANT: Transportador de nucleótidos de adenina
APAF1: Factor apoptótico activador de proteasa (*apoptotic protease activating factor 1*).
BAK: Proteína anti-apoptótica (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*)
Bax: Proteína pro-apoptótica (*Bcl-2-associated X*)
Bcl-2: proteína anti-apoptótica (*B cell leukemia/lymphoma-2*)
Bid: *BH3-interacting domain death*
BIM: *Bcl-2-interacting mediator of cell death*
BIM: *Bcl-2-interacting mediator of cell death*
BSA: Albúmina bovina (*bovine serum albumin*)
CaM: Calmodulina
CaMKII: Quinasa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina II (*Ca²⁺/Calmodulin kinase II*).
CARD: Dominio reclutador de caspase (*caspasa recruitment domain*)
CICR: Liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (*Ca²⁺ induce-Ca²⁺ release*)
CMD: Cardiomiopatía diabética
CoA: Cofactor A
CPT-1: Carnitina palmitoil transferasa 1
CPT-2: carnitina palmitoil transferasa 2
CR: Control respiratorio
CRC: Capacidad de retención de Ca²⁺
CsA: Ciclosporina A
CSQ2: Calsequestrina (*calsequestrin*)
CypD: Ciclofilina D
Cys: Residuo cisteína
D.O: Densidad óptica
DAPI: Marcador de núcleos (4',6-*Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride*)
DC: Dieta control
DDVI: Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo
DM: Diabetes mellitus
DMT1: Diabetes mellitus tipo 1
DMT2: Diabetes mellitus tipo 2
DRF + T: Dieta rica en fructosa + Tempol
DRF: Dieta rica en fructosa
Drp1: Proteína relacionada con la fisión (*dynammin-like protein 1*)
e⁻: electrones
ECB: Acoplamiento excitación-contracción bioenergética (*excitation-contraction bioenergetics coupling*)
ECC: Acoplamiento excitación-contracción (*excitation-contraction coupling*)
ECG: Electrocardiograma
EMRE:
EndoG: Endonucleasa G
ETC: Cadena transportadora de electrones (*electron transport chain*)
FA%: Fracción de acortamiento endocárdico porcentual
FA: fibrilación auricular
FADD: Dominio asociado a Fas (*Fas-associated via death domain*)
FasL: Ligando Fas
FasL: Receptor ligando Fas
FDHM: Representa la duración a la mitad de la amplitud máxima (*full duration at half-maximum amplitude*)
FeS: Complejos hierro/azufre
FMN: *Flavin mononucleotide*

- FR:** Fracción de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (*fractional release*)
- FWHM:** Representa el ancho a la mitad de la amplitud máxima (*full width at half-maximum amplitude*)
- GA:** Glucosa alta
- GAA:** Glucemia en ayunas alterada
- GDS:** Grosor diastólico del septum
- GFP:** Proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*)
- GN:** Glucosa normal
- GPPD:** grosor de la pared posterior en diástole
- GPX:** Glutación peroxidasa
- Grp75:** Proteína relacionada con el estrés celular (*glucose-regulated protein 75*)
- GSH:** Glutación oxidado
- GSSH:** Glutación reducido
- H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- HAX-1:** Proteína X-1 asociada a HS-1,
- HRC:** *histidine-rich Ca²⁺ binding protein*
- HEK293:** Células embrionarias de riñón humano (*human-embryonic kidney*)
- HFD:** Dieta rica en grasas (*high-fat diet*)
- HKII:** Hexoquinasa II
- HNO:** Radical nitroxilo
- HRP:** Peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*)
- Hsp20:** Proteína de shock térmico 20,
- I-1:** Inhibidor-1
- IAP:** Inhibidor de la apoptosis (*inhibitor of apoptosis*)
- IMF:** Mitocondrias intermiofibrilares
- IMM:** Membrana mitocondrial interna (*inner mitochondria membrane*)
- IMVI:** Índice de masa ventricular izquierda
- Inf2:** Proteína en las MAMs (*inverted formin 2*)
- JC-1:** Marcador del $\Delta\psi$ mitocondrial
- jRS:** *junctional RS*
- K_D:** Constante de disociación
- KN-92:** Análogo inactivo de KN93
- KN-93:** Inhibidor de la enzima CaMKII
- LDS:** Dodecilsulfato de litio
- LTCC:** Canal de Ca^{2+} tipo lento (*L-type Ca²⁺ channel*)
- MAMs:** Membranas asociadas a las mitocondrias (*mitochondria associated membranas*)
- MCU:** Transportador de Ca^{2+} mitocondrial (*mitochondrial Ca²⁺ uniporter*)
- MCUb:** Regulador de la apertura del complejo MCU
- MDA:** Malondialdehído
- MET:** Microscopia electrónica de transmisión
- MetS:** Síndrome metabólico (*metabolic syndrome*)
- Mfn1:** Mitofusina 1
- Mfn2:** Mitofusina 2
- mHCX:** Intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$
- MICU1:** *Mitochondrial Calcium Uptake 1*
- MICU2:** *Mitochondrial Calcium Uptake 1*
- MnSOD:** Manganese superóxido dismutasa
- mPTP:** Poro de permeabilidad de transición mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore*)
- mtCK:** Creatina quinasa mitocondrial (*mitochondrial creatine kinase*)
- MVI:** Masa ventricular izquierda
- Na⁺/K⁺ ATPasa:** Bomba intercambiadora Na^+/K^+
- NCLX:** Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$
- NCX:** Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
- NF- $\kappa\beta$:** Factor nuclear $\kappa\beta$ (*nuclear factor kappa beta*)
- NO:** Monóxido de nitrógeno
- NOX:** NADPH oxidasa
- O₂⁻:** Anión superóxido
- OMM:** Membrana mitocondrial externa (*outer mitochondria membrane*)
- ONOO⁻:** Peroxinitrito
- Opa1:** Proteína relacionada con la fusión mitocondrial (*optic-protein atrophic 1*)
- Ox-CaMKII:** CaMKII activada por oxidación

OXPHOS: Fosforilación oxidativa
(*oxidative phosphorylation*)

P₀: Probabilidad de apertura

PBS: Buffer fosfato (phosphate-buffered saline)

PDE4D: Fosfodiesterasa 4

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PGC1 α : Coactivador 1 α de PPAR γ

P_i: Fosforo inorgánico (*inorganic phosphate*)

PiC: Portador de fosfato inorgánico

PKA: Proteína quinasa A (*protein kinase A*)

PKC: Proteína quinasa C (*protein kinase C*)

PKG: Proteína quinasa G (*protein kinase G*)

PP-1: proteína fosfatasa 1 (*protein phosphatase 1*)

PP-2A: Proteína fosfatasa 2A (*protein phosphatase 2A*)

PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PRX: Peroxiredoxina

PUMA: *p53-upregulated modulator of apoptosis*

PVDF: Difluoruro polivinilideno

Q \cdot^- : Semiubiquinona

Q: Ubiquinona

RE: Retículo endoplasmático

RNS: Especies reactivas de nitrógeno
(*reactive nitrogen species*)

ROS: Especies reactivas del oxígeno
(*reactive oxygen species*)

RS: Retículo sarcoplasmático

RS: Retículo sarcoplasmático.

RyR2: Receptor de rianodina 2

SCaRE: Liberaciones espontáneas de Ca²⁺
(*spontaneous Ca²⁺ release events*)

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SERCA2a: Bomba ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplasmático
(*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2a*)

SFB: Suero fetal bovino

SMAC/DIABLO: *Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI*,

SOD: Superóxido dismutasa

SSM: Mitocondrias sub-sarcolemales

STZ: Estreptozotocina (*streptozotocin*)

t $\frac{1}{2}$: Tiempo medio

TAB: Tejido adiposo blanco

TAP: Tejido adiposo pardo

TBA: Ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid*)

TBARS: Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (*TBA reactive species*)

TdT: Enzima terminal desoxinucleotidil transferasa (TdT)

TG: Triglicéridos

TGA: Tolerancia a la glucosa alterada

TIpG: Tolerancia intraperitoneal a la glucosa

Tm: Tropomiosina

TnC: Troponina C

TNF R1: Receptor de TNF

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa
(*tumoral necrosis factor α*)

TnI: Troponina I

TnT: Troponina T

TRADD: Dominio asociado a TNF R1
(*TNF R1-associated via death domain*,

TRX: Tioeredoxina

TSPO: Receptor periférico de benzodiazepinas

TUNEL: Técnica para medir el DNA fragmentado (*TdT-mediated dUTP-X nick end labeling*)

VDAC: Poro ubicado en la membrana externa mitocondrial (*voltage-dependent anion channel*)

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad
(*very-low-density lipoprotein*)

WT: cepa salvaje (*wild type*)

κ SERCA: Actividad estimada de SERCA2a

λ : Longitud de onda

τ : tau

Índice de figuras

| | |
|---|------------|
| Figura 2.1. Clasificación de los distintos tipos de tejido adiposo..... | 43 |
| Figura 2.2. Los ratones tratados con la dieta rica en fructosa poseen una curva de tolerancia intraperitoneal a la glucosa alterada..... | 45 |
| Figura 2.3. Los ratones prediabéticos presentan un aumento del tejido adiposo blanco. | 47 |
| Figura 3.1. Aumento de la apoptosis en los corazones prediabéticos..... | 59 |
| Figura 3.2. Relación Bax/Bcl-2 como índice apoptótico. | 60 |
| Figura 3.3. La prediabetes no modifica los tipos y el porcentaje de colágeno en el tejido cardiaco..... | 61 |
| Figura 4.1. Registros representativo de la medida de calcio citosólico y acortamiento celular..... | 80 |
| Figura 4.2. La prediabetes genera alteraciones en la velocidad de recaptación de Ca^{2+} y acortamiento de cardiomiocitos aislados. | 81 |
| Figura 4.3. Parámetros del transitorio de Ca^{2+} generado por el pulso de Cafeína..... | 82 |
| Figura 4.4. La prediabetes aumenta la liberación de calcio respecto del contenido de calcio del retículo sarcoplasmático y la actividad de SERCA2a. | 83 |
| Figura 4.5. Los cardiomiocitos de ratones prediabéticos presentan liberaciones espontaneas de Ca^{2+}. | 85 |
| Figura 4.6. La exposición a glucosa alta y la prediabetes generan un aumento de la actividad de los RyR2 expresados en células HEK293 y en corazones de ratones prediabéticos..... | 87 |
| Figura 5.1. La prediabetes produce un desarreglo del corazón prediabético asociado a una mayor formación de vacuolas..... | 96 |
| Figura 5.2. Lisosomas. | 97 |
| Figura 5.3. Gránulos de glucógeno..... | 98 |
| Figura 5.4. La prediabetes disminuye la distancia entre RS y mitocondria..... | 99 |
| Figura 5.5. La prediabetes genera un aumento de la expresión de proteínas que participan en la comunicación entre el RS y la mitocondria. | 100 |
| Figura 6.1. Medida de huecos mitocondriales por microscopia electrónica de transmisión. | 119 |
| Figura 6.2. La prediabetes aumenta el swelling mitocondrial y disminuye la CRC..... | 129 |

| | |
|--|------------|
| Figura 6.3. La prediabetes genera cambios en la estructura de las crestas mitocondriales y holes en el interior de la mitocondria..... | 131 |
| Figura 6.4. La prediabetes afecta el potencial de membrana mitocondrial. | 132 |
| Figura 6.5. Los corazones prediabéticos presentan alterado el metabolismo mitocondrial. | 134 |
| Figura 6.6. Las mitocondrias de corazones prediabéticos presentan modificaciones en la morfología y densidad mitocondrial..... | 137 |
| Figura 6.7. La prediabetes induce un aumento en la expresión de proteínas de fisión mitocondrial..... | 138 |
| Figura 7.1. La inhibición de la actividad de CaMKII sobre sus sitios blanco en el RS previene la apoptosis..... | 151 |
| Figura 7.2. Los ROS activan a la enzima CaMKII y desencadenan apoptosis en el corazón prediabético. | 154 |
| Figura 7.3. Los cardiomiocitos de ratones prediabéticos AC3I no presentan liberaciones espontaneas de Ca²⁺..... | 155 |
| Figura 7.4. Aumento de la actividad máxima del RyR2 debido a la fosforilación en el sitio Ser2814 por CaMKII..... | 158 |
| Figura 7.5. El desordenamiento producido por la prediabetes es prevenido en parte al inhibir a la enzima CaMKII..... | 159 |
| Figura 7.6. La inhibición de CaMKII previene la disminución de la distancia RS-mitocondria..... | 160 |
| Figura 7.7. CaMKII afecta la expresión de proteínas que comunican el retículo sarcoplasmático con la mitocondria. | 161 |
| Figura 7.8. La prediabetes no afecta a las mitocondrias cuando se inhibe a la enzima CaMKII..... | 162 |
| Figura 7.9. Los cambios en la disposición de las crestas mitocondriales y espacios en las mitocondrias generados por la prediabetes se previenen al inhibir CaMKII..... | 163 |
| Figura 7.10. Al inhibir CaMKII se previenen los cambios de potencial de membrana mitocondrial..... | 164 |
| Figura 7.11. Los corazones prediabéticos de animales AC3I no mostraron cambios en el metabolismo mitocondrial..... | 165 |
| Figura 7.12. Las mitocondrias de corazones de animales AC3I prediabéticos no presentan modificaciones en la morfología y densidad mitocondrial. | 167 |

| | |
|---|-----|
| Figura 7.13. El aumento en la expresión de proteínas de fisión mitocondrial inducido por la prediabetes se previene en los ratones AC3I. | 168 |
| Figura 0.1. Equipo de perfusión Langendorff. | 185 |
| Figura 0.2. Microscopia óptica de campo claro de cardiomiocitos aislados. | 185 |

Índice de tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 2.1. Pruebas diagnóstico de diabetes mellitus. | 36 |
| Tabla 2.2. Modelos más frecuentemente utilizados para el estudio de enfermedades metabólicas. | 38 |
| Tabla 2.3. Consumo calórico de los animales tratados con dieta control y dieta rica en fructosa. | 44 |
| Tabla 2.4. Parámetros morfométricos y presión arterial. | 46 |
| Tabla 2.5. Parámetros ecocardiográficos. | 48 |
| Tabla 7.1. Liberaciones espontáneas de calcio en ratones SRAIP. | 154 |
| Tabla 0.1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados. | 187 |

Índice de ilustraciones

| | |
|--|-----|
| Ilustración 1.1. Esquema de la secreción de la insulina en la célula β del páncreas. | 23 |
| Ilustración 1.3. Esquema de la utilización de ácidos grasos libres y glucosa en el corazón. | 27 |
| Ilustración 1.4. Esquema del acoplamiento éxcito-contráctil. | 30 |
| Ilustración 3.1. Esquema de las vías apoptóticas: Extrínseca e Intrínseca. | 54 |
| Ilustración 4.1. Esquema del RyR2. | 65 |
| Ilustración 4.2. Esquema de Regulación de la bomba SERCA2a. | 71 |
| Ilustración 4.3. Esquema de un transitorio de Ca^{2+} con los parámetros calculados. | 75 |
| Ilustración 4.4. Esquema representativo de las dimensiones de un spark. | 77 |
| Ilustración 5.1. Unidad contráctil del cardiomiocito. | 91 |
| Ilustración 5.2. Esquema de la ultraestructura cardiaca. | 92 |
| Ilustración 6.1. Esquema de los transportadores iones mitocondriales. | 108 |
| Ilustración 6.2. Esquema de la cadena transportadora de electrones. | 109 |
| Ilustración 6.3. Esquema de la estructura de la F_0F_1-ATP sintasa. | 112 |

| | |
|--|-----|
| Ilustración 6.4. Esquema de la producción y eliminación de especies reactivas del oxígeno. | 114 |
| Ilustración 6.5. Esquema del protocolo utilizado para medir la capacidad de retención de Ca^{2+}. | 120 |
| Ilustración 6.6. Estructura de la sonda fluorescente JC-1. | 121 |
| Ilustración 6.7. Espectro de excitación y emisión del indicador JC-1. | 122 |
| Ilustración 6.8. Esquema que representa el protocolo usado para medir los distintos estados de consumo de O_2 en las mitocondrias aisladas. | 123 |
| Ilustración 6.9. Esquema de la medida del Diámetro Feret. | 125 |
| Ilustración 7.1. Esquema de la estructura de la enzima CaMKII. | 142 |
| Ilustración 8.1. Esquema de eventos producidos en el corazón prediabético. | 182 |

Capítulo 1. Introducción

1.1. Diabetes mellitus y prediabetes

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad definida por falla en la regulación de la glucemia, tanto por alteraciones en la producción como en la utilización de la insulina (Alberti & Zimmet, 1998; World Health Organization, 2020). Esta enfermedad frecuentemente se asocia con trastornos oculares, renales, del sistema nervioso, del sistema inmune y del sistema cardiovascular, siendo esta última una importante causa de infarto agudo de miocardio e insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular, ceguera, insuficiencia renal, y amputación de miembros inferiores (World Health Organization, 2020).

La DM puede clasificarse en 3 tipos: 1- DM tipo 1 (DMT1), de aparición temprana en la infancia, por defecto de las células β pancreáticas para producir y secretar insulina; 2- DM tipo 2 (DMT2), definida como la hiperglucemia dada por la utilización ineficaz de la insulina, se presenta mayormente en adultos por diversos factores metabólicos, genéticos y farmacológicos, en donde los pacientes desarrollan insulino-resistencia; 3- diabetes gestacional, que se produce y diagnostica por primera vez en el embarazo (World Health Organization, 2020).

En la DMT2, los trastornos cardiovasculares mencionados son de vital importancia, ya que son una de las principales causas de muerte de estos pacientes (Magaña, 2014). El daño cardíaco, ya sea en la función como en la estructura, asociado a la DM independiente de otras comorbilidades (cómo obesidad, hipertensión arterial, etc) se denomina cardiomiopatía diabética (CMD) (Rubler et al., 1972). Inicialmente, la CMD se presenta como una disfunción diastólica, inhabilitando la relajación correcta del corazón, y durante el progreso de la enfermedad se termina generando una disfunción sistólica. En esta instancia, el corazón presenta dificultad para suplir la demanda del organismo, desencadenándose la insuficiencia cardíaca (Vasiliadis et al., 2014).

Durante el desarrollo insidioso de la DM existe una condición previa, conocida mayormente como prediabetes, definida por valores intermedios entre los que obtiene un paciente en

condición normal y un paciente diabético (American Diabetes Association, 2020; Bansal, 2015). Según los métodos de diagnóstico utilizados para el diagnóstico de DM esto implicaría personas con los siguientes valores: Glucemia en Ayunas ≥ 6.1 mmol/L (110 mg/dL) y < 7 mmol/L (126 mg/dL), que otorgan la clasificación de glucemia en ayunas alterada (GAA), y valores de glucemia ≥ 7.8 mmol/L (140 mg/dL) y < 11.1 mmol/L (200 mg/dL) medida pasadas 2 horas de la ingesta de 75 g de glucosa vía oral (1 g/Kg), que otorgan una tolerancia a la glucosa alterada (TGA) (American Diabetes Association, 2020; Bansal, 2015). La prevalencia a nivel mundial de pacientes adultos con prediabetes no se encuentra establecida por complejo debido a la falta de diagnóstico, sintomatología precisa, y a los diferentes valores de corte utilizados en cada país. Muchos pacientes desconocen su condición, pero lo que es más importante, desconocen que presentan un factor de riesgo de poseer DM en el futuro (Gerstein et al., 2007) que puede llevarlos a complicaciones severas.

En 2003 la *American Diabetes Association* propuso disminuir el valor de glucemia en ayunas para el diagnóstico de GAA, estableciendo 100 mg/dL como punto de corte. Esto generó que muchos países revisaran los valores de corte, y la base de esta propuesta para aceptar o denegar el cambio propuesto (Genuth et al., 2003). En la Argentina, se reunieron especialistas en el tema que concluyeron que el valor de corte de 100 mg/dL para la glucemia en ayunas sólo debería tenerse en cuenta si el paciente posee otro factor de riesgo para el desarrollo de DM como; antecedentes de diabetes en familiares de primer grado, edad mayor a 45 años, obesidad central, hipertensión arterial, diabetes gestacional previa, síndrome de ovario poliquístico y triglicéridos elevados. En los pacientes sin factores de riesgo para DM debía mantenerse el valor de 110 mg/dL. Además, propusieron que en pacientes con GAA debían prescribirse cambios en el estilo de vida, y que el término prediabetes no debe ser utilizado en pacientes con GAA, ya que no todos los pacientes desarrollan DM en el futuro (Gagliardino et al., 2007). Sin embargo, los pacientes que poseen TGA si tienen riesgo de padecer enfermedad cardiovascular y desarrollar DM, siendo el tratamiento de cambio de estilo de vida o farmacológico las opciones para retrasar o prevenir el progreso a DM, por lo que si puede ser asociado a un estado de prediabetes (Pan et al., 1997; Tuomilehto et al., 2001).

Aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares desarrollados en estadios tempranos de la DMT2 que puedan promover el deterioro del corazón. El desconocimiento de los pacientes que poseen prediabetes o GAA imposibilita tener datos reales de la prevalencia de estos estadios. Por otro lado, agravando esta situación, no hay una conducta médica

específica desarrollada para el diagnóstico de prediabetes, sino que el diagnóstico se realiza de manera azarosa a través de la medida de glucemia para el control de la DM.

Finalmente, la prediabetes o GAA puede acompañarse de obesidad, dislipemia y/o hipertensión en lo que se conoce en conjunto como síndrome metabólico (MetS) (American Heart Association, 2016; Dommermuth & Ewing, 2018), complejizando el diagnóstico y tratamiento del paciente, y aumentan el riesgo a la progresión de DMT2 y CMD.

1.2. Fisiopatología diabética

La DMT2 es una enfermedad multiorgánica, ya que la glucosa es el metabolito más utilizado por el cuerpo humano. Durante el curso de esta enfermedad, dependiendo del progreso de la misma, pueden encontrarse glucemias muy altas junto con concentraciones de insulina elevadas o concentraciones de insulina muy bajas, generalmente cuando la enfermedad ha avanzado por varios años sin tratamiento.

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células β del páncreas frente al aumento de glucosa (su principal estímulo) en períodos postprandiales. La función hipoglucemiante de la insulina está dada debido a su acción en numerosos órganos. La glucosa es el principal estímulo para la síntesis y secreción de la insulina, pero no es el único; el aumento de glucagón, estímulos β -adrenérgicos, secretinas, entre otros también puede estimular a las células β pancreáticas (Cingolani, 2006).

El mecanismo de secreción de insulina en las células β pancreáticas es conocido y se describe en la **Ilustración 1.1**. Como muestra el esquema, el primer paso comienza con el aumento de glucosa, su captación y posterior glucólisis en la célula β , generando un aumento de ATP. El ATP producido provoca el cierre de canales de K^+ dependientes de ATP en la membrana plasmática de la célula, lo que produce un cambio en el potencial de membrana. El aumento de las cargas positivas y la despolarización de la membrana abren canales de Ca^{2+} voltaje-operados, promoviendo el ingreso de Ca^{2+} a la célula. Esto induce la salida de Ca^{2+} por el retículo endoplasmático (RE) que generará la movilización de las vesículas que contienen insulina, para su fusión en la membrana plasmática y consecuentemente, su secreción (Boron & Boulpaep, 2017; Cingolani, 2006).

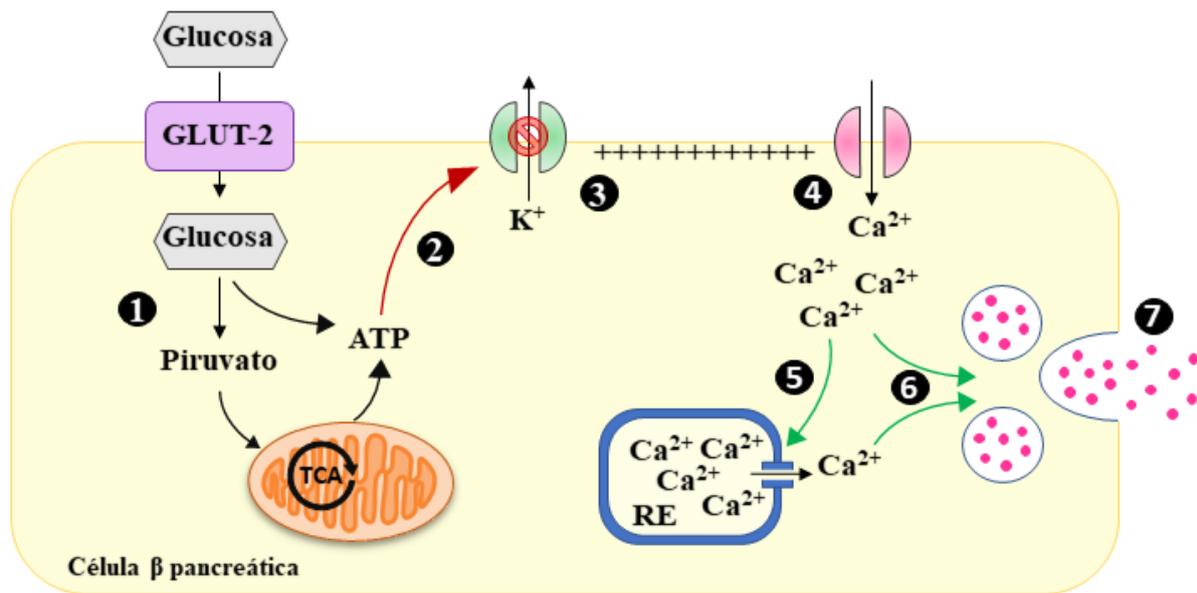


Ilustración 1.1. Esquema de la secreción de la insulina en la célula β pancreática.

En el esquema se muestran los pasos que ocurren para producir la liberación de insulina por las células β del páncreas: **1**, la glucosa ingresa a la célula β pancreática a través de los transportadores de GLUT-2 de la membrana, y se metaboliza a piruvato, a través de la glucólisis, generando ATP. **2**, el ATP inhibe los canales de K^+ dependientes de ATP. **3**, al no salir K^+ se acumulan cargas positivas dentro de la célula y se despolariza de la membrana celular. **4**, La despolarización de la membrana activa canales de Ca^{2+} operados por voltaje, generando el ingreso de Ca^{2+} a la célula. **5**, El Ca^{2+} activa la salida de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. **6**, Este Ca^{2+} activa la fusión y liberación de las vesículas de insulina.

Una vez en sangre, la insulina ejerce su acción en distintos órganos, teniendo como objetivo final el de reducir la glucemia y nutrir a las células con transportadores insulino-dependientes. Esto lo hace a través de facilitar y estimular la captación, almacenamiento y utilización de la glucosa sanguínea (Boron & Boulpaep, 2017; Cingolani, 2006).

Para la captación de glucosa en los tejidos, los transportadores más frecuentemente mencionados son los transportadores de difusión facilitada para hexosas (GLUT). Los GLUT pueden clasificarse según la afinidad por la insulina, y cada órgano según su función, expresa algún o algunos tipos particulares. Como se mostró en el esquema, en el páncreas las células β poseen GLUT-2, en el caso del corazón, mayormente se encuentran GLUT-1 y GLUT-4. El GLUT-2 presenta una alta capacidad para transportar glucosa con baja afinidad, lo que le permite funcionar como un sensor de la glucemia en las células β . GLUT-4 es un transportador de alta afinidad para la glucosa que se expresa fundamentalmente en tejido muscular estriado y tejido adiposo, y se conoce por ser insulino-dependiente; la insulina es capaz de inducir su translocación a la membrana (Bermúdez et al., n.d.).

Una vez que la glucosa es captada por los distintos órganos, la insulina promueve la utilización, estimulando la glucólisis, y el almacenamiento a través de la generación de compuestos como glucógeno en el hígado y músculo, y de triglicéridos en el hígado y tejido adiposo, que serán almacenados como fuentes de energía. Además, la insulina estimula la síntesis de proteínas en general, siendo considerada una hormona anabólica, y en particular de aquellas involucradas en el anabolismo de hidratos de carbono y lípidos (Boron & Boulpaep, 2017). Esto ocurre a través de las vías de señalización de fosfatidilinositol 3 quinasa (PIP3K) y la vía de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Reyes & Plancarte, 2008).

De esta forma, en presencia de insulino-resistencia, como ocurre en la DMT2, los tejidos insulino-dependientes no captan, ni utilizan o almacenan correctamente la glucosa. Deja de haber la misma cantidad de GLUT expresados en la membrana de las distintas células, lo que disminuye la captación de glucosa, y concomitantemente, no se estimulan las vías que generan el metabolismo y almacenamiento de esta. La ausencia de los procesos mencionados produce hiperglucemia, superando los valores adecuados, y generando daños en distintos órganos. La hiperglucemia afecta a los capilares sanguíneos, dañando el endotelio y el músculo liso, generando problemas microvasculares que son la base de la nefropatía, retinopatía y neuropatía, algunas de las complicaciones observadas de la DMT2. Además, también se ven dañados los grandes vasos, lo que genera complicaciones macrovasculares, caracterizadas por un grupo de trastornos que incluyen la aterosclerosis y la isquemia cardiaca. Cabe recordar que la hiperglucemia ha sido identificada como un factor de riesgo para padecer insuficiencia cardiaca independientemente de los efectos observados a nivel vascular, generando la CMD.

En los tejidos que captan glucosa independientemente de la insulina, la glucosa es captada y acumulada. El aumento de la glucosa intracelular también genera daño, ya que pueden activarse diferentes vías metabólicas que forman productos nocivos para la célula. Las principales vías metabólicas que generan daño a partir de la glucosa son; el aumento de AGEs (del inglés *advanced glycation end products*) que pueden aumentar glicaciones y glicosilaciones, aumento de la vía del sorbitol, que genera aumento de fructosa y disminución de NADPH, lo que a su vez genera estrés oxidativo por disminución en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), y aumento de la estimulación de factores como NF- κ B (del inglés *nuclear factor kappa beta*) que regulan la expresión génica (Díaz-Flores et al., 2004).

Por otro lado, pero no menos importante, debido a que muchos órganos no pueden captar glucosa, el cuerpo comienza a sufrir una situación similar a lo que ocurre en momentos de

ayuno prolongado, donde comienza a liberarse ácidos grasos (AG) almacenados en el tejido adiposo para suplir la demanda energética. Esto genera un aumento de AG libres, que también producen daño en diferentes órganos, ya sea por acumulación y peroxidación lipídica, y por aumento de estrés oxidativo, como por cambio a la utilización de AG como metabolito principal, lo que implica distinta eficiencia en la producción de energía (Battiprolu et al., 2010).

1.3. Metabolismo Cardíaco y Diabetes Mellitus

Los metabolitos principales para el corazón en condiciones fisiológicas son los AG libres (60-70 %), y la glucosa en menor medida, siendo esta más seleccionada en condiciones patológicas. Los AG libres provienen de la liberación por el tejido adiposo a la circulación, transportados por albúmina, o pueden provenir desde el intestino como quilomicrones o lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés *very-low-density lipoprotein*) (Stanley et al., 2005). El ingreso de los AG a los cardiomiocitos se produce principalmente por difusión y son metabolizados a través de la β -oxidación para la producción de ATP, necesaria para cada latido. Una vez dentro de la célula, los AG se activan a través de la incorporación de cofactor A (CoA) catalizado por la Acil-CoA sintetasa. Los Acil-CoA producidos pueden utilizarse para la síntesis de triglicéridos (TG), la formación de complejos lipoproteicos junto la apoproteína B y la proteína de transferencia de AG microsomal; o pueden ingresar en la vía catabólica que finaliza en la producción de ATP en la mitocondria. La vía catabólica y acumulación de AG pueden a su vez inhibir la glucólisis (Fillmore et al., 2014; Stanley et al., 2005). Uno de los motivos de la elección de los AG como metabolito principal es la eficiencia de producción de energía: según cálculos teóricos una molécula de palmitato (un AG considerado estándar que posee 16 carbonos) consume 46 moléculas de O_2 para producir 105 moléculas de ATP, mientras que la glucosa consume 12 moléculas de O_2 para producir 31 moléculas de ATP (Jaswal & Ussher, 2009). Estos datos presentan al menos dos hechos importantes, el primero es que efectivamente la utilización de AG libre (como el palmitato) es más eficiente, ya que del catabolismo de una sola molécula se produce mayor cantidad de ATP. El segundo hecho, es que este metabolito es el más eficiente sólo en condiciones fisiológicas de O_2 , ya que se necesitan consumir muchas más moléculas de O_2 para el catabolismo de palmitato que de glucosa. Dicho de otra manera, para producir la misma cantidad de ATP, el corazón necesita catabolizar más moléculas de glucosa, pero para ello utiliza menos O_2 , en comparación con palmitato. En situaciones patológicas, como puede ser la isquemia/reperfusión, el corazón cambia hacia el metabolismo

glucolítico, debido a que al haber bajas concentraciones de O₂ disponible, la glucosa comienza a ser más eficiente que los AG para la producción de ATP. Sin embargo, en el caso de la DM2 la situación se complejiza ya que al haber insulino-resistencia, el cambio a la utilización de glucosa se ve desfavorecido, y el corazón aumenta el porcentaje de captación y utilización de AG, que a su vez están más disponibles en el órgano, facilitando su oxidación (Carley & Severson, 2005).

Por otro lado, como se mencionó previamente, la catálisis de los ácidos grasos se produce a través de la β -oxidación, en donde los AG son oxidados sucesivamente hasta producir Acetil-CoA. Para comenzar la β -oxidación, como se observa en la **Ilustración 1.2**, los Acil-CoA son convertidos a Acil-Carnitina por la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1), localizada en la membrana externa mitocondrial. La actividad de la CPT-1 puede ser inhibida con el aumento de la concentración citosólica de malonaldeído, la cual se regula a su vez por la acción de dos enzimas: la Acetil-CoA carboxilasa que cataliza su formación, y la malonil-CoA decarboxilasa que lo degrada. La Acil-Carnitina es transportada por un transportador específico de Acil-Carnitina (CAT). Una vez dentro de la mitocondria, la Acil carnitina es reconvertida a Acil-CoA por la acción de la carnitina palmitoil transferasa 2 (CPT-2), en la membrana mitocondrial, para ser degradada luego vía β -oxidación. El Acetil-CoA generado de este modo, incrementa el poder reductor y la producción de ATP por medio del el ciclo de Krebs o de ácidos tricarbóxicos (TCA, del inglés *tricarboxylic acid*) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *oxidative phosphorylation*) (Fillmore et al., 2014).

Debido a que la utilización de AG inhibe a enzimas como la piruvato deshidrogenasa (PDH), también se inhibe la utilización de glucosa. Esto promueve la acumulación de glucosa generando más disturbios a nivel cardíaco.

Esta falla metabólica debida a la DM afecta directamente al corazón, uno de los órganos involucrados en una de las mayores causas de muerte en los pacientes diabéticos, como es la insuficiencia cardíaca.

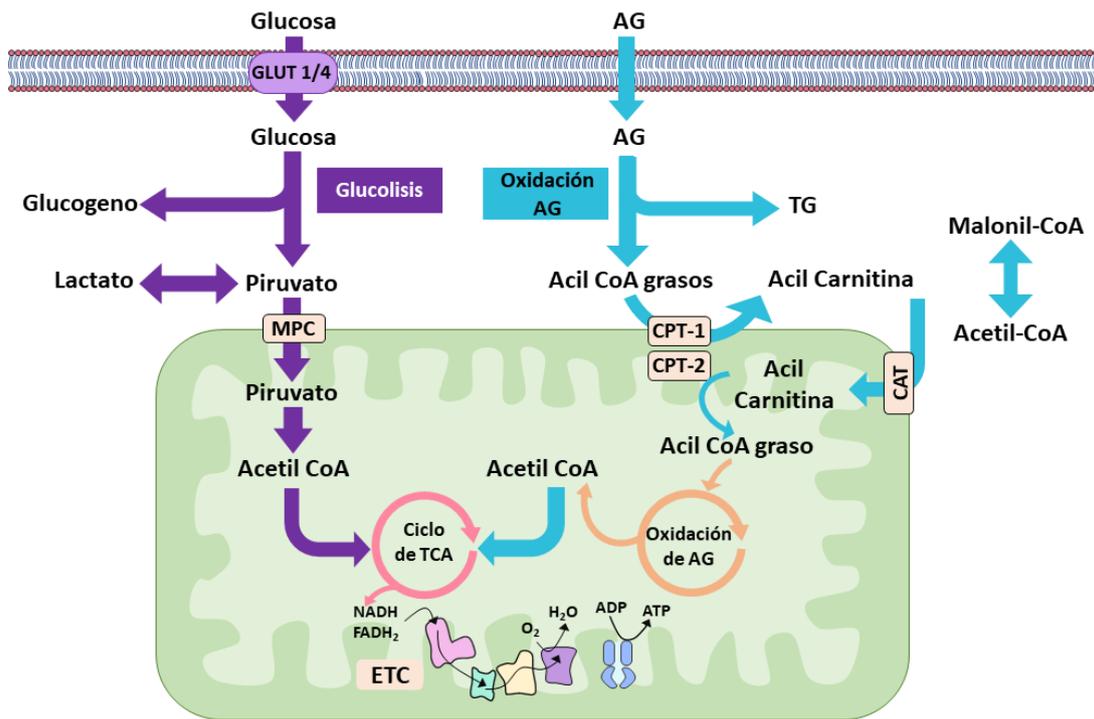


Ilustración 1.2. Esquema de la utilización de ácidos grasos libres y glucosa en el corazón.

Como se observa en el esquema, el corazón se abastece principalmente a través de ácidos grasos (AG), y en menor medida de la glucosa. Los AG son captados por los cardiomiocitos y pueden ser almacenados como triglicéridos (TG) o utilizados a través de la β -oxidación, mientras la glucosa puede almacenarse como glucógeno o utilizarse mediante la glucólisis. En un primer paso los AG forman Acil CoA grasos para ser convertidos en Acil Carnitina (por la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1)) y transportados hacia la mitocondria mediante el transportador de Acil-Carnitina (CAT). Una vez dentro de la mitocondria, los Acil CoA son convertidos a Acetil CoA grasos, por la acción de la enzima CPT-2, para ingresar en el ciclo de TCA. La glucólisis convierte la glucosa en piruvato, que ingresa a la mitocondria a través de MPC (del inglés mitochondrial pyruvate carrier), para ser convertido a Acetil CoA para ingresar al ciclo de TCA. El ciclo TCA utiliza el Acetil CoA para producir NADH y FADH₂ que será utilizado por la cadena transportadora de electrones (ETC, del inglés electron transport chain) para producir el ATP necesario para- la contracción.

A pesar del hecho de que la glucosa no es el metabolito principal en el corazón, las alteraciones del metabolismo glucolítico son de vital importancia en el desarrollo de la patogénesis de la CMD. En ratones transgénicos *db/db* (Hummel et al., 1966), que presentan una mutación en el gen que codifica para la leptina, la cual regula el peso corporal y el apetito entre otras funciones; se observó que prevenir la alteración del metabolismo de sustratos a través de la sobreexpresión perinatal del transportador de glucosa, GLUT-4, evita el desarrollo de disfunción cardiaca, lo cual sugiere la importancia de la modulación del metabolismo de la glucosa en el desarrollo de CMD (Semeniuk et al., 2002).

El incremento de la expresión de tioesterasas, enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de los ésteres de AG-CoA, se han propuesto como un mecanismo desarrollado durante la CMD que podrían contribuir con la patogénesis de la enfermedad, fomentando la oxidación de AG (Durgan et al., 2006).

Por otro lado, el incremento de la incorporación AG en el corazón diabético supera la oxidación de estos, promoviendo la acumulación lipídica en los cardiomiocitos. Esto genera otra complicación en la CMD, ya que el almacenamiento excesivo de lípidos promueve su peroxidación y aumento de ROS que conllevan a la insuficiencia cardiaca (Kankaanpää et al., 2006).

En estadios tempranos, previos a la DM manifiesta como ocurre en el corazón prediabético, no se conocen aún con exactitud cuáles son los mecanismos moleculares iniciales desarrollados para que finalmente se produzca la CMD.

1.4. Apoptosis cardiaca

La muerte celular es un proceso desencadenado en los distintos órganos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Puede ocurrir debido a efectos nocivos externos, en donde se genera daño tisular, o puede ser programada. La muerte celular programada, conocida históricamente como apoptosis, inicialmente se describió como una serie de eventos que se sucedían durante el desarrollo embrionario normal o para eliminar las células con mal funcionamiento o (Bibel & Barde, 2000). Estudios posteriores han demostrado que los distintos tipos de muerte celular descritos, como la necrosis, apoptosis, autofagia, necroptosis, entre otras, comparten ciertas partes de sus vías de señalización, ya sea sus iniciadores, moduladores o efectos finales (Nikoletopoulou et al., 2013). La apoptosis puede activarse por una vía intrínseca o una vía extrínseca, que activan un sistema de proteasas llamadas caspasas, que declinan en la fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos (Green, 2005). La necrosis es un tipo de muerte en donde el núcleo parece resistir a la degradación, pero la liberación de componentes del citoplasma al medio extracelular desencadena inflamación (Iyer et al., 2009). La autofagia, involucra la formación del autofagosoma, que luego se une con un lisosoma, en donde el contenido celular es degradado por hidrolasas, y es particularmente importante para mantener la homeostasis en células diferenciadas post-mitóticas como los cardiomiocitos y las neuronas (C. He & Klionsky, 2009). Tanto la apoptosis como la necrosis contribuyen con la pérdida de cardiomiocitos, y, por ende, con la pérdida de masa contráctil

del corazón, llevando a una función cardiaca defectuosa. La muerte por apoptosis será detallada en el **Capítulo 3**.

En el corazón, la muerte celular por apoptosis ha sido evidenciada como un evento patológico ocurrido durante el infarto agudo de miocardio, la falla cardiaca, y la CMD, entre otras patologías cardiovasculares (de Moissac et al., 2000; Frustaci Andrea et al., 2000; Prech et al., 2010). Sin embargo, no se conocen aún los mecanismos desarrollados que puedan desencadenar la muerte celular en estadios tempranos de la diabetes.

1.5. Acoplamiento excitación-contracción y cardiomiopatía diabética

El acoplamiento excitación-contracción (ECC) se describe como el proceso que relaciona la actividad eléctrica de un potencial de acción que llega al cardiomiocito y los eventos sucesivos que culminan en la contracción cardiaca. Para que se produzca el movimiento de los miofilamentos, se utiliza una gran cantidad de ATP, que es producido por las mitocondrias, lo que se conoce como acoplamiento de excitación-contracción y bioenergética (ECB, del inglés *excitation-contraction-bioenergetics*). Como muestra la **Ilustración 1.3**, cuando un PA se propaga por la membrana del cardiomiocito, produce la apertura de canales de Na^+ dependientes de voltaje, que cambian el potencial de membrana, despolarizándola, y generan la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L (LTCC, del inglés *L-type Ca^{2+} channel*) ubicados en el túbulo T. Al abrirse estos últimos ingresa Ca^{2+} al citosol del cardiomiocito y activa a los receptores de rianodina tipo 2 (RyR2) del retículo sarcoplasmático (RS), que se ubican en cercanía al túbulo T, generando una salida masiva de Ca^{2+} desde el RS hacia el citosol. Este proceso es denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, por sus siglas en inglés *Ca^{2+} -induce Ca^{2+} -release*) (Bers, 2001, 2002). El Ca^{2+} difunde hacia los miofilamentos para producir la contracción. Cuando el cardiomiocito se encuentra en reposo, previo a la contracción, la troponina I (TnI) se encuentra unida a la actina, anclando al complejo troponina T (TnT)-tropomiosina (Tm) que impide la unión de la cabeza de la miosina y desplazamiento de los miofilamentos. Al liberarse Ca^{2+} mediante la CICR, éste se une a la troponina C (TnC) ubicada junto a la TnI, lo que genera un movimiento del complejo TnT-Tm, dejando libre al sitio de la actina necesario para interactuar con la cabeza de la miosina y producir el deslizamiento de los miofilamentos. La cabeza de la miosina previamente debe haber hidrolizado ATP, produciendo ADP y fosforo inorgánico (Pi), los cuales se liberan cuando la cadena de miosina se desplaza moviendo los miofilamentos y retornando a su posición basal.

El ATP producido por la mitocondria es un mediador necesario tanto para la contracción como para la apertura de bombas dependientes de ATP como la SERCA (del inglés *Sarco/Endoplasmic Ca²⁺-ATPasa 2a*) y la Na⁺/K⁺ ATPasa, entre otras. La producción de ATP será descrita extensamente en el **Capítulo 6**.

Una vez que finaliza la contracción, el Ca²⁺ debe ser extraído del citosol para dar lugar a la relajación. El mayor porcentaje de Ca²⁺ es retomado por la bomba SERCA2a, regulada por fosfolamban (PLN, del inglés *phospholamban*) hacia el RS, un menor porcentaje es extruido del cardiomiocito por el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX), y en menor medida el Ca²⁺ es captado por la mitocondria por el transportador de Ca²⁺ (MCU) y extruido de la célula por la bomba ATPasa de Ca²⁺ (**Ilustración 1.3**). A su vez, cada canal de Ca²⁺ se encuentra sumamente regulado, por una variedad de enzimas citosólicas que se ven modificadas en estados fisiológicos y patológicos como son las proteínas quinasas A, C, G (PKA, PKC y PKG respectivamente, del inglés *protein kinase A, C o G*), y la quinasa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina (CaMKII, del inglés *Ca²⁺/Calmodulin kinase II*), entre otras. Las regulaciones de los canales involucrados en el ECC se describirán en profundidad en el **Capítulo 4**.

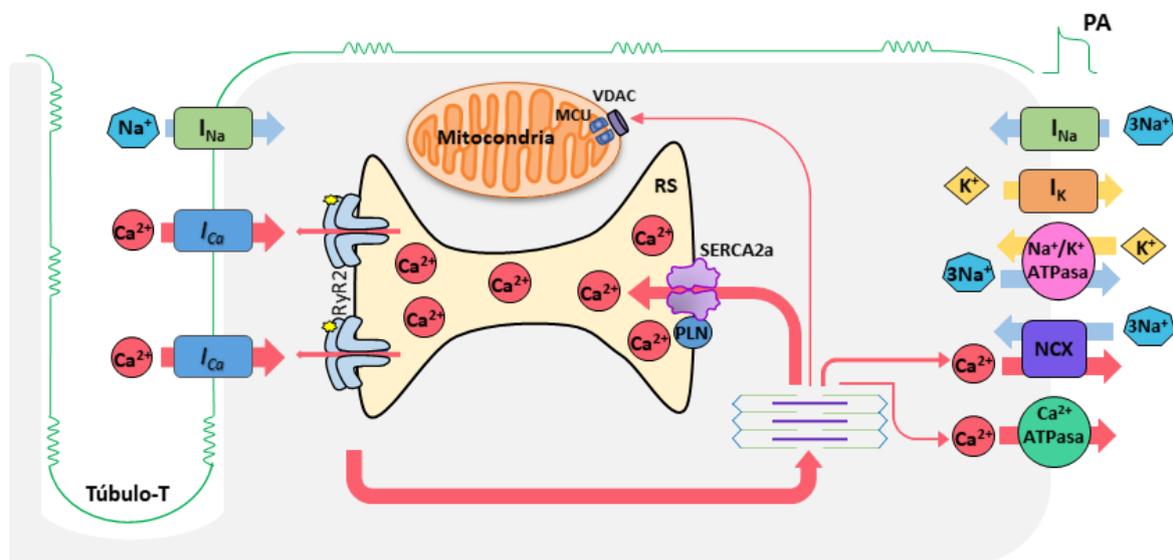


Ilustración 1.3. Esquema del acoplamiento de excitación-contracción.

Esquema representativo de los eventos que ocurren durante el acoplamiento excito-contráctil (ECC) modificado de Federico et al. (Federico et al., 2020). Cuando PA alcanza al cardiomiocito, se abren canales de Na⁺ operados por voltaje (I_{Na}), que a su vez abren los LTCC (canales de Ca²⁺ tipo L), lo que generan la entrada de Ca²⁺ al citosol. Este Ca²⁺ activa a los receptores de rianodina (RyR2) del retículo sarcoplasmático (RS) que liberan Ca²⁺ de forma masiva que se dirige a los miofilamentos para producir la contracción (flecha roja). Una vez que finaliza el evento mecánico, el Ca²⁺ es retomado en mayor medida por la SERCA2a (*Sarco/endoplasmic reticulum ATPase 2a*), en menor proporción extruido por el

NCX (intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), y en menor medida aún por el transportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) y la bomba de Ca^{2+} del sarcolema (Ca^{2+} ATPasa). Los transportadores de Na^+ , K^+ y la bomba Na^+/K^+ participan en mantener la homeostasis iónica celular.

Específicamente en la DM manifiesta se han descrito alteraciones a nivel del ECC que afectan al cardiomiocito, siendo la base de los mecanismos moleculares que conllevan a insuficiencia cardíaca. Algunos de los estudios realizados en modelos de diabetes demostraron que hay alteraciones en las corrientes de K^+ , que participan en la repolarización y generan un alargamiento del potencial de acción (Jourdon & Feuvray, 1993), alteraciones en las liberaciones Ca^{2+} (Yaras et al., 2005), y cambios en la actividad del NCX (Chattou et al., 1999), entre otras. En conjunto estas alteraciones generan la disfunción contráctil descrita en los corazones diabéticos (Lebeche et al., 2008). Sin embargo, el origen de estas alteraciones en estadios tempranos de la DMT2 se desconoce.

1.6. Enzima Ca^{2+} Calmodulina quinasa II y cardiomiopatía diabética

La enzima CaMKII (enzima dependiente de Ca^{2+} y calmodulina quinasa tipo II) es una fosfoquinasa serina/treonina, que responde a los cambios en el Ca^{2+} , el ion más importante para la contractilidad en el corazón (Jett et al., 1987). Esta enzima puede presentarse como 4 isoformas, CaMKII α , β , γ , y δ : CaMKII α y β se expresan en tejido nervioso, y CaMKII γ y δ , son más ubicuas, siendo la isoforma δ es la predominante en el corazón (Gaertner et al., 2004; Maier & Bers, 2002).

La enzima CaMKII se expresa en el miocardio en condiciones fisiológicas, y se encuentra modulando varias proteínas del ECC (Maier & Bers, 2007). En condiciones patológicas, se ha descrito hiperactiva y asociada a efectos deletéreos. Dentro de las proteínas que participan en el ECC, se ha visto que CaMKII puede fosforilar al RyR2 (Witcher et al., 1991), específicamente en el sitio serina 2814 (Ser²⁸¹⁴ o S2814), a PLN (Davis et al., 1983; Simmerman et al., 1986) en el sitio treonina 17 (Thr¹⁷ o T17), y al LTCC (Maier & Bers, 2007), lo que puede acelerar el ciclado de Ca^{2+} . También se ha evidenciado actividad sobre transportadores de membrana que participan en el potencial de acción, pudiendo enlentecer o acelerar el mismo (Wagner et al., 2006).

En la CMD hay estudios que presentan a CaMKII como posible mediador de los eventos patológicos que se producen en la DM, incluso se han descrito glicosilaciones relacionadas

con la activación de la enzima, que luego puede auto fosforilarse y continuar modulando proteínas (Hegyi et al., 2019).

En el modelo de prediabetes, en estudios previos del grupo de trabajo, se encontró que esta enzima se encuentra hiperactiva debido a un aumento de los ROS, colaborando con la alteración del manejo del Ca^{2+} desencadenando finalmente arritmias cardiacas (Sommese et al., 2016).

Por otro lado, se ha descrito que la enzima CaMKII puede fosforilar otros blancos que no se encuentran directamente relacionados con el ECC, afectando otras organelas como puede ser la mitocondria (Joiner et al., 2012). El manejo de Ca^{2+} mitocondrial adecuado es fundamental para la homeostasis celular, como se describirá posteriormente, y CaMKII se ha visto involucrada en modular al MCU, el principal transportador de Ca^{2+} descrito para la mitocondria (Fieni et al., 2014).

En este contexto, evaluar el rol de la enzima CaMKII en la apoptosis del corazón prediabético y las alteraciones en el manejo de Ca^{2+} es uno de los objetivos de estudio, ya que posiblemente pueda facilitar o modificar varios de los eventos producidos en la cascada de señalización.

1.7. Función mitocondrial en el corazón y cardiomiopatía diabética

Las mitocondrias son las organelas encargadas de producir el ATP necesario para la contracción cardiaca y otras funciones celulares. Debido a su función, el corazón posee altos requerimientos de ATP, que en condiciones basales son producidos a través de la oxidación de AG como se describió previamente. En condiciones patológicas como en la DM y prediabetes, donde el metabolismo se encuentra alterado y se presenta insulino-resistencia en muchos órganos, el corazón suple su demanda de ATP casi exclusivamente de la oxidación de AG. Debido a que los niveles de AG libres en sangre son elevados en estas condiciones, además de ser utilizados por el corazón puede acumularse en el miocardio. Debido a que parte de la oxidación de AG es llevado a cabo en las mitocondrias para obtener NADH para la producción de ATP, la sobrecarga de AG en el miocardio puede afectar a la organela. Es así que durante la CMD, el uso exclusivo de AG sobrecarga las mitocondrias, las somete a estrés oxidativo y consecuentemente se genera daño mitocondrial (Anderson et al., 2009).

Por otro lado, la producción de ATP se encuentra relacionada con la producción de ROS. En condiciones fisiológicas los ROS son utilizados como moléculas mediadoras o señalizadoras, pero pueden generar daño mitocondrial y celular si no se encuentran balanceadas con los

mecanismos reductores, ya que se genera estrés oxidativo (Kohlhaas et al., 2017). A su vez, el Ca^{2+} modula la producción de ATP y de ROS, ya que 3 enzimas del ciclo de TCA (2-oxoglutarato deshidrogenasa, PDH, y NAD^+ -isocitrato deshidrogenasa) son dependientes de Ca^{2+} (Brookes et al., 2004). Es decir, la relación ATP-ROS- Ca^{2+} en condiciones fisiológicas se encuentra estrictamente regulada, y el cambio en alguno de estos mediadores, afecta a los demás (Brookes et al., 2004). A su vez, la morfología de las mitocondrias está directamente relacionada con su función y puede alterar la tasa de producción de ATP y ROS (Kane & Youle, 2010). Es así como, la función y morfología mitocondrial pueden estar alteradas en el corazón prediabético, facilitando el desarrollo de los mecanismos moleculares relacionados a la patogénesis de la enfermedad en el corazón.

1.8. Construcción de la hipótesis de trabajo y objetivos

La DM es una patología extremadamente frecuente en todo el mundo, que genera un incremento del alto riesgo cardiaco y muerte por causas cardiovasculares. Si bien esta patología posee tratamiento farmacológico que apunta a disminuir los niveles de glucemia para evitar el riesgo microvascular y de órgano blanco, una vez que la DM se encuentra establecida, gran parte del daño ya se ha producido. En este sentido, abordar estadios tempranos de la DM como es la prediabetes en donde ya hay cambios leves pero consistentes de la glucemia, es una forma de prevenir el desarrollo a la DM y la posterior CMD. Estudiar la prediabetes implica encontrar los cambios que originan y participan de la patogénesis de la enfermedad establecida. Conocer los eventos moleculares iniciales de la enfermedad es esencial para entender el desarrollo de la misma, y de esta manera abordar estrategias terapéuticas de forma temprana en los pacientes para prevenir el progreso hacia una CMD consolidada.

A su vez, como mencionamos anteriormente, el ion Ca^{2+} tiene un rol primordial en el corazón, no sólo porque es necesario para producir la contracción del cardiomiocito, sino también porque es modulador de múltiples enzimas encargadas de la producción de energía y regulación de diferentes procesos, entre ellos la apoptosis celular, pudiendo activar cascadas de señalización deletéreas.

En este contexto, planteamos como hipótesis que en el estadio de prediabetes ocurre apoptosis en el corazón debido a pérdidas de Ca^{2+} desde el RS. Este manejo de Ca^{2+} alterado, afecta la comunicación del RS con la mitocondria, generando cambios funcionales y estructurales en las mismas, participando de los mecanismos que

desencadenan la apoptosis. Estas alteraciones se deben a la hiperactividad de la enzima CaMKII.

Para comprobar la hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos específicos (O.E):

O.E.1: Comprobar que se produce apoptosis en el corazón de los ratones prediabéticos.

O.E.2: Comprobar que el manejo del Ca^{2+} citosólico se encuentra alterado en los cardiomiocitos de ratones prediabéticos.

O.E.3: Comprobar que los ratones prediabéticos presentan remodelado cardíaco producido por la dieta rica en fructosa, que determina una alteración en la comunicación RS-mitocondria.

O.E.4: Comprobar que se producen cambios a nivel mitocondrial producidos por la dieta rica en fructosa, tanto en su función y metabolismo como en su morfología.

O.E.5: Determinar el rol de los ROS y la enzima CaMKII en la cascada apoptótica.

Los antecedentes y el estado actual de cada tema serán abordados en su respectivo capítulo. En el **Capítulo 2** se describirá el modelo elegido para el estudio de estadios tempranos de la DM, sus beneficios y limitaciones, junto con los experimentos realizados para la caracterización del mismo. En el **Capítulo 3**, se detallarán los mecanismos de muerte celular por apoptosis conocidos en el corazón, los abordajes realizados para evaluar la apoptosis celular en el tejido cardíaco de animales prediabéticos y los resultados obtenidos con dichos experimentos. En el **Capítulo 4** se detallará el manejo de Ca^{2+} en condiciones fisiológicas en los cardiomiocitos, junto con los experimentos realizados y resultados obtenidos para evaluar el manejo de Ca^{2+} en los animales prediabéticos. En el **Capítulo 5**, se mostrará la ultraestructura del tejido cardíaco y su afectación en los corazones prediabéticos a partir del análisis de imágenes de microscopía de transmisión electrónica (MET). En el **Capítulo 6** se introducirá la fisiología mitocondrial, cómo participa esta organela en el funcionamiento de los cardiomiocitos y como se encuentra involucrada en las alteraciones producidas en el corazón prediabético. En el **Capítulo 7** se presentará la estructura y función de la enzima CaMKII en la fisiología cardíaca y su participación en la patogénesis de los mecanismos deletéreos que se producen en el corazón prediabético. Por último, en el **Capítulo 8** se discutirán en conjunto los resultados obtenidos, considerando los beneficios de estos y las limitaciones de los estudios y métodos utilizados.

Capítulo 2. Modelo de prediabetes: Dieta rica en fructosa

2.1. Introducción

Las enfermedades metabólicas pueden clasificarse como cualquier trastorno causado por la interrupción del uso normal de los compuestos que el cuerpo utiliza para obtener energía, entre los que se encuentra la glucosa, y pueden dividirse en tres tipos según su gravedad o desarrollo; prediabetes, síndrome metabólico (MetS) y DM. El MetS se diagnostica cuando un individuo muestra al menos tres de los siguientes factores de riesgo: aumento de la presión arterial, hiperglucemia, dislipidemia y obesidad abdominal (American Heart Association, 2016; Dommermuth & Ewing, 2018). La prevalencia y su incidencia en todo el mundo se asocia linealmente con el grado de obesidad y sobrepeso (Saklayen, 2018). Debido a que los factores de riesgo que definen el MetS afectan individualmente la función cardiovascular, los pacientes con MetS tienen un mayor riesgo cardiovascular en comparación con los pacientes que presentan una de las co-morbilidades aislada (Grundy et al., 2004). Por su lado, como se mencionó previamente, la TGA y la GAA son estados generalmente asociados con la prediabetes. Los pacientes con prediabetes o MetS sin cambios en sus hábitos alimenticios y en la actividad física, desarrollarán DMT2 (American Diabetes Association, 2020). El diagnóstico de la prediabetes puede realizarse mediante las mismas pruebas utilizadas normalmente para el diagnóstico y seguimiento de la DMT2 (glucemia en ayunas, hemoglobina glicosilada y test de tolerancia oral a la glucosa o TTOG) pero utilizando un valor de corte diferente (*Tabla 2.1*). Sin embargo, debido a que la prediabetes es clínicamente silenciosa, su detección suele ser aleatoria, lo que conlleva a que el paciente evolucione a una afección más grave. Cabe recordar que en la Argentina, si el paciente presenta GAA sin otros factores de riesgo, no se consideran prediabéticos, ya que estos pacientes no siempre desarrollan DMT2 manifiesta (Gagliardino et al., 2007).

| | NORMAL | PREDIABETES | DIABETES |
|--------------------|-------------|-----------------|-------------|
| Glucemia en ayunas | < 100 mg/dL | 100 – 126 mg/dL | > 126 mg/dL |
| TTOG | < 140 mg/dL | 140 – 200 mg/dL | > 200 mg/dL |
| A1C | < 5.7 % | 5.7 – 6.5 % | > 6.5 % |

Tabla 2.1. Pruebas diagnóstico de diabetes mellitus.

*Pruebas utilizados para el diagnóstico de diabetes mellitus y sus valores de corte según la American Diabetes Association, 2019 (American Diabetes Association, 2019). **TTOG**: test de tolerancia oral a la glucosa, **A1C**: hemoglobina glicosilada.*

Para estudiar las enfermedades metabólicas existen modelos animales donde la glucemia se encuentra alterada sin otros factores de riesgo relevantes (como obesidad e hipertensión) y modelos que presentan tanto alteraciones de la glucemia, como otras co-morbilidades que pueden tener su propio efecto en el corazón. Los modelos de las distintas condiciones metabólicas pueden ser tan variados como efectos se puedan buscar, sin embargo, hay algunos más estandarizados y utilizados frecuentemente, por lo tanto, se consideran validados para el estudio de estas patologías. La **Tabla 2.2** muestra un resumen de los modelos más frecuentemente usados para el estudio de enfermedades metabólicas. Entre ellos, hay modelos utilizados para simular la prediabetes, otros que compilan las alteraciones que definen el MetS, y otros que se describen como modelos de DMT1 o DMT2.

En cuanto a la DM en particular, hay una variedad de modelos animales donde la principal diferencia radica en si representa un modelo de DMT1 o DMT2, y si este fue generado por una dieta, una droga o a través de un animal transgénico. Para evaluar la DMT1 el modelo más utilizado es la inducción de la destrucción de células β pancreáticas mediante una inyección de estreptozotocina (STZ, del inglés *streptozotocin*) (McNeill, 2018). A pesar de que la STZ ha sido criticada por causar efectos inespecíficos, sigue siendo el modelo más frecuente elegido para el estudio de DMT1. Para la DMT2 se utilizan animales transgénicos o distintas dietas ricas en grasas o azúcares, siendo estos modelos más similares a lo que ocurre en el desarrollo de la DMT2 en pacientes.

Al tratar con estas patologías debe tenerse sumo cuidado en la elección del modelo de estudio, ya que existe una línea difusa entre DMT2, MetS y prediabetes, dado que todas están estrechamente relacionadas, siendo la DM el punto de confluencia común en función del tiempo de evolución. A medida que se avanza en el desarrollo de la enfermedad, las co-morbilidades aumentan, complicando la interpretación de los resultados.

En una gama amplia de estudios se han utilizado los animales transgénicos *ob/ob* y *db/db*, que presentan una mutación en el gen de la leptina y en el gen del receptor de leptina, respectivamente (**Tabla 2.2**), como modelo de DMT2 ya que muestran hiperinsulinemia e hiperglucemia (Han et al., 2017; Lee et al., 2018). Sin embargo, no debe perderse de vista que en estos animales también se genera obesidad e hiperlipidemia, característica a la ineficacia de la acción de la leptina, lo que influye en el riesgo cardiovascular. La obesidad representa una sobrecarga para el corazón que no debe menospreciarse, y debe separarse de las alteraciones de los cardiomiocitos *per se*.

Como se mencionó anteriormente, otra alternativa para estudiar la DMT2 que se ha utilizado mucho en los últimos años se basa en una dieta alta en grasas (HFD) (J. Li et al., 2020; Namekawa et al., 2017; Surwit et al., 1988), donde los animales son obesos y desarrollan DM. Recientemente se ha utilizado como modelo de DMT2 la HFD más una dosis baja de STZ (X.-X. Guo et al., 2018). Los modelos genéticos de DMT2 tienen la ventaja de poder ser utilizados en edades tempranas, sin embargo, los modelos llevados a cabo por diferentes dietas occidentales son más representativos de la enfermedad que sucede y evoluciona en los pacientes.

| Modelos | Tipo | Descripción | ↑PA | Dislipemia | Obesidad | Representa | Referencia |
|-----------------|--------------|---|-----|------------|----------|------------|--|
| DRF 10% | Dieta | 10% de fructosa en el agua de bebida por 21 días | ✗ | ✓ | ✗ | TGA | (Felice et al., 2014; Francini et al., 2010) |
| DRF 60% | Dieta | 60% de fructosa en el agua de bebida por 24 semanas | ✗ | ✗ | ✗ | TGA | (Szűcs et al., 2019) |
| HFD + STZ | Dieta | HFD + 1 inyección de STZ (25-35 mg/kg/día) | ✗ | ✓ | ✓ | MetS/DMT2 | (Fang et al., 2018; X.-X. Guo et al., 2018) |
| STZ | Inyección | 5 inyecciones consecutivas de STZ (50 mg/kg/día) | ✗ | ✗ | ✗ | DMT1 | (Deshwal et al., 2018) |
| Zucker Diabetic | Mutación | Mutación espontanea en el gen de la leptina | ✓ | ✓ | ✓ | DMT2 | (Zucker, 1965) |
| Goto Kakizaki | Mutación | Ratas espontáneamente diabéticas | ✗ | ✓ | ✗ | DMT2 | (Goto et al., 1988) |
| <i>ob/ob</i> | Transgénicos | Mutación en el gen de la leptina | ✗ | ✓ | ✓ | MetS/DMT2 | (Dubuc, 1976), (Ingalls et al., 1950a) |
| <i>db/db</i> | Transgénicos | Mutación en el receptor de leptina | ✗ | ✓ | ✓ | DMT2 | (Hummel et al., 1966) |

Tabla 2.2. Modelos más frecuentemente utilizados para el estudio de enfermedades metabólicas.

HFD: dieta alta grasas o high-fat diet, **STZ:** estreptozotocina, **DRF:** dieta rica en fructosa, **TGA:** tolerancia a la glucosa alterada, **MetS:** síndrome metabólico, **DMT1:** diabetes mellitus tipo 1, **DMT2:** diabetes mellitus tipo 2.

La decisión de qué modelo utilizar y el análisis de los resultados en dicho modelo debe realizarse con cuidado, teniendo en cuenta que la prediabetes, MetS y DMT2 presentan diferencias y similitudes que podrían interferir en la interpretación de los resultados y objetivos del estudio.

En nuestro caso, elegimos utilizar la dieta rica en fructosa (DRF), debido a los beneficios que posee en comparación con otros modelos. Particularmente, como se menciona en los **2.2. Materiales y Métodos**, la DRF es un modelo ya caracterizado en el grupo de trabajo del laboratorio y por otros laboratorios (Felice et al., 2014; Francini et al., 2010; Sommese et al., 2016), que sólo presenta TGA, sin comorbilidades asociadas. Por otro lado, en este modelo los animales desarrollan TGA en un período corto de tiempo (21 días), con una dieta de fácil administración y que presenta alteraciones que no fueron descriptas anteriormente en un período tan acotado. Esto no solo tiene la ventaja de generar un modelo de prediabetes de forma eficaz y rápida, sino que también nos permite estudiar el efecto de la TGA en el corazón en un estadio particularmente temprano, aislado de otras complicaciones y comorbilidades, previo al desarrollo de la DM, para poder así evaluar la prevención del desarrollo de la CMD.

En este capítulo caracterizaremos el modelo de la DRF, y mostraremos los resultados que lo validan como modelo de prediabetes.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Manejo de animales

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (“*The Guide for Care and Use of Laboratory Animal*”, NIH publicación No.85-23, revisada en 2011), y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). CICUAL no. P03-02-2017.

2.2.2. Modelo Animal

Para estos experimentos fueron utilizadas distintas cepas de ratones macho transgénicos con su correspondiente cepa salvaje (WT, del inglés *wild type*). Para evaluar la importancia del rol de CaMKII en los corazones prediabéticos, se utilizaron cepas transgénicas que poseen distintos tipos de inhibición para esta enzima:

S2814A: la secuencia codificadora de la mutación S2814A fue insertada en el exón 56 de la secuencia codificadora de los RyR2, para generar los ratones RyR2 S2814A *knock-in*. En estos ratones el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2, el sitio blanco de CaMKII, está mutado a alanina por lo que la enzima no puede fosforilarlo. La cepa WT utilizada como control de estos animales fue C57 bl/6 (Chelu et al., 2009).

SRAIP: expresan una secuencia codificadora para el péptido AIP (KKALRRQEAVDAL), que es un inhibidor específico de CaMKII. Esta secuencia es acompañada por una secuencia FLAG-epítoto marcadora, junto con la expresión de un gen sintético que codifica para un dominio transmembrana truncado de PLN (del aminoácido 23-52) donde los AA 31 y 43, fueron cambiados a alanina (L31A y N34A) para que pierda la función inhibidora sobre SERCA2a. Esta última secuencia se utiliza para dirigir el péptido inhibidor al RS, es decir, la acción de CaMKII se ve inhibida en todas sus proteínas blanco del RS. Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c como controles WT (Ji et al., 2003).

AC3I: animales transgénicos que poseen insertado en su genoma un mini-gen que codifica para la expresión de un péptido inhibidor (AC3I) de CaMKII acoplado a la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *green fluorescence protein*). Como cepa WT se utilizaron ratones C57 bl/6 o ratones transgénicos que presentan en su genoma un gen que codifica la expresión de un péptido inactivo (AC3C) acoplado a GFP (R. Zhang et al., 2005).

Todas las cepas de ratones fueron divididas en dos grupos: un grupo control (DC) y un grupo tratado con DRF. Ambos grupos se alimentaron con una dieta de alimento balanceado estándar, al grupo DC se le dio de beber agua potable *ad libitum*, y al grupo DRF se les dio de beber agua potable suplementada con un 10% de fructosa *ad libitum* por 21 días (Francini et al., 2010). Además de los tratamientos DC y DRF, para los animales WT y SRAIP se generó un tercer grupo DRF + T (DRF + Tempol), al que además de DRF se le suplementó el agua de bebida con Tempol, un secuestrador de ROS.

Antes y después del tratamiento los animales fueron pesados y se les realizó un examen ecocardiográfico. Luego del sacrificio de los animales, se pesó el corazón y se midió la longitud de la tibia.

2.2.3. Modelo Celular

Se utilizó un modelo celular para realizar experimentos *in vitro* que soporten los experimentos realizados en modelos animales.

Células HEK293-RyR2 inducibles: Las células embrionarias de riñón humano (HEK293)-RyR2 inducibles, no expresan naturalmente RyR2, pero puede inducirse su expresión al exponerlas a tetraciclina. Estas células fueron cultivadas en un medio Dulbecco Eagle modificado (100 mg/dL; *Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) suplementado con 10 % suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina en placas de cultivo de 100 mm. La expresión de los RyR2 fue inducida con 1 µg/ml de tetraciclina en el medio de cultivo (Helms Adam S. et al., 2016).

Las células se mantuvieron en un medio con concentración de glucosa normal (GN, 100 mg/dL; *Life Technologies*) o glucosa alta (GA, 450 mg/dL, *Life Technologies*) y se les agregó 1 µM KN-93 (*Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, USA*) para inhibir a la enzima CaMKII o su análogo inactivo KN-92 (*Calbiochem, Billerica, MA, USA*) como control. 48 horas después de la inducción y la incubación en los diferentes medios, las células se lavaron con PBS, y se tomaron del cultivo para resuspender en 200 µl de buffer de lisis (25 mM Tris, 137 mM NaCl, 1% CHAPS, 0.5% fosfatidilcolina de yema de huevo (*Sigma, St Louis, MO, USA*), 2.5 mM ditiotreitól, e inhibidores de proteasas (2 µM leupeptina, 100 µM PMSF, 500 µM benzamidina, 100 nM aprotinina, pH = 7.4). Los lisados se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

2.2.4. Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa

Para caracterizar el modelo de prediabetes se realizaron test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (TIpG). Los animales fueron ayunados por un período de 8 horas, y se les midió la glucemia plasmática tomando una gota de sangre de la vena de la cola, utilizando los medidores de glucemia *Accu Check*. Este procedimiento fue realizado una vez previa (Glucosa basal o Glucemia en ayunas) a la administración de un bolo intraperitoneal de glucosa (1 mg/Kg peso corporal), y a los 10, 30, 90 y 120 minutos posteriores a la inyección. Con estas medidas se graficó y calculó el área bajo la curva (ABC) para evidenciar si los animales poseían TGA.

2.2.5. Medida de tejido adiposo corporal

Hace unos años el tejido adiposo dejó de considerarse como una fuente de energía y depósito de lípidos únicamente, para pasar a tener un rol endócrino en el organismo (Kershaw & Flier, 2004; Ronti et al., 2006). Es así como la medida de tejido adiposo es un parámetro de utilidad en las patologías metabólicas, ya que presenta implicancia en el desarrollo y respuesta de cada órgano en cada nuevo estado metabólico. Por este motivo, se realizó la medida del peso del tejido adiposo.

Para la extracción de los distintos tipos de tejido adiposo, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y se prosiguió con la apertura del abdomen para visualizar los órganos y tejido adiposo abdominal (**Figura 2.1**). La primera incisión fue realizada de forma de que quede expuesto el epidídimo para tomar el tejido adiposo blanco (TAB) epididimario que se encuentra rodeando los testículos y el epidídimo (marcados con un asterisco rojo en la **Figura 2.1**). Para medir el TAB subcutáneo se retiraron ambas paredes anterolaterales del abdomen, se extrajo la capa más interna de tejido conectivo, y por debajo de la misma se encontró y extrajo la capa de TAB subcutáneo. Una vez hecho esto, se movieron hacia un lado los órganos abdominales anteriores para visualizar los órganos retroperitoneales, de donde se obtuvo el TAB peri-renal que rodea ambos riñones (marcados con un asterisco verde en la **Figura 2.1**). En el dorso del cuerpo del ratón, por encima de las escápulas se ubica una pequeña cantidad de TAB y tejido adiposo pardo (TAP). Se retiró la piel de la parte superior del dorso a la altura de las escápulas para tomar el TAB supraescapular, y posteriormente se extrajo el TAP subescapular. Todos los tejidos adiposos extraídos se pesaron y normalizaron por el peso corporal del ratón.

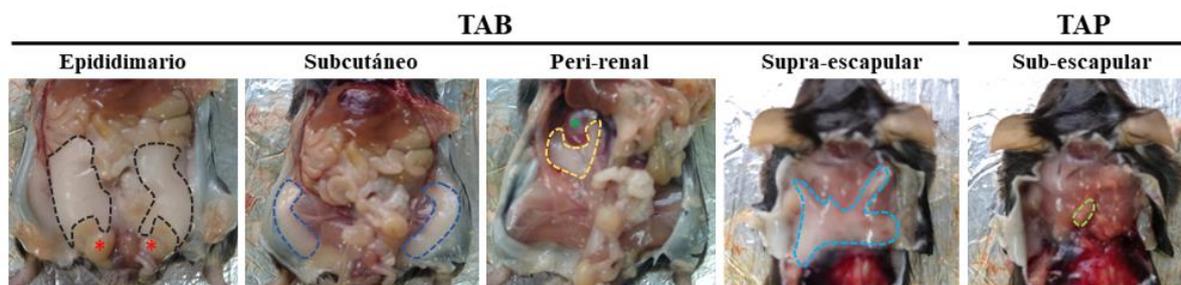


Figura 2.1. Clasificación de los distintos tipos de tejido adiposo.

Tejido adiposo blanco epididimario (línea punteada negra), subcutáneo (línea punteada azul), peri-renal (línea punteada amarilla), supraescapular (línea punteada celeste) y, tejido adiposo pardo subescapular (línea punteada verde). **TAB**: tejido adiposo blanco, **TAP**: tejido adiposo pardo. Para una mejor orientación del abdomen del ratón, los * rojos marcan los testículos, y el * verde marca el riñón derecho.

2.2.6. Ecocardiografía

Se realizaron ecocardiografías para evaluar la función cardíaca, usando un transductor lineal de 14 MHz (*Toshiba Nemio XG, Tokio, Japón*) en modo M2 dimensiones (Sahn et al., 1978). Se realizaron medidas consecutivas de tres ciclos cardíacos. Todas las mediciones, incluyendo dimensiones diastólicas, espesor de pared ventricular izquierda y diámetros del ventrículo izquierdo fueron realizadas según el método establecido por la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Lang et al., 2005).

La masa ventricular izquierda fue calculada a través de la ecuación:

$$MVI = 1,04 \times [(DDVI + GDS + GPPD) \times 3 - (DDVI \times 3)]$$

donde DDVI corresponde al diámetro diastólico del ventrículo izquierdo, GDS al grosor diastólico del septum y GPPD al grosor de la pared posterior en diástole (Caiani et al., 2006).

El índice de masa ventricular izquierda (IMVI) fue calculado dividiendo la masa ventricular izquierda por el peso del animal (en gramos) o por la longitud de la tibia (en milímetros). La fracción de acortamiento endocárdico porcentual (FA%) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$FA\% = \left[\frac{((DDVI - DSVI) \times 100)}{DDVI} \right]$$

donde DDVI corresponde al diámetro diastólico del ventrículo izquierdo y DSVI corresponde al diámetro sistólico del ventrículo izquierdo.

2.3. Resultados

2.3.1. Parámetros metabólicos

Para caracterizar el modelo de la DRF se midió el consumo calórico de los animales. Esto se realizó mediante la medida del consumo de alimento balanceado y bebida por día. El alimento balanceado aporta 2,8 Kcal/g, mientras que el aporte calórico de la fructosa es de 4 Kcal/g, es decir 400 Kcal/L en la dieta utilizada. Esto implica que un aumento en el consumo de bebida genera una mayor ingesta de kilocalorías por día. Como se observa en la **Tabla 2.3**, los ratones WT alimentados con la DRF consumieron más bebida y disminuyeron su ingesta de alimento respecto de los animales con DC. Este balance les permitió obtener finalmente una mayor ingesta de kilocalorías por día. Sin embargo, como se muestra más adelante en la **Tabla 2.4**, esto no se acompañó de un aumento de peso en los mismos, por lo que los animales no presentan sobrepeso u obesidad.

| | DC | DRF |
|--------------------------------------|-------------|---------------|
| Número de animales | 6 | 10 |
| Alimento (g/día) | 3,75 ± 0,09 | 3,46 ± 0,13 |
| Bebida (ml/día) | 4,57 ± 0,16 | 6,39 ± 0,32** |
| Calorías ingeridas (Kcal/día) | 10,5 ± 0,3 | 12,3 ± 0,4** |

Tabla 2.3. Consumo calórico de los animales tratados con dieta control y dieta rica en fructosa.

*Alimento y bebida ingeridos por día y el consumo calórico calculado a través del aporte de la bebida (400 Kcal/L) y el alimento (2,8 Kcal/g). Los animales tratados con la DRF presentaron un aumento en el consumo de bebida que les generó un aumento en el aporte calórico, DC: dieta control, DRF: dieta rica en fructosa. Los valores se encuentran expresados en promedio ± SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.*

2.3.2. Tolerancia a la glucosa alterada

Se evaluó la utilización de glucosa mediante la medición de la glucemia en ayunas y una prueba de TIpG. En la **Figura 2.2** se muestran los resultados obtenidos de curvas de la prueba de TIpG promedio en animales WT (C57 bl/6 y BalbC) tratados con DC y DRF. Para todas las curvas de TIpG se calculó el ABC (área bajo la curva).

La glucemia en ayunas no fue diferente en los ratones tratados con DRF respecto de ratones tratados con la DC. Es decir, estos ratones no presentan una GAA. Por otro lado, se observó que la glucemia en los ratones tratados con DRF alcanza un pico más elevado luego de la

inyección intraperitoneal de glucosa, y no vuelve a los valores basales durante el lapso de las 2 horas en el que se realizan las medidas de glucemia, como es el caso de los ratones DC. Estos resultados indican que los ratones poseen TGA (*Figura 2.2*).

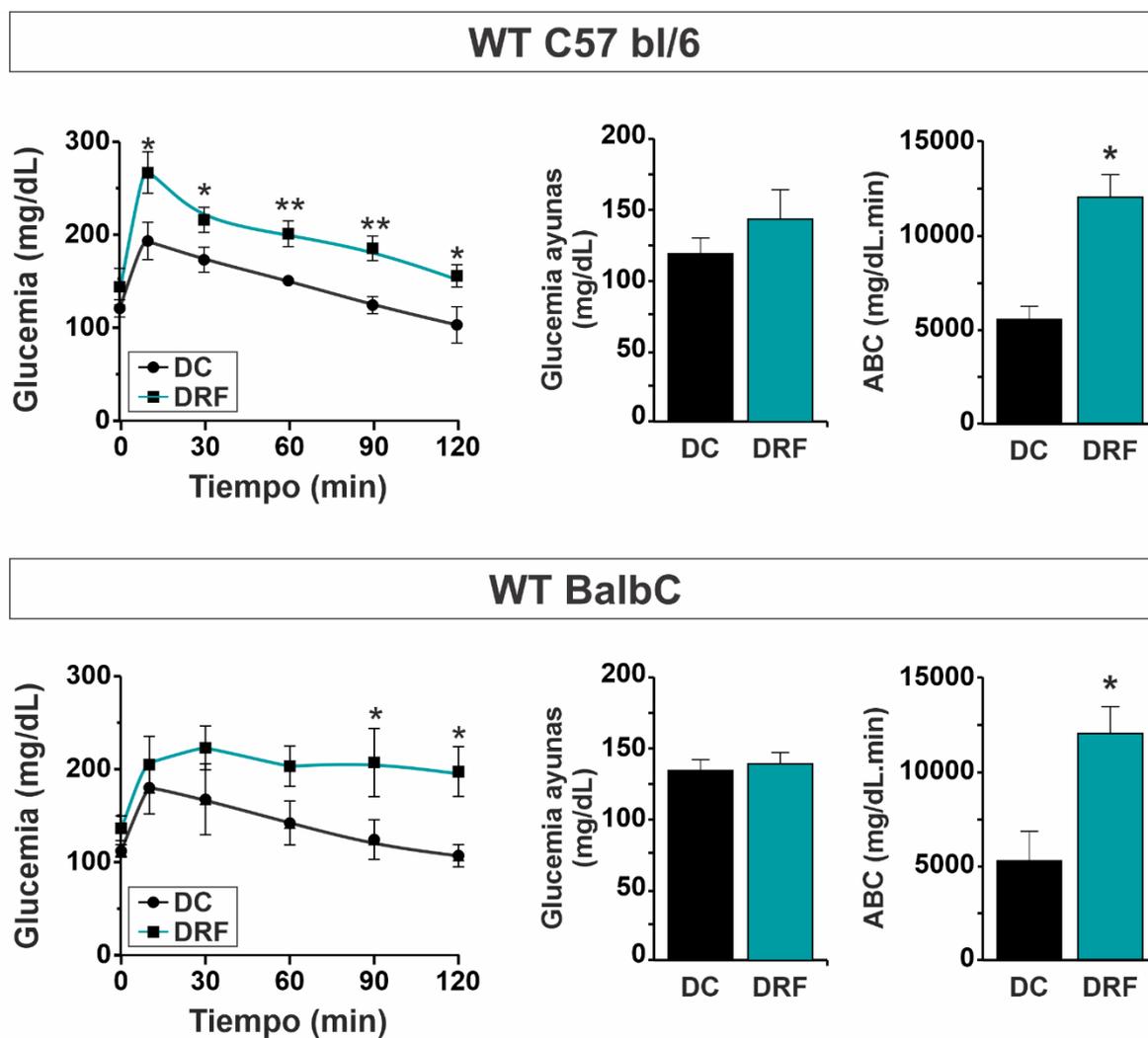


Figura 2.2. Los ratones tratados con la dieta rica en fructosa poseen una curva de tolerancia intraperitoneal a la glucosa alterada.

*Curva de glucemia promedio obtenida mediante la prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa de ratones WT C57bl/6 y BalbC, DC (negro) y DRF (verde), junto con los gráficos de barra que muestran los promedios de la glucemia en ayunas y el área bajo la curva. Se observa un aumento del ABC sin cambios significativos en la glucemia en ayunas. WT: wild type, DC: dieta control, DRF: dieta rica en fructosa, ABC: área bajo la curva. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, $n = 3 - 6$.*

2.3.3. Presión arterial, parámetros morfométricos, y tejido adiposo

Debido a que es muy frecuente encontrar pacientes diabéticos que presenten otros factores de riesgo como obesidad, hipertensión, dislipemia, entre otras alteraciones, que pueden influir en el daño cardiaco, se evaluó la presión arterial, parámetros morfométricos y cantidad de tejido adiposo.

Como se muestra en la **Tabla 2.4** se midió la presión arterial y el peso del corazón, utilizando el peso corporal y la longitud de la tibia como normalizadores del tamaño de los animales. No se presentaron cambios en la medida de la presión arterial, peso del corazón, peso corporal y longitud de la tibia de los animales tratados con la DRF respecto del grupo de ratones tratados con DC. Tampoco se registraron cambios en el peso del corazón normalizado tanto por el peso corporal como por la longitud de la tibia.

| | DC | DRF |
|--|--------------|--------------|
| Número de animales | 9-16 | 9-16 |
| Peso corporal (g) | 29,20 ± 0,83 | 30,83 ± 0,85 |
| Presión arterial (mmHg) | 123,4 ± 2,0 | 125,6 ± 1,9 |
| Peso corazón (mg) | 158,3 ± 6,7 | 145,5 ± 10,8 |
| Longitud de la tibia (mm) | 19,37 ± 0,41 | 19,14 ± 0,30 |
| Peso corazón/Peso corporal (mg/g) | 5,44 ± 0,22 | 4,71 ± 0,32 |
| Peso corazón/Longitud de la tibia (mg/mm) | 8,59 ± 0,4 | 7,42 ± 0,67 |
| Peso corporal/Longitud de la tibia (g/mm) | 1,54 ± 0,05 | 1,62 ± 0,05 |

Tabla 2.4. Parámetros morfométricos y presión arterial.

*En ninguno de los parámetros medidos se observaron diferencias significativas entre DC y DRF. DC: dieta control, DRF: dieta rica en fructosa. Los valores se encuentran expresados en promedio ± SEM, * p < 0,05.*

Para evaluar la cantidad de TAB y TAP, se extrajeron como se explicó en la **sección 2.2.5.**, fueron pesados y normalizados por el peso corporal. En este caso, si bien los ratones no presentan cambios en el peso corporal, como se mencionó previamente, se observó un aumento de la proporción de TAB en los ratones tratados con la DRF respecto de los ratones tratados con DC (**Figura 2.3**). En la medida del TAP se observa una tendencia de aumento en ratones WT tratados con la DRF, pero los cambios no fueron significativos (**Figura 2.3**). Estos cambios pueden estar afectando a otros órganos debido a las funciones endócrinas del tejido adiposo

(Kershaw & Flier, 2004; Yki-Järvinen, 2002), y particularmente en la DM, donde se ha visto involucrado como participe en los cambios patológicos de esta enfermedad (Hajer et al., 2008).

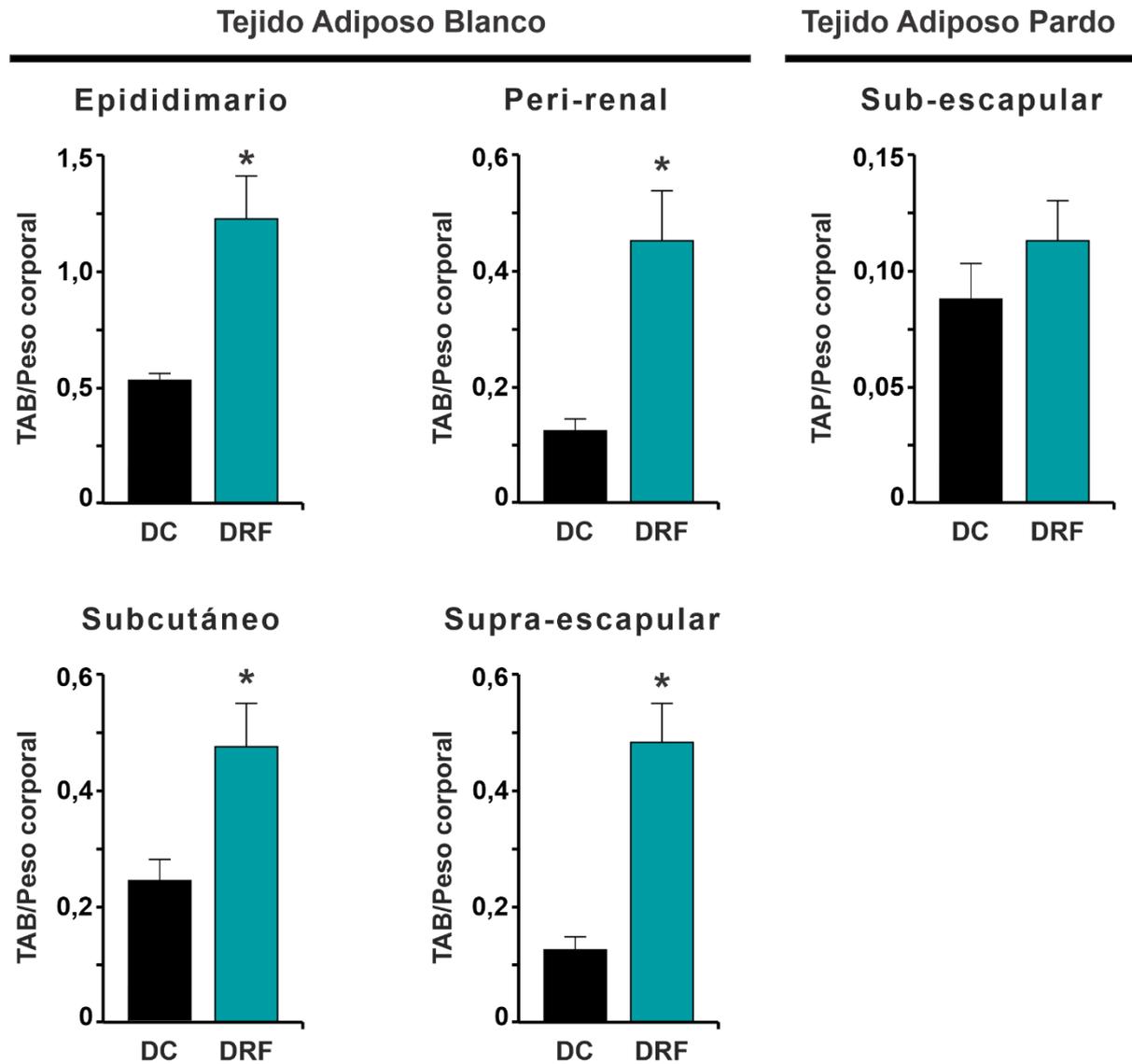


Figura 2.3. Los ratones prediabéticos presentan un aumento del tejido adiposo blanco. Peso del tejido adiposo blanco normalizado por el peso del animal, donde se muestran los cambios de los distintos tipos de tejido adiposo colectados en ratones WT DC y DRF. El tejido adiposo blanco epididimario, subcutáneo, peri-renal, y supraescapular se encontró aumentado en los ratones WT DRF respecto de los WT DC. No se observaron cambios significativos en el tejido adiposo pardo subescapular. **TAB:** tejido adiposo blanco, **TAP:** tejido adiposo pardo, **WT:** wild type, **DC:** dieta control, **DRF:** dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, $n = 5$ por grupo.

2.3.4. Caracterización por ecocardiografía

El corazón prediabético y las posibles disfunciones cardíacas se estudiaron mediante ecocardiografía. La ecocardiografía es una técnica no invasiva, muy importante como primera estrategia de estudio del corazón, ya que arroja información valiosa de diferentes parámetros funcionales y estructurales del corazón. Como se observa en la **Tabla 2.5**, en los ratones WT tratados con DRF se encontró un aumento en el diámetro en sístole del ventrículo izquierdo (LVSD, del inglés *left ventricle systolic diameter*), sumado a un incremento en los índices de masa ventricular izquierda (IMVI), ya sea normalizando por la longitud de la tibia o por el peso corporal, que representan índices de hipertrofia. Estos resultados muestran que los animales prediabéticos presentan hipertrofia cardíaca respecto de los animales tratados con la DC. Además, la función sistólica se vio comprometida, de acuerdo con el FA% (fracción de acortamiento endocárdico porcentual) que se encontró disminuido, y se calculó a partir de los diámetros del ventrículo izquierdo en sístole (DSVI) y diástole (DDVI) (*ver formula en 2.2.6. Ecocardiografía*). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en el grupo de trabajo del laboratorio previamente en ratas Wistar tratadas con la DRF (Sommese et al., 2016).

| | DC | DRF |
|---------------------------|--------------|---------------|
| Número de animales | 9 | 13 |
| DDVI (mm) | 3,40 ± 0,11 | 3,77 ± 0,20 |
| DSVI (mm) | 2,40 ± 0,10 | 2,87 ± 0,14* |
| FA (%) | 29,80 ± 2,35 | 23,93 ± 1,58* |
| IMVI (mg/g) | 7,90 ± 0,66 | 12,19 ± 1,19* |
| IMVI (mg/mm) | 14,10 ± 1,16 | 21,00 ± 2,43* |

Tabla 2.5. Parámetros ecocardiográficos.

*DDVI: diámetro en diástole de la pared del ventrículo izquierdo, DSVI: diámetro en sístole de la pared del ventrículo izquierdo, IMVI: índice de masa ventricular izquierda, normalizado por el peso del corporal (mg/g) o la longitud de la tibia (mg/mm), FA%: fracción de acortamiento endocárdico porcentual, Los valores se encuentran expresados en promedio ± SEM. * $p < 0,05$.*

2.4. Conclusión y discusión

Estos experimentos demostraron que la DRF genera cambios metabólicos en ratones WT. Se produjo un aumento en las calorías consumidas aportadas por la fructosa consumida, que moviliza lípidos aumentando el TAB de los animales. La percepción de que el tejido adiposo es meramente para almacenamiento de AG, ha sido reemplazada por la concepción de que este tejido posee un papel fundamental en el metabolismo de lípidos y glucosa, debido a la producción de hormonas y adipoquinas (Ronti et al., 2006). De esta forma, estos cambios metabólicos se asociaron a una prueba de TIpG alterada, con un aumento en el ABC, sin cambios en la glucemia en ayunas, lo que nos indica un estadio temprano de diabetes definidos por TGA.

Otros modelos que se han utilizado por diferentes grupos para estudiar enfermedades metabólicas poseen características mucho más definidas de DM establecida y CMD, lo que facilita, desde algún punto de vista, el estudio de las alteraciones cardiovasculares presentes en la enfermedad. Por ejemplo, el modelo *ob/ob* de ratones diabéticos, poseen glucemias con valores del doble de los valores que obtuvimos en nuestros experimentos, además de presentar una obesidad marcada, característica del modelo (An et al., 2020; Dong et al., 2006; Dubuc, 1976), lo que colabora con los efectos deletéreos presentes en el corazón, que se asemejan a la patología desarrollada en el humano. Sin embargo, este modelo se aleja del desarrollo normal de la DMT2 en el humano cuando tenemos en cuenta que es un modelo transgénico. Estos ratones desde el nacimiento presentan un defecto en la leptina, comenzando con una DM y obesidad casi de forma instantánea, mientras en el humano la DMT2 es una enfermedad insidiosa. Algo similar ocurre con modelos no transgénicos como la HFD. Según la composición de la dieta elegida, se han demostrado grandes cambios en las alteraciones tanto metabólicas como a nivel cardíaco, con similares características a las de una patología avanzada (J. Li et al., 2020; Zeng et al., 2015). En este último caso, posiblemente haya más similitudes aún con lo que ocurre en el humano con DMT2. Aunque las dietas HFD reflejen el metabolismo que caracteriza a un gran porcentaje de la sociedad actual, al presentar obesidad o sobrepeso, poseen una alteración más que influye en el desarrollo de la patología cardíaca y avance de la CMD, y por ende influye también en el estudio de la misma. En contraposición, el modelo de la DRF no tiene una alteración marcada en la regulación de la glucemia, ni presenta un aumento de peso corporal importante, sin embargo, define un estadio temprano de DM, con la ventaja de desarrollarse en un corto periodo. A su vez, evaluar estadios tempranos

de DM como es la prediabetes, genera la ventaja de poder prevenir el desarrollo a la CMD y conocer los mecanismos que se forman parte de la base molecular que luego continuará con las alteraciones cardíacas de la CMD.

Por otro lado, en el modelo de la DRF previamente se han observado alteraciones a nivel cardíaco (Sommese et al., 2016), en el hígado (Francini et al., 2010), en hueso (Felice et al., 2014) y en el tejido adiposo (Alzamendi et al., 2009). En este trabajo de tesis, siguiendo con los estudios desarrollados en el grupo de trabajo y en otros laboratorios, se observaron alteraciones en el corazón en esta primera caracterización, demostrado en los parámetros ecocardiográficos alterados en los ratones tratados con la DRF, que presentaron hipertrofia y disfunción cardíaca. En conjunto, los resultados obtenidos arrojan la conclusión de que incluso en estadios tempranos o previos a la DM manifiesta, ya se desarrollan mecanismos patológicos a nivel cardiovascular.

Capítulo 3. Apoptosis en el corazón prediabético

3.1. Introducción

Durante muchos años se creyó que la muerte celular era un proceso no regulado, hasta que se comenzó a estudiar en más detalle y se describió la muerte programada también conocida como apoptosis (Ellis, 1986). Luego, se describieron tres procesos diferentes de muerte celular; apoptosis, necrosis y autofagia. La necrosis, es la muerte celular que comúnmente era conocida como muerte no regulada, en el corazón se describe normalmente asociada a infarto agudo de miocardio, donde la célula es depletada de ATP, la membrana plasmática se rompe y se libera el contenido celular al exterior, activando procesos inflamatorios (Edinger & Thompson, 2004). Sin embargo, estudios recientes describen cascadas de señalización que regulan la necrosis, e incluso la relacionan con las vías de señalización de apoptosis y autofagia (Nikoletopoulou et al., 2013). En el caso de la autofagia, ha sido descrita como mecanismo de supervivencia, en donde se reciclan componentes intracelulares por degradación lisosomal, relacionado a proteínas como mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*) y Beclin-1 activadas por ejemplo bajo condiciones de privación metabólica (C. He & Klionsky, 2009). La apoptosis, es un fenómeno en donde una cascada de señalización intracelular conduce a la muerte celular sin liberación de contenido celular, evitando la estimulación de procesos inflamatorios. En este proceso intervienen varias proteínas que conducen finalmente a la activación de las caspasas (cisteína-proteasas que hidrolizan enlaces peptídicos siguiendo residuos de ácido aspártico), previamente expresadas en el citosol como pro-caspasas, lo que desencadena la fragmentación de DNA y formación de cuerpos apoptóticos (Del Re et al., 2019; Whelan et al., 2010). Como se describirá más detalladamente en los siguientes ítems, la apoptosis puede desencadenarse por estímulos externos como pueden ser citoquinas y

componentes inflamatorios, señales hormonales, radiación, entre muchos otros; o estímulos internos como carencia de ATP, aumento del estrés oxidativo y Ca^{2+} , o daños del DNA, entre otros (Del Re et al., 2019; Whelan et al., 2010). Estos estímulos externos e internos describen dos cascadas de señalización, cascada extrínseca y cascada intrínseca, que finalizan en varios procesos necesarios para la apoptosis como son la ruptura del DNA, condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo y la membrana nuclear, y formación de los cuerpos apoptóticos (Del Re et al., 2019; Whelan et al., 2010).

Además de la muerte celular que puede suceder tanto a los cardiomiocitos como los no-cardiomiocitos, las células apoptóticas son reemplazadas por tejido fibrótico, aumentando la cantidad de tejido conectivo en el corazón. La fibrosis se ha descrito en la progresión de varias enfermedades crónicas (Asbun Juan & Villarreal Francisco J., 2006; Gulati et al., 2013; Querejeta Ramón et al., 2004). Principalmente se observa en estadios avanzados de la patología, y en la DM se ha relacionado con una fracción de eyección disminuida (van Heerebeek et al., 2008).

3.1.1. Vía apoptótica Tipo I-Cascada extrínseca de apoptosis

Como mencionamos anteriormente la cascada apoptótica extrínseca, comienza con estímulos externos, y normalmente se ve asociada a procesos inflamatorios, que son los responsables de iniciarla. Estos estímulos externos pueden activar un tipo de receptores conocidos como receptores de muerte. Existen distintos tipos receptores entre los que se encuentra el receptor Fas (FasR), que une al ligando Fas (FasL), y los receptores TNF-R1 a los que se une el factor de necrosis tumoral (TNF, de inglés *tumoral necrosis factor*). La unión de los ligandos a su receptor genera el reclutamiento de moléculas como FADD (del inglés *Fas-associated via death domain*) y TRADD (del inglés *TNF-R1-associated death domain protein*), entre otras. Estas moléculas, poseen un dominio de muerte, y son las encargadas de la traducción de la señal, formando el complejo inductor de muerte que recluta y activa a la caspasa 8 (Ashkenazi & Dixit, 1998; Whelan et al., 2010). La caspasa 8 es capaz de clivar y activar a la caspasa 3 (**Ilustración 3.1**). Si bien estos pasos son los que se describen como vía extrínseca de la apoptosis, ésta necesita usualmente de una amplificación por la vía intrínseca. Esta amplificación ocurre mediante el clivaje de Bid (del inglés *BH3-interacting domain death*) por la caspasa 8. Las proteínas Bid, BIM (del inglés *Bcl-2-interacting mediator of cell death*), y PUMA (del inglés *p53-upregulated modulator of apoptosis*), entre otras, se encargan de activar a participantes de la vía intrínseca como Bax (del inglés *Bcl-2-associated X*) y Bak (del inglés

Bcl-2 homologous antagonist/killer), y de inhibir la activación de Bcl-2, una proteína anti-apoptótica, favoreciendo las vías de señalización de muerte (**Ilustración 3.1**) (Del Re et al., 2019).

3.1.2. Vía apoptótica tipo II-Cascada intrínseca de apoptosis

La cascada intrínseca de la apoptosis, no necesariamente se desarrolla en presencia de procesos inflamatorios, ya que los estímulos ocurren dentro de la célula. Esta cascada ha sido descrita en el miocardio, y es de gran interés en procesos patológicos. Los estímulos internos que desencadenan la vía intrínseca incluyen aquellos que involucran una mala nutrición celular, el aumento del estrés oxidativo, alteraciones en el Ca^{2+} citosólico y/o disminución de ATP, lo que activa ciertos procesos en la mitocondria (Pezoa, 2012). Cuando se presentan estas condiciones de estrés, las mitocondrias se vuelven más permeables, debido a la activación y formación del mPTP (del inglés *mitochondrial permeability transition pore*), lo que genera la liberación de proteínas como el citocromo c, SMAC/DIABLO (del inglés *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI*), AIF (del inglés *apoptosis inducing factor*), endonucleasa G, facilitando la activación de las caspasas que llevarán a cabo varios procesos desencadenadores de la muerte celular (X. Wang, 2001). El citocromo c normalmente participa como uno de los complejos de la cadena transportadora de electrones (ETC, del inglés *electron transport chain*) pero puede liberarse al citosol cuando hay señales de daño, lo que desencadena procesos deletéreos para el cardiomiocito. Cuando el citocromo c se libera al citosol puede unirse a APAF1 (del inglés *factor apoptótico activador de proteasa 1*). APAF1 es una proteína citosólica, que posee un dominio CARD (del inglés *caspasa recruitment domain*) (Zou et al., 1999). La unión de citocromo c a APAF1 genera la oligomerización de este último, lo que expone el dominio CARD y recluta y activa a la pro-caspasa 9. La unión de la caspasa 9 genera la formación del apoptosoma, que puede reclutar a la pro-caspasa 3 y 7 (J. Rodríguez & Lazebnik, 1999). La activación de las caspasas 3 y 7 generan diferentes procesos como la condensación y fragmentación del DNA, finalizando en la formación de los cuerpos apoptóticos (X. Wang, 2001) (**Ilustración 3.1**).

Por otro lado, cuando se libera el citocromo c de la mitocondria, también se libera endonucleasa G, AIF, y SMAC/DIABLO que facilitan la apoptosis. La proteína SMAC posee cuatro residuos de aminoácidos (Ala-Val-Pro-Ile) que unen al dominio BIR3 de XIAP (del inglés *X chromosome encoded IAP*) similar a la secuencia de unión a XIAP de la caspasa-9 activa (Ala-Thr-Pro-Phe). La secuencia XIAP de la caspasa 9, sólo queda expuesta cuando ésta se

encuentra activa. Cuando XIAP se expone, IAP puede unirse a la caspasa 9 e inhibir la apoptosis. Esta inhibición disminuye al liberarse SMAC que compite con IAP por el sitio de unión en la caspasa 9 (Srinivasula et al., 2001; X. Wang, 2001). Cuando AIF es liberado de la mitocondria, puede translocarse al núcleo y causar condensación de la cromatina (Susin et al., 1999). La endonucleasa G es una proteína de 30 kDa que al liberarse de la mitocondria tiene la capacidad de fragmentar el DNA nuclear colaborando con los procesos finales de la cascada intrínseca (L. Y. Li et al., 2001) (*Ilustración 3.1*).

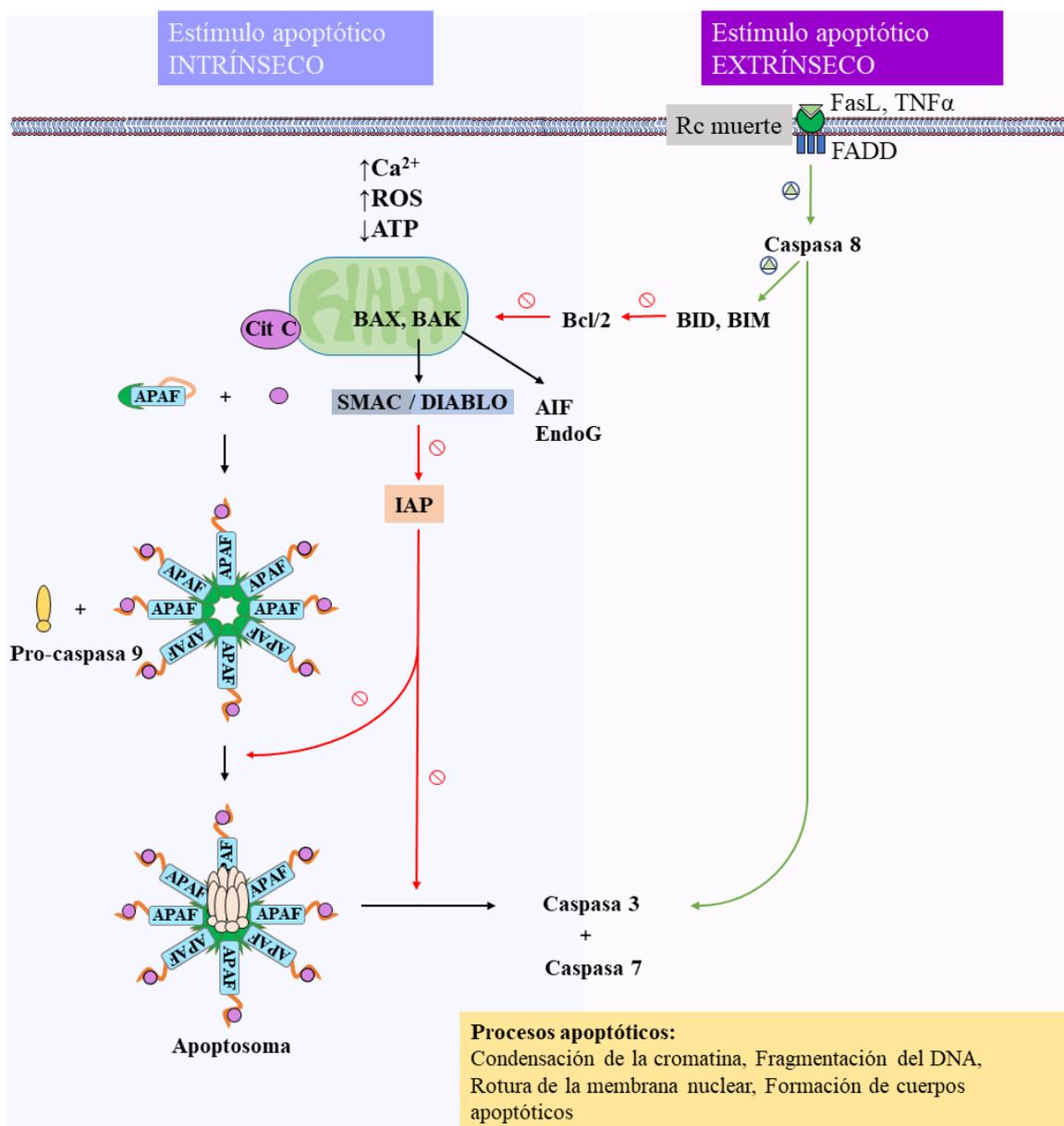


Ilustración 3.1. Esquema de las vías apoptóticas: Extrínseca e Intrínseca.

*La apoptosis puede desencadenarse por una vía extrínseca (recuadro rosa) o una vía intrínseca (recuadro violeta). La vía extrínseca se activa a través de ligandos externos como FasL (Fas ligando) y TNF α (tumoral necrosis factor α) sobre receptores de muerte (Rc muerte), mientras que la vía intrínseca involucra a la mitocondria que se activa por estímulos internos como aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS), exceso de Ca²⁺ o falta de ATP. **CitC**: citocromo c, **APAF**: factor apoptótico activador de proteasa, **Bak**: Bcl-2 homologous antagonist/killer, **Bax**: Bcl-2-associated X (proteína pro-apoptótica), **SMAC/DIABLO**: second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI, **IAP**: inhibitor of apoptosis, **AIF**: apoptosis inducing factor, **EndoG**: endonucleasa G, **FasL**: Fas ligando, **FADD**: Fas-associated via death domain, **Bid**: BH3-interacting domain death, **BIM**: Bcl-2-interacting mediator of cell death, **Bcl-2**: B cell leukemia/lymphoma-2 (proteína anti-apoptótica).*

3.1.3. Muerte celular en la CMD

En la CMD, se producen una variedad de eventos en simultáneo que afectan al corazón, entre ellos la muerte celular. Tanto en pacientes como en modelos animales de falla cardiaca se ha evidenciado DNA fragmentado, que como se mencionó es uno de los procesos finales que ocurren luego de la activación de las caspasas, para generar los cuerpos apoptóticos (Olivetti et al., 1997; Wencker et al., 2003). La cascada de señalización intrínseca de la apoptosis puede desarrollarse en condiciones fisiológicas, para eliminar células que necesiten ser removidas, o puede incrementarse en condiciones patológicas como eventos deletreos para el corazón. En la CMD se ha medido la apoptosis de cardiomiocitos en distintos modelos animales, a través de la evaluación de distintos pasos de las vías de apoptosis mencionadas. En modelos de DMT1, realizados mediante la inyección de STZ, se encontró un aumento en la relación Bax/Bcl-2 utilizado como índice de apoptosis (Kumar et al., 2013; W. Wu et al., 2019), así como también se presentó aumento de la caspasa 3 y de núcleos con DNA fragmentado (W. Wu et al., 2019). En modelos de DMT2 también se visualizaron cambios en el DNA fragmentado, sumado a un incremento en la fibrosis dada por aumento del colágeno presente (J. Zhang et al., 2020). Por otro lado, en biopsias de aurícula de pacientes humanos, también se ha encontrado afectada la mitocondria y la vía intrínseca de la apoptosis, por aumento en la caspasa 9 (Anderson et al., 2011).

Además de la apoptosis, y su vía de señalización, los procesos de fibrosis también han resultado foco de estudio en modelos de DM y CMD (Fredersdorf et al., 2004; Russo & Frangogiannis, 2016). El colágeno es utilizado para reemplazar el espacio que queda libre a causa de un la muerte celular, ya sea por necrosis o apoptosis, generando un aumento en el tejido fibrótico, no contráctil. Este proceso es de largo plazo, y genera que el corazón posea menos masa

contráctil y, por ende, menor función cardíaca. Para evaluar la fibrosis, es usual realizar medidas del colágeno tipo I y III, y utilizar la relación colágeno tipo I/III como índice de fibrosis, ya que son los dos tipos de colágenos más frecuentes en el corazón (Speiser et al., 1991).

Los estudios mencionados se realizaron en modelos animales y corazones humanos donde la DM se presenta como una enfermedad crónica, con procesos patológicos establecidos que generan alteraciones cardíacas.

Los mecanismos por los cuales se ve incrementada la muerte celular en modelos de DM aún están en discusión. Se han descrito activaciones de receptores Rac1, una proteína que forma parte de las NADPH oxidasas y genera aumento de ROS (Shen et al., 2009). Otro mecanismo potencial es la activación directa del sistema renina-angiotensina, también relacionado con el incremento de estrés oxidativo en cardiomiocitos y células endoteliales de pacientes (Frustaci Andrea et al., 2000) y modelos murinos (Velez Rueda et al., 2012). También se ha demostrado un aumento en la sensibilidad al Ca^{2+} del mPTP y activación de caspasa 9 que promueven la apoptosis, lo que apoyaría la vía de señalización de apoptosis mediada por la mitocondria (Anderson et al., 2011).

En modelos de estadios tempranos de diabetes se han encontrado alteraciones a nivel cardíaco, pero no se ha estudiado aún la muerte celular y los procesos de fibrosis. Acorde a los resultados de las ecocardiografías (ver *Capítulo 2*), en donde se observó una disfunción contráctil, se esperaría encontrar una reducción en el acortamiento de los cardiomiocitos aislados. Sin embargo, en el modelo de ratas tratadas con la DRF, al evaluar el acortamiento celular se observó un aumento en dicho parámetro. Esta discrepancia entre lo que ocurre en el corazón entero y en los cardiomiocitos aislados nos alentó a estudiar la muerte celular.

De acuerdo con lo descrito y las vías posibles del daño cardíaco, el objetivo específico de este capítulo fue estudiar la muerte celular por apoptosis en los corazones de ratones prediabéticos.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Determinación de la apoptosis por la técnica TUNEL

Las medidas de apoptosis fueron realizadas mediante la técnica fluorescente de TUNEL (del inglés *TdT-mediated dUTP-X nick end labeling*). Como se comentó anteriormente, uno de los eventos finales de la apoptosis es la fragmentación del DNA por las DNAasas endógenas. La escisión del DNA puede producir roturas o mellas del DNA que pueden detectarse marcando los 3'-OH terminales libres con nucleótidos modificados en una reacción enzimática. La enzima terminal desoxinucleotidil transferasa (TdT) cataliza la polimerización independiente de la plantilla de desoxirribonucleótidos al extremo 3' del DNA monocatenario y bicatenario.

La técnica fluorescente de TUNEL fue realizada mediante la utilización de un kit comercial (*In Situ Cell Death Kit detection*, TMR rojo, Roche, Mannheim, Alemania) (*In Situ Cell Death Detection Kit, TMR Red 12156792910*, n.d.). El kit de detección de apoptosis *in situ* TMR rojo contiene la enzima TdT y TMR-dUTP, por lo que durante el periodo de incubación la TdT cataliza la adición de TMR-dUTP en grupos 3'-OH libres en el DNA monocatenario y bicatenario presentes en el tejido, que luego son evidenciados mediante microscopía de fluorescencia.

Para la medida, los corazones de los distintos grupos experimentales fueron extraídos, y se obtuvieron finas láminas de ventrículo izquierdo, para fijarlas en ρ -formaldehído al 4 %. Luego, las secciones fueron desparafinadas, deshidratadas e incubados con proteinasa K para la recuperación de antígenos. Después de lavar con PBS-*Tween* 20 al 0,5 %, los portaobjetos fueron incubados con la mezcla de reacción, que contiene los nucleótidos modificados (TMR-dUTP) y la enzima TdT. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y contra teñidas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de DAPI (*4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*; *Invitrogen Life Technologies*) (*DAPI 4',6-Diamidine-2'-Phenylindole Dihydrochloride*, n.d.). El reactivo DAPI aumenta alrededor de 20 veces su fluorescencia cuando se une a los nucleótidos adenina-timina del DNA doble cadena, lo que permite la marcación de núcleos.

Las imágenes de las células positivas fueron obtenidas con un microscopio confocal (*Olympus FV-1000*, Japón), usando un objetivo 40x con apertura numérica de 0,95. Los núcleos apoptóticos fueron contabilizados en 10 campos al azar para cada situación experimental, representando $4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ del tejido ventricular por cada muestra, mediante el análisis de imágenes de software v6.3 *Olympus cell Sens (CellSens | Software de Procesamiento de*

Imágenes | Soluciones Olympus Life Science, n.d.). Los resultados fueron expresados como porcentaje de núcleos TUNEL positivos relacionados con el número total de células.

3.2.2. Determinación de apoptosis mediante western blot

La determinación de apoptosis mediante la medida de expresión de proteínas por western blot (ver *APENDICE I* en la *sección de Western blot*) fue realizada a través del uso de anticuerpos contra la proteína Bax, pro-apoptótica, y Bcl-2, una proteína anti-apoptótica, utilizando a GAPDH como control de carga. Se calculó la relación Bax/Bcl-2 como índice apoptótico a través de la relación entre los promedios de expresión obtenidos para ambas proteínas.

3.2.3. Determinación de colágeno

La red de colágeno que contiene el corazón se encuentra principalmente formada por fibras de colágeno tipo I y tipo III. Alrededor de un 85 % de las fibras se corresponden con colágeno tipo I que principalmente aportan rigidez, y alrededor de un 15 % de colágeno tipo III que aportan elasticidad (Speiser et al., 1991). Las medidas de colágeno tipo I y III, y la relación tipo I/III se han utilizado para evaluar la presencia de fibrosis, encontrándose un aumento de la misma en el tejido cardíaco de animales diabéticos (Fredersdorf et al., 2004; Querejeta Ramón et al., 2004; Russo & Frangogiannis, 2016). Para evaluar los cambios en el colágeno producidos en el modelo de prediabetes, secciones de tejido cardíaco fueron teñidas con *Picrosirius Red* y visualizadas en un microscopio con luz polarizada (Montes, 1996). Para ello, las secciones del corazón fueron desparafinadas, e hidratadas mediante etanol graduado (concentraciones de etanol decrecientes). Luego, el preparado fue teñido por una hora con una solución 0,1 % de *Sirus Red (Direct Red 80, Aldrich, Milwaukee, WI, USA)* disuelto en una solución saturada de ácido pícrico. Las secciones de tejido fueron lavadas y se les realizó una contra tinción con hematoxilina.

Para la cuantificación, en cada imagen del tejido se realizó un análisis con el software v6.3 *Olympus cell Sens (CellSens | Software de Procesamiento de Imágenes | Soluciones Olympus Life Science*, n.d.). Se seleccionó el rango de amarillo a rojo para el colágeno tipo I y una gama de verdes para el colágeno tipo III. Se midió la área ocupada por ambas estructuras y su relación (colágeno tipo I/tipo III), expresándolas en porcentaje respecto del área total de ambos colágenos. Para homogeneizar la gama de colores que identifica cada tipo de colágeno, se aplicó una máscara azul claro para colágeno I y una máscara amarilla para colágeno III en las imágenes originales.

3.3. Resultados

3.3.1. Apoptosis en el corazón prediabético

La apoptosis se evaluó mediante la técnica de TUNEL, como se explicó en *Determinación de la apoptosis por la técnica TUNEL*, que marca los núcleos que poseen DNA fragmentado mediante fluorescencia roja. En la **Figura 3.1.a** se muestra de arriba hacia abajo una fotografía representativa del tejido cardiaco con la marcación con TUNEL, la marcación de núcleos totales mediante el uso de DAPI y la mezcla de ambas en el tejido, para un corazón de ratón tratado con DC y otro con DRF. En el gráfico de barras se muestran los datos promedio obtenidos de la cuantificación de los núcleos TUNEL positivo respecto de los núcleos totales. Como puede observarse en las imágenes representativas y en el gráfico de barras, los corazones de animales tratados con DRF presentaron un aumento en los núcleos apoptóticos. En la **Figura 3.1.b** se muestra el cálculo del porcentaje de núcleos apoptóticos en los distintos tejidos analizados, tomando tres rangos de porcentaje de apoptosis; 0, 0 a 0.03 y mayor a 0.3. Estos resultados muestran que en los corazones de ratones tratados con DRF se presentó un aumento de tejido con mayor rango de apoptosis (verde oscuro, > 0.03%) para DRF, mientras que disminuyó el número de tejido que no presentaron apoptosis (gris, 0 %) respecto de DC.

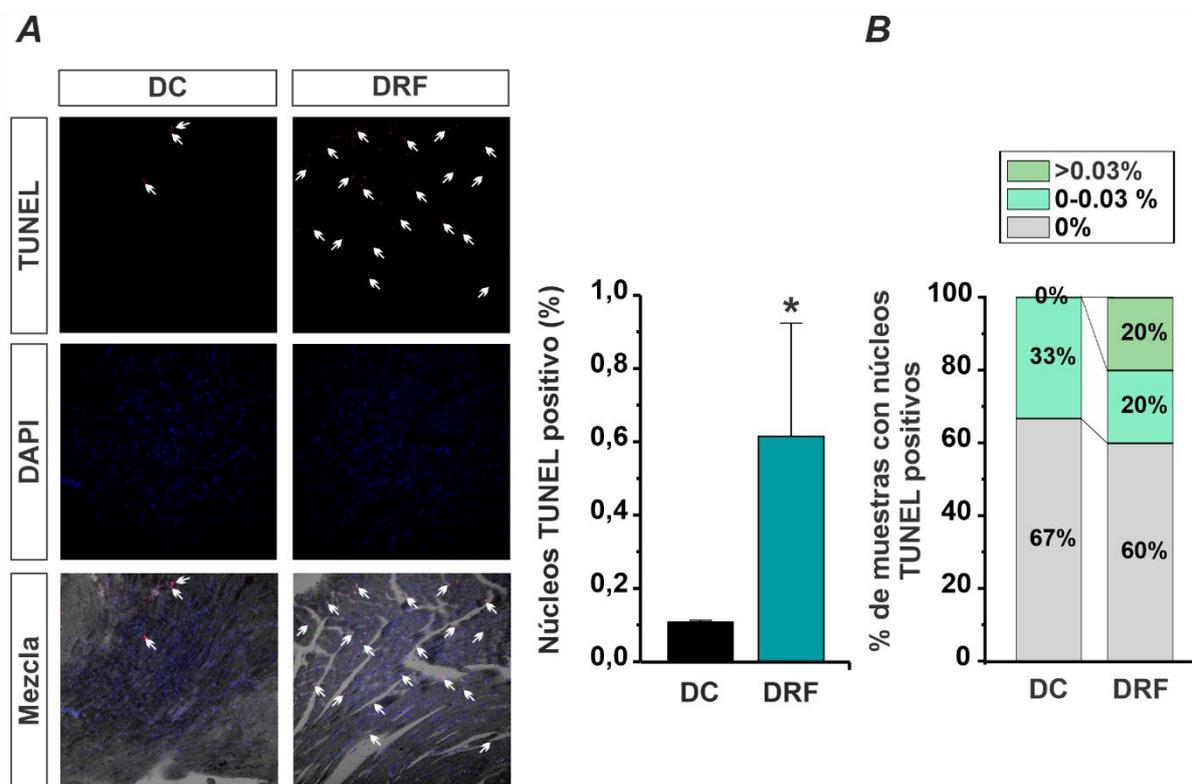


Figura 3.1. Aumento de la apoptosis en los corazones prediabéticos.

A, Imagen representativa del tejido cardiaco de animales WT DC y DRF, utilizando la técnica de TUNEL, que marca los núcleos apoptóticos (en rojo, señalados con flechas blancas) debido al DNA fragmentado, junto con los resultados promedio \pm SEM en los gráficos de barra, donde se observa un aumento de los núcleos TUNEL positivos respecto al total de núcleos (marcados con DAPI) en los corazones prediabéticos. *B*, gráfico de barras donde se muestra el porcentaje de tejidos que presentaron apoptosis en los rangos de 0 - 0.03 y mayor a 0.3 %. Se presentó un aumento en el porcentaje de tejidos que tuvieron apoptosis en alta proporción (rango de 0,3 %) en los animales DRF respecto de los DC. **WT**: wild type, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, $n = 3-6$.

Para validar el aumento de apoptosis medido por la técnica de TUNEL, se utilizó la medida de proteínas de la cascada apoptótica por *western blot* (para más detalle ver la sección *Western blot*). Para esto se midió la expresión de las proteínas Bax (pro-apoptótica) y Bcl-2 (anti-apoptótica), en homogenatos de corazones de animales tratados con DC y DRF. A partir de la expresión se calculó la relación Bax/Bcl-2 que es considerado un índice de apoptosis. En la *Figura 3.2*, se muestra los resultados obtenidos para la relación Bax/Bcl-2, donde puede observarse un aumento de la misma en los corazones de animales tratados con la DRF respecto de los DC.

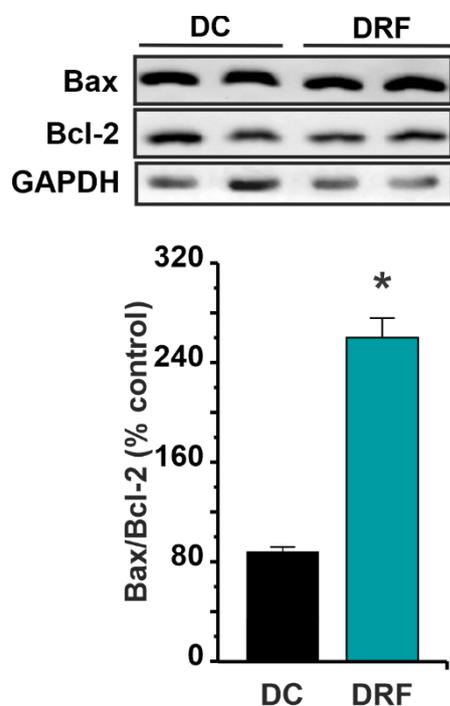


Figura 3.2. Relación Bax/Bcl-2 como índice apoptótico.

Fotos representativas de los blots para las proteínas Bax (pro-apoptótica) y Bcl-2 (anti-apoptótica), utilizando GAPDH como normalizador de carga, junto con el gráfico de barra de los datos promedio obtenidos. Se observó un aumento en la apoptosis de los corazones de animales prediabéticos a través del aumento en la relación Bax/Bcl-2. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa, **Bax**: Bcl-2-associated X. **Bcl-2**: B cell leukemia/lymphoma-2. * $p < 0,05$, $n = 3 - 5$.

3.3.2. La fibrosis en el corazón prediabético no se vio alterada

Para la medida de fibrosis se tiñó el tejido cardíaco mediante el uso de *Picrosirius Red* como se menciona en los materiales y métodos (**Determinación de colágeno**). Esta marcación muestra el porcentaje de colágeno tipo I y tipo III que rodea al tejido cardíaco, que es de utilidad para evidenciar si hay aumento del tejido fibrótico. En la **Figura 3.3.a** se muestran imágenes representativas de la marcación de colágeno tipo I (rango de rojo al amarillo) y III (rango del verde) en tejido de animales WT tratados con DC y DRF. Para optimizar el contraste y favorecer la visualización de las imágenes, se utilizó una máscara celeste para la selección del colágeno tipo I y una máscara amarilla para el colágeno tipo III, en un fondo negro (**Figura 3.3, derecha**). La **Figura 3.3.b** muestra los resultados promedio obtenidos, donde se expresan los tipos de colágeno en porcentaje del total. Puede observarse que no hay cambios en la producción de colágeno en el tejido cardíaco, lo que indica que en los corazones prediabéticos no presentan un aumento en la fibrosis cardíaca.

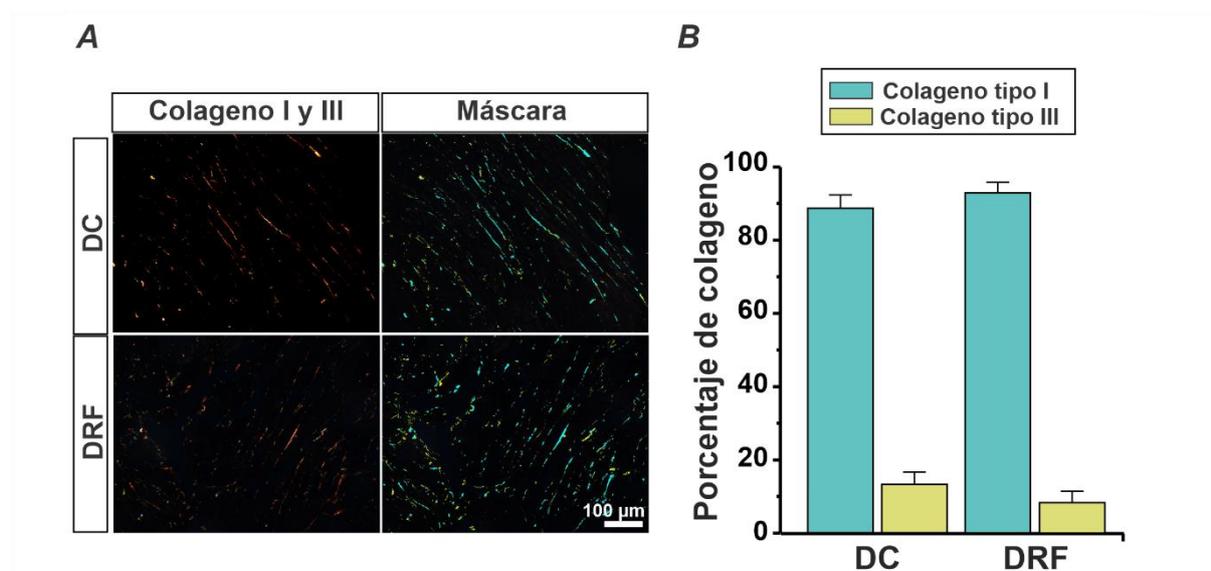


Figura 3.3. La prediabetes no modifica los tipos y el porcentaje de colágeno en el tejido cardíaco.

A, Fotografías representativas del análisis de colágeno en tejido cardíaco de animales WT, DC y DRF, utilizando la tinción de Picrosirius Red. Mediante el uso de microscopía de luz polarizada se identificaron las fibras de colágeno tipo I como rojas o amarillas y las de colágeno tipo III en verde. Para homogenizar el rango de colores e identificar los distintos tipos de colágeno se utilizó una máscara de color celeste para las fibras de colágeno tipo I y amarillo para las fibras de colágeno tipo III. **B**, Gráfico de barra de los datos promedio del porcentaje de cada colágeno en el tejido cardíaco de cada grupo. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, $n = 3-5$ animales por grupo.

3.4. Conclusión y discusión

Como conclusión de este capítulo se desprende que hay un aumento de la apoptosis en los corazones prediabéticos, debidos a un aumento en los núcleos apoptóticos de cardiomiocitos y disminución de la relación Bax/Bcl-2 en los homogenatos de los corazones con DRF respecto a los DC.

Los valores de las relaciones de colágeno tipo I y colágeno tipo III calculadas a partir de la tinción por *Picosirus Red* no indicó un cambio que permita afirmar un aumento significativo de la fibrosis en los corazones prediabéticos respecto de los corazones de ratones DC.

La apoptosis cardiaca ha sido estudiada en distintos modelos de DM que desarrollan múltiples alteraciones a nivel cardiaco (Kumar et al., 2013; W. Wu et al., 2019), sin embargo, no se había demostrado previamente un aumento en la muerte celular por apoptosis en modelos de prediabetes. Este estudio indica, que previo a la DM manifiesta y la progresión de la enfermedad que desencadena la CMD, ya se presentan alteraciones a nivel cardiaco que promueven la muerte de los cardiomiocitos.

Por otro lado, si bien en la CMD se ha descrito la presencia de fibrosis (J. Zhang et al., 2020), no se encontró aumentada en el modelo de prediabetes. Este hecho, puede estar asociado a que el modelo de prediabetes es un estadio temprano de diabetes, con alteraciones que posiblemente sean los primeros pasos del desarrollo de las demás alteraciones cardiacas observadas con el avance de la patología. A su vez, la fibrosis es un proceso irreversible, en donde se pierde masa del miocardio, ya que se intercambia por tejido conectivo, generando un corazón rígido. En el modelo de prediabetes, esto no ocurre, dando la idea de que en estadios tempranos de la diabetes aún hay posibilidades de revertir las alteraciones cardiacas y mejorar la actividad cardiaca tratando la enfermedad metabólica.

Finalmente, el hecho de que haya apoptosis, sin aumento en el tejido fibrótico puede indicar el comienzo del desarrollo de las alteraciones manifestadas en la CMD.

Capítulo 4. Manejo del calcio en el corazón prediabético

4.1. Introducción

El corazón es un órgano activo que se contrae en promedio, 80 veces por minuto en el humano y alrededor de 600 veces por minuto en el ratón, para lo cual un adecuado manejo del Ca^{2+} es fundamental para el buen funcionamiento del ECC. Como se mencionó en el *Capítulo 1*, durante el ECC, se genera la entrada de Ca^{2+} hacia la célula que activa a los RyR2 del RS, y produce la liberación masiva de Ca^{2+} al citosol que producirá la contracción. La apertura de algunos RyR2 puede producir una liberación de Ca^{2+} como chispas o *sparks*, mientras que, durante cada latido, se producen un gran número de chispas simultáneas y sincronizadas que generan el transitorio de Ca^{2+} .

Luego, durante la relajación, el Ca^{2+} es retomado por la SERCA2a para volver a cargar el RS y también es extruido de la célula por el NCX (Bers, 2002). Es así como el ion Ca^{2+} cumple una función sumamente importante en el cardiomiocito. Tanto en el ECC como en su regulación, existen varios canales y enzimas involucrados en proporcionar un manejo de Ca^{2+} adecuado para las condiciones fisiológicas. El ECC se ha descrito alterado en diferentes situaciones patológicas, como arritmias, insuficiencia cardiaca, isquemia y reperfusión, entre otras (Kubalova et al., 2005; Sommese et al., 2016; Valverde et al., 2019). Además, se ha visto relacionado con mecanismos deletéreos producidos en el corazón como la apoptosis celular (Lehnart et al., 2005).

Debido a que las alteraciones en el ECC pueden deberse a los canales involucrados o a las enzimas que regulan dichos canales, a continuación, se describirán los principales reguladores del manejo de Ca^{2+} intracelular en este mecanismo.

4.1.1. Regulación de la liberación de calcio desde el RS

Complejo RyR. La apertura de los RyR2 en simultáneo y de forma organizada genera la liberación de Ca^{2+} del RS de forma transitoria en cada latido. El RyR es un canal iónico formado por 4 monómeros de 565 kDa cada uno ensamblados para formar un homotetrámero (Takeshima et al., 1989; Van Petegem, 2015). Existen tres isoformas de RyR, que comparten el 65% de identidad de secuencia: RyR tipo 1, expresado predominantemente en músculo esquelético; RyR tipo 2, que corresponde a la isoforma cardíaca, y RyR tipo 3, expresado en varios tejidos, entre ellos el cerebro (Capes et al., 2011). Existen diferentes características entre las isoformas de los RyR que se ven reflejadas en su ubicación y función en el tejido. Dentro de estas características, se ha observado RyR1 y RyR2 requieren bajas concentraciones de Ca^{2+} para su apertura, pero se mantienen abierto por un corto período de tiempo, mientras los RyR3 requieren concentraciones de Ca^{2+} mayores, pero presentan una tendencia a mantenerse en estado abierto por un tiempo más prolongado (Griswold, 2011; Sutko & Airey, 1996).

En la porción citosólica, el canal contiene múltiples dominios regulatorios, como sitios de unión para sensores de energía (ATP, ADP y AMP), Pi, metabolitos como piruvato, ácidos grasos y poliaminas e iones (Mg^{2+} , H^{+} y Cl^{-}) (Fill & Copello, 2002; Zucchi & Ronca-Testoni, 1997). El sitio de unión para Ca^{2+} se encuentra en el dominio central del canal e implica el extremo carboxi-terminal de este dominio (Murayama et al., 2018). Este complejo también está regulado y modulado por una amplia gama de proteínas que involucran PKA, PKG, PKC, CaMKII, fosfatasa (como fosfatasa 1 y 2A: PP-1 y PP-2A), S100A, Sorcina y fosfodiesterasa (PDE4D) que están conectados al canal, ubicadas cerca de sus sitios blanco en el RyR2 (*Ilustración 4.1*) (Lehnart et al., 2005; Marks, 2002).

Las quinasas tienen la capacidad de fosforilar al RyR2 en sitios como Ser²⁸⁰⁸ (PKA y CaMKII), Ser²⁰³⁰ (PKA, PKG, PKC) y Ser²⁸¹⁴ (CaMKII), generando la apertura del canal y salida de Ca^{2+} del RS. Las fosfatasa PP-1 y PP-2A hacen lo opuesto al defosforilar estos sitios. Sorcina se ha descrito como una proteína inhibidora del RyR2 en el lado citoplasmático, que a su vez puede ser regulada e inhibida por PKA (Farrell et al., 2003). S100A inhibe al RyR2 en el lado citosólico dependiendo de los niveles de Ca^{2+} (Völkers et al., 2007). PDE4D se ubica cerca del RyR2 y puede modular la fosforilación del RyR2 en el sitio Ser²⁸⁰⁸ por PKA (Lehnart et al., 2005).

En la porción luminal también puede regularse por varias proteínas, entre las más importantes se encuentra la calsecuestrina 2 (CSQ2). CSQ2 actúa como buffer de Ca^{2+} , y también media la

capacidad de respuesta del RyR2 al Ca^{2+} luminal, sirviendo como un sensor de Ca^{2+} (I. Györke et al., 2004; S. Györke & Terentyev, 2008). Esta función se realiza a través de interacciones proteína-proteína con juntina y triadina (Shin et al., 2000; L. Zhang et al., 1997). Juntina es una proteína transmembrana de 26 kDa que forma un complejo con triadina, CSQ2 y RyR2, y se ha propuesto que está en contacto directo con el RyR2 funcionando como un anclaje para CSQ2 en condiciones de alto Ca^{2+} (I. Györke et al., 2004; L. Zhang et al., 1997) (*Ilustración 4.1*).

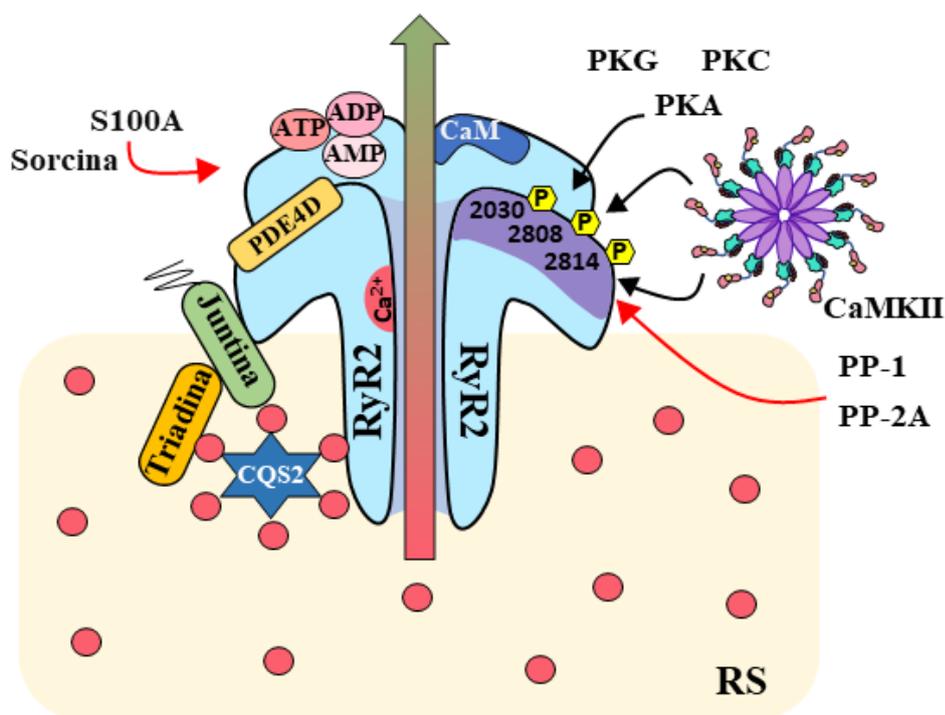


Ilustración 4.1. Esquema del RyR2.

Esquema del RyR2 en donde se muestran los distintos sitios de acción de quinasas, fosfatasas y unión de metabolitos. El RyR2 es un tetrámero que posee un lado citosólico (superior en la figura) y un lado luminal (inferior en la figura), cara al retículo sarcoplásmico (RS, esquematizado en color amarillo). En la cara citoplásmática el RyR2 puede ser fosforilado por las quinasas PKA, PKG, PKC, CaMKII en los sitios serina 2808, 2030, y 2814 (flechas negras), lo que aumenta la actividad del canal. También puede ser defosforilado por PP-1 y PP-2A (flecha roja), lo que disminuye su actividad. Posee los sitios de unión a metabolitos como ADP, AMP, ATP, CaM, y la unión a Ca^{2+} , casi ubicada en el centro del canal (en rojo). Por otro lado, el RyR2 también puede disminuir su actividad por la acción de enzimas como Sorcina o S100A (flecha roja), o ser modulado por enzimas como la PDE4D. En el lado luminal el RyR2 puede ser modulado por el contenido de Ca^{2+} del RS, que a su vez se encuentra censado por CSQ2, que se une a juntina y triadina, para regular la apertura de RyR2 en condiciones de alto Ca^{2+} . Los círculos rojos esquematizan el Ca^{2+} en el RS. **PDE4D**: fosfodiesterasa 4, **CaM**:

calmodulina, PKA: proteína quinasa A, PKC: proteína quinasa C, PKG: proteína quinasa G, CaMKII: enzima dependiente de Ca^{2+} /CaM quinasa II, CSQ2: calsecuestrina, PP-1: proteína fosfatasa 1, PP-2A: proteína fosfatasa 2A, RS: retículo sarcoplasmático.

Modificaciones postraduccionales. La probabilidad de apertura del RyR2 y su afinidad por el Ca^{2+} puede aumentar o disminuir por modificaciones postraduccionales, como las fosforilaciones, defosforilaciones, oxidaciones, etc. Para el estudio de la fosforilación, como principal modificación postraducciona, en los distintos sitios descritos se han generado animales transgénicos, en los que se produce el cambio de un aminoácido que imposibilita o aumenta la fosforilación de dicho sitio. Por ejemplo, los ratones transgénicos S2814D (Van Oort et al., 2010) poseen el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 mutado a aspartato y, por lo tanto, el RyR2 se encuentra pseudofosforilado de forma constitutiva; mientras los ratones S2814A (Chelu et al., 2009) poseen el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 mutado a alanina y, por lo tanto, el RyR2 no puede ser fosforilado en ese sitio. La pseudofosforilación del RyR2 produce un aumento en la actividad máxima de apertura del RyR2 (Cely-Ortiz et al., 2020), mientras la inhibición de la fosforilación disminuye la probabilidad de apertura (P_0) del canal. Cabe destacar que la fosforilación del canal modula el efecto de Ca^{2+} en el RyR2 sin tener la capacidad inherente para abrir o cerrar el canal *per se* (Camors & Valdivia, 2014). Hasta el momento, se han identificado tres sitios de fosforilación para los RyR2, en una secuencia relativamente corta, conocida como “*hot spot*”. Allí los sitios pueden ser fosforilados por varias quinasas, lo que cambia el sitio consenso para otras. Este hecho implica que los sitios estudiados de forma aislada pueden modificar su comportamiento en una situación fisiopatológica donde varias quinasas y fosfatasas estén activas. Los sitios de fosforilación actualmente identificados son: Ser²⁸⁰⁸, Ser²⁸¹⁴ y Ser²⁰³⁰. El sitio Ser²⁸⁰⁸ (Ser²⁸⁰⁸ en ratón y Ser²⁸⁰⁹ en humanos y nomenclatura canina del RyR2) fue descrito por primera vez como un sitio de fosforilación por CaMKII (P. Rodriguez et al., 2003; Witcher et al., 1991) (**Ilustración 4.1**). Más estudios de estos, demostraron que son sitios blanco para PKA, CaMKII y posiblemente para PKG (Carter et al., 2006; Fischer et al., 2013; P. Rodriguez et al., 2003; Stange et al., 2003).

El sitio Ser²⁸¹⁴ se ha descrito como sitio blanco exclusivo de CaMKII (X. H. Wehrens et al., 2004). Confirmando estos estudios, al realizar experimentos de canal único en bicapa lipídica, la P_0 de RyR2 se encontró aumentada cuando se producía la fosforilación por CaMKII (Lokuta et al., 1995; Yang et al., 2007) sin cambios ante una activación de PKA (X. H. Wehrens et al., 2004). Además, la activación o sobreexpresión de CaMKII se ha visto asociada con el efecto

inotrópico positivo producido por los estímulos β adrenérgicos (Ferrero et al., 2007), el aumento de la frecuencia de *sparks* de Ca^{2+} (T. Guo et al., 2006) y la susceptibilidad a las arritmias (Mazzocchi et al., 2016; Sommese et al., 2016; Valverde et al., 2019). En cambio, en los animales transgénicos S2814A mencionados anteriormente, que no pueden ser fosforilados por CaMKII, se evita la producción de arritmias (Mazzocchi et al., 2016; Van Oort et al., 2010).

El sitio Ser²⁰³⁰ fue caracterizado como sitio blanco de PKA con una técnica clásica de mapeo de epítopes fosforilables (B. Xiao et al., 2005). En cardiomiocitos quiescentes el RyR2 parece no ser fosforilado por completo (Huke & Bers, 2008), mientras bajo estímulos β -adrenérgicos, donde PKA se encuentra activa, aumenta su fosforilación. Por este motivo, se sugiere que el sitio Ser²⁰³⁰ es fosforilado por PKA activada bajo condiciones de estímulos β -adrenérgicos (B. Xiao et al., 2006). De hecho, hace unos años se ha propuesto necesaria la fosforilación en este sitio para completar el efecto β -adrenérgico (Potenza et al., 2019), para lo que se utilizaron animales en donde se abolió la fosforilación del sitio Ser²⁰³⁰ al reemplazar el residuo serina por alanina (animales S2030A).

Además de ser fosforilado, el RyR2 puede ser desfosforilado en estos sitios por fosfatasa, lo que contrarresta el efecto mencionado para la fosforilación. La activación de la fosfatasa PP-1 (del inglés *protein phosphatase 1*) reduce las pérdidas de Ca^{2+} y las arritmias que se ven incrementadas en la falla cardíaca, sin cambios significativos en el contenido del RS y la contractilidad cardíaca, por su acción sobre RyR2 (Fischer et al., 2018).

Otra modificación postraducciona estudiada para el RyR2 es la oxidación. El RyR2 posee 89 residuos cisteínas (Cys) por cada subunidad de 560 kDa, dando un total de 356 Cys en todo el complejo. De estas Cys, aproximadamente 84 se encuentran expuestas y pueden ser oxidadas (Meissner, 2004; L. Xu et al., 1998). La oxidación de las cisteínas en general incrementa la P_0 de canal, mientras los agentes reductores producen un efecto opuesto (Marengo et al., 1998; Sun et al., 2008; L. Xu et al., 1998). Sin embargo, condiciones de estrés oxidativo severas pueden causar una apertura persistente e irreversible de los RyR2 (L. Xu et al., 1998), aumentando la pérdida de Ca^{2+} del RS y generando así efectos deletéreos en el corazón. Además de la oxidación directa del canal, se ha descrito que la NADPH oxidasa 2 (NOX2), que se encuentra predominantemente en los túbulos-T y las membranas del RS en los cardiomiocitos, pueden generar la activación del canal a través de la acción CaMKII (Palomeque et al., 2009).

Por último, hay otras proteínas reguladoras asociadas al RyR2 como son HRC (del inglés *histidine-rich Ca²⁺ binding protein*), que interactúa con triadina en condiciones altas de Ca²⁺ en el lumen del RS (Sacchetto et al., 1999); FKBP12.6, es una peptidil-proil cis/trans-isomerasa asociada al RyR2 en una estequiometría 4:1, que se reconoce como una proteína estabilizadora del complejo RyR2 aunque su rol aún es tema de discusión (Doi et al., 2002; Timerman et al., 1996; J. Xiao et al., 2007); y Sorcina y S100A, que ya fueron mencionadas, pueden inhibir a RyR2 del lado citosólico (Farrell et al., 2003), (Kiewitz et al., 2003).

4.1.2. Regulación de la recaptación de Ca²⁺ por el RS

Bomba SERCA. La recaptación de Ca²⁺ hacia el RS en el cardiomiocito está dada por la proteína SERCA2a, una bomba que utiliza ATP para transportar dos iones Ca²⁺ desde el citosol hacia el lumen del RS intercambiando 3 H⁺ en este pasaje.

Existen 3 isoformas de SERCA; SERCA1, SERCA2 y SERCA3. La isoforma SERCA1 a su vez tiene dos variantes, SERCA1a y 1b, que se expresan en músculo esquelético. La SERCA2a presenta 2 variantes SERCA2a y 2b; la variante SERCA2a se expresa en corazón y músculo esquelético y la SERCA2b es ubicua. Por último, la SERCA3 se encuentra en músculo liso y en varias células no musculares (Kranias Evangelia G. & Hajjar Roger J., 2012; Primeau et al., 2018). La estructura de SERCA se encuentra alrededor de un 75% conservada entre las isoformas, sin embargo, existen variaciones entre ellas que llevan a que tengan diferente afinidad y velocidad de retoma de Ca²⁺. SERCA1 y SERCA2a poseen una afinidad intermedia, pero alta velocidad de recaptación de Ca²⁺, mientras SERCA2b posee alta afinidad y baja velocidad, y SERCA3 posee baja afinidad y baja velocidad de retoma de Ca²⁺ (Periasamy & Kalyanasundaram, 2007).

En lo que respecta a SERCA2a, la isoforma cardíaca, está formada por una cadena proteica que posee 4 dominios: uno transmembrana, que forma el poro que permite el pasaje de Ca²⁺ al lumen del RS, y tres dominios citosólicos, que permiten su fosforilación, la unión de nucleótidos y su activación (Primeau et al., 2018).

La regulación de SERCA2a está dada principalmente por PLN (fosfolamban), una proteína de 22 kDa que en condiciones basales se encuentra desfosforilada y unida a SERCA2a (Tada et al., 1975). Cuando PLN se une a SERCA2a puede inhibir su actividad de forma alostérica (MacLennan & Kranias, 2003), mientras que cuando PLN es fosforilada, ya sea en el sitio Ser¹⁶ por PKA o Thr¹⁷ por CaMKII, se produce un cambio conformacional que permite su separación de SERCA2a, lo que da como resultado un aumento en la actividad de la bomba (Lindemann

et al., 1983; Lindemann & Watanabe, 1985). Este aumento en la actividad de SERCA2a media el efecto inotrópico positivo por aumento del contenido de Ca^{2+} del RS, así como también posee un efecto lusitrópico positivo (aumento de la velocidad de relajación) por acelerar la disminución del Ca^{2+} citosólico (Kranias Evangelia G. & Hajjar Roger J., 2012).

Modificaciones postraduccionales de SERCa2a y PLN. Se ha demostrado que el estrés oxidativo, ya sea por aumento de ROS o de especies reactivas del nitrógeno (RNS), reduce la contractilidad y disminuye las reservas de Ca^{2+} del RS, debido a la inhibición de SERCA2a (Kaplan et al., 2003; Morris & Sulakhe, 1997). De hecho, varias patologías que cursan con un aumento de estrés oxidativo presentaron una reducción de la actividad de SERCA2a y de la contractilidad. (Balderas-Villalobos et al., 2013; Cohen & Adachi, 2006).

El óxido nítrico (NO) puede activar a la SERCA2a mediante una vía independiente de GMP cíclico que implica la modificación directa de grupos tiol reactivos en la proteína. Por sí solo, el NO es un oxidante débil del grupo SH, sin embargo, en presencia de superóxido (O_2^-) da como resultado la formación de peroxinitrito (ONOO^-). El ONOO^- puede reaccionar con los grupos tiol de proteínas produciendo S-nitrosilaciones y S-glutationilaciones de residuos Cys y aumentar la actividad de la bomba (Adachi et al., 2004). Sin embargo, un aumento exacerbado de ONOO^- nitrosila los grupos hidroxilo de SERCA2a, produciendo deterioro de la relajación cardíaca (J. L. Braun et al., 2019).

La SERCA2a también se ha descrito regulada por otros procesos como la sumoilación, debida a SUMO1 (del inglés *small ubiquitin-like modifier*), la glicación, dada por los AGEs (productos finales de glicosilación) y por procesos de acetilación/desacetilación. Estos complejos pueden comprometer la actividad de la bomba al alterar los movimientos estructurales necesarios para trasladar Ca^{2+} desde el citosol hasta el lumen del RS (Bidasee et al., 2004).

Como se mencionó previamente, el principal regulador de la actividad de SERCA2a es PLN (Tada et al., 1975). Mientras la desfosforilación de PLN reduce la afinidad de SERCA2a por Ca^{2+} , la fosforilación hace lo opuesto. El estado de la fosforilación de PLN depende del equilibrio dinámico entre la actividad de las quinasas y fosfatasas, siendo PP-1 la principal fosfatasa del RS (Steenart et al., 1992). La inhibición de PP-1 da como resultado un aumento fosforilación de PLN y activación de SERCA2a (Haghighi et al., 2015) (**Ilustración 4.2**).

Una de las quinasas capaz de fosforilar a PLN es PKA. Se ha demostrado que durante un estímulo β -adrenérgico, PKA fosforila a PLN en el sitio Ser¹⁶ y simultáneamente inhibe PP-1 a través de la fosforilación de dos proteínas adicionales; inhibidor-1 (I-1) y la proteína de shock

térmico 20 (Hsp20, del inglés *heat shock protein 20*) (Qian et al., 2011). Por otro lado, sumado a la actividad de PKA, durante un estímulo β -adrenérgico también se activa CaMKII que es capaz de fosforilar a PLN en el sitio Thr¹⁷, en condiciones donde PP-1 se encuentra inhibida por PKA (Mundiña-Weilenmann et al., 1996) (**Ilustración 4.2**). Debido a que es necesaria la inhibición de PP-1 por PKA, la fosforilación de Thr¹⁷ no ocurre cuando solo se incrementa el Ca²⁺ intracelular sin activación de PKA (Mundiña-Weilenmann et al., 1996).

Además, PLN puede ser modificada en presencia de ROS o RNS (Bigelow & Squier, 2005; Froehlich et al., 2008). Por ejemplo, hace unos años se ha comenzado a estudiar el componente nitroxilo (HNO), formado a partir de la reducción del NO. Se ha demostrado que esta molécula posee propiedades inotrópicas y lusitrópicas positivas en corazones caninos normales y defectuosos (Paolocci et al., 2003; Sivakumaran et al., 2013). Este efecto, en parte está dado por la regulación de HNO sobre PLN, ya que al utilizarlo se mejoró la actividad de SERCA2a (Froehlich et al., 2008). Asimismo, se ha sugerido que la S-nitrosilación de PLN en Cys³⁶ y Cys⁴¹ modula la regulación de SERCA dependiente de PLN durante un estímulo β adrenérgico (Irie et al., 2015).

Finalmente, varias proteínas reguladoras asociadas con PLN y SERCA2a que contribuyen al control de la bomba han sido estudiadas, como HRC (Arvanitis et al., 2007), que interactúa con SERCA2a y triadina en el lado luminal del RS, HAX-1 (del inglés *cell-specific protein-1 (HS-1) associated protein X-1*) que inhibe la fosforilación de PLN del lado citosólico (Suzuki et al., 1997), y S100A, que en su unión a SERCA2a dependiente del Ca²⁺ citosólico, aumenta la recaptación de Ca²⁺ y el contenido del RS (Kettlewell et al., 2005; Kiewitz et al., 2003) (**Ilustración 4.2**).

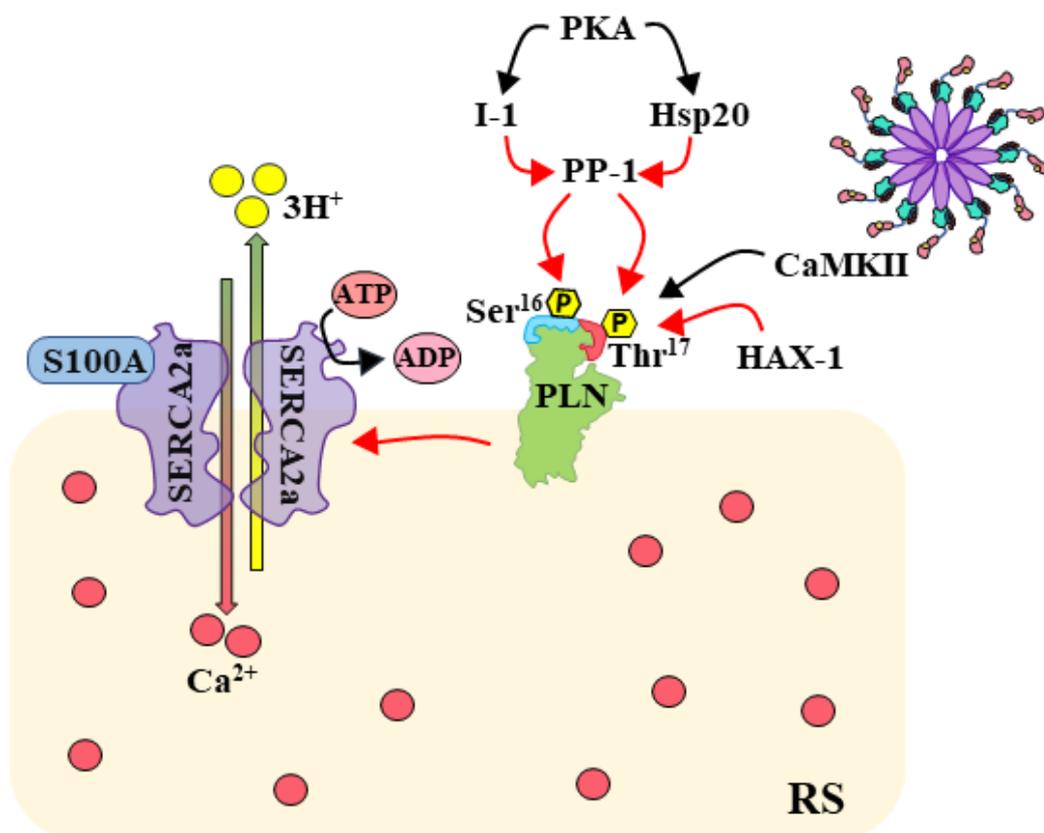


Ilustración 4.2. Esquema de regulación de la bomba SERCA2a.

La bomba SERCA2a se encuentra principalmente regulada por la actividad de PLN. Cuando PLN se encuentra defosforilada se une a SERCA2a, inhibiendo la retoma de Ca^{2+} hacia el RS. PLN tiene dos sitios en los que puede ser fosforilada; en Ser^{16} por PKA, y en Thr^{17} por CaMKII, lo que aumenta la retoma de Ca^{2+} por SERCA2a (flechas negras). Estos sitios también pueden ser defosforilados por PP-1, lo que disminuye la actividad de SERCA2a (flechas rojas). PP-1 a su vez es inhibida por I-1 y Hsp20 (flechas rojas), ambas activadas por la acción de PKA (flechas negras). HAX-1 (del inglés HS-1 associated protein X-1) también participa de la regulación de SERCA2a inhibiendo la fosforilación de PLN. Los círculos rellenos rojos representan los iones Ca^{2+} y los círculos rellenos amarillo representan los iones H^+ . **PKA**: proteína quinasa A, **I-1**: Inhibidor 1, **RS**: retículo sarcoplasmático, **PLN**: fosfolamban, **HAX-1**: proteína X-1 asociada a HS-1, **CaMKII**, enzima dependiente de Ca^{2+} y calmodulina quinasa II, **Hsp20**: proteína de shock térmico 20, **PP-1**: proteína fosfatasa 1.

4.1.3. Alteraciones del manejo del calcio en prediabetes

En trabajos previos del grupo de laboratorio se ha estudiado el manejo de Ca^{2+} y sus alteraciones fueron relacionadas con la producción de arritmias cardíacas. En animales WT DC y prediabéticos, se realizaron electrocardiogramas (ECG) durante 30 minutos, y se observó que los animales WT DC poseían un ritmo sinusal normal mientras que ratones WT prediabéticos

evidenciaron aumento de eventos arritmogénicos como bradicardias y aumento de intervalos de tiempo del ECG (RR, QT y QTc) (Sommese et al., 2016). Además, después de una carga de Cafeína + Epinefrina, para desenmascarar posibles arritmias inducidas por estrés, los animales WT prediabéticos exhibieron transitoriamente al menos una de las siguientes alteraciones en el ECG; fibrilación auricular (FA), bloqueo auriculoventricular, taquicardia ventricular bidireccional, latidos ectópicos ventriculares, taquicardia ventricular sostenida y fibrilación ventricular (Sommese et al., 2016).

En estos mismos estudios, se trató a ratas con la DC y DRF y se estudió el manejo del Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados. El tratamiento con DRF generó alteraciones en el manejo de Ca^{2+} como aumento en el *Fractional Release*, que es la cantidad de Ca^{2+} liberada respecto del Ca^{2+} total contenido en el RS, junto con un aumento en la velocidad de recaptación de Ca^{2+} . Además, al realizar el pulso de Cafeína para evaluar el contenido del RS se observó una disminución en el contenido de Ca^{2+} del RS en las ratas DRF respecto de las DC con un aumento en la actividad estimada de SERCA. Estos cambios en el manejo de Ca^{2+} se asociaron con pérdidas de Ca^{2+} espontáneas en cardiomiocitos de ratas DRF respecto de las ratas DC, que incluso se vieron exacerbadas cuando se inducía estrés en estos cardiomiocitos con isoproterenol (un estimulante β -adrenérgico) (Sommese et al., 2016).

En este contexto de prediabetes en donde se observaron alteraciones en el manejo del Ca^{2+} , que se relacionaron con arritmias cardiacas, **el objetivo de este capítulo fue comprobar la hipótesis de que el manejo del Ca^{2+} citosólico se encuentra alterado en los ratones prediabéticos, siendo responsable de los mecanismos desencadenadores de la apoptosis en estos ratones.**

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Microscopia de epifluorescencia

Los cardiomiocitos aislados fueron incubados con el indicador fluorescente Fura-2-AM (5 μM) por 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad para la medida de Ca^{2+} citosólico.

El Fura-2-AM es un indicador sensible y afin al Ca^{2+} , que posee una constante de disociación (K_D) de 0,14 μM . La unión del extremo acetometil éster (AM) permite que el indicador atraviese la célula en las condiciones normales de carga. Una vez en el citoplasma el Fura-2 queda retenido en la célula y deja de ser permeable, ya que las esterasas endógenas escinden este extremo AM. El Fura-2 posee doble excitación y simple emisión, siendo las dos longitudes de onda (λ) de excitación 380 nm (para el indicador libre) y 340 nm (para el indicador unido a Ca^{2+}) generando una emisión única a $\lambda = 525$ nm. Esta característica permite obtener una emisión de fluorescencia dependiente del Ca^{2+} e independiente de la carga de indicador en la célula medida.

En el uso de indicadores fluorescentes pueden presentarse problemas como: a) alta afinidad al Ca^{2+} ; altas concentraciones pueden funcionar como amortiguadores y generar cambios en el Ca^{2+} intracelular, influyendo por lo tanto en las medidas realizadas; b) compartimentalización del indicador en organelas; si bien este indicador en particular se une al Ca^{2+} citosólico, puede ocurrir que un porcentaje del mismo entre a distintos compartimentos celulares como al RS o mitocondrias; c) desesterificación incompleta del indicador; lo que hace que se registre señal fuera de la célula y contribuye a la fluorescencia insensible a Ca^{2+} ; d) autofluorescencia; los cardiomiocitos tienen autofluorescencia debido a la producción de compuestos como el NADPH, lo que contribuye a la fluorescencia medida (Gryniewicz et al., 1985). Estos problemas pudieron mitigarse con el uso de cardiomiocitos aislados de ratones tratados con la DC, utilizándolos como referencia al analizar el Ca^{2+} para los cardiomiocitos aislados de ratones DRF.

La fluorescencia de Ca^{2+} fue medida con un sistema de epifluorescencia (*Ion Optix*, Milton, MA). Luego de incubar los cardiomiocitos con el indicador, fueron lavados con una solución buffer HEPES (composición: 146.2 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.35 mM NaH_2PO_4 , 1.05 mM MgSO_4 , 11 mM Glucosa, pH = 7.4) con el agregado de 1 mM CaCl_2 . Las células se colocaron en una cámara en un microscopio invertido (Nikon TE 2000-U) en la cual fueron perfundidas con la solución buffer HEPES con el agregado de 2 mM CaCl_2 , con un flujo

constante de 1 ml/min a temperatura ambiente (20 - 22 °C) y estimulados a través de electrodos de platino a una frecuencia de 0,5 Hz. La fluorescencia del Fura-2 fue colectada como un índice del contenido de Ca^{2+} en el citosol.

Además, se midió el acortamiento en estos cardiomiocitos por detección de bordes, mediante el uso de un equipo *Ion Optix*, que posee un detector de movimiento de video para este fin. En cada experimento se seleccionó que el cardiomiocito en estudio posea forma de bastón con sarcómeros definidos y se contrajera correctamente al estimularlo. Se registraron los cambios de Ca^{2+} y acortamiento por 3 minutos mientras se estimulaba la célula a 0,5 Hz.

Una vez finalizados los 3 minutos de registro, se detuvo la estimulación eléctrica (para evitar la entrada de Ca^{2+} por los LTCC) e inmediatamente se realizó un pulso de Cafeína 15 mM (realizado en estado de quiescencia). La Cafeína induce la apertura de los RyR2 y bloquea la actividad de la SERCA2a del RS, lo que genera la liberación masiva de Ca^{2+} del RS e impide su retoma hacia el RS (Kong et al., 2008; Varro et al., 1993). El Ca^{2+} citosólico vuelve a valores diastólicos debido a la actividad del NCX, en condiciones de Na^+ y Ca^{2+} normales. Esto nos permitió realizar una estimación del contenido de Ca^{2+} que posee el RS.

Los registros obtenidos fueron guardados para su posterior análisis *off-line* en el programa *Ion Optix Wizard*. Mediante este se realizó un ajuste matemático de la curva promedio de varios transitorios según la ecuación:

$$f(x) = Ae^{-k_{dec}x} + B$$

donde A es la amplitud del transitorio y B es la fluorescencia basal. A partir de este ajuste se obtuvieron los siguientes parámetros: Ca^{2+} basal, amplitud del transitorio de Ca^{2+} (Amplitud), amplitud del transitorio de Ca^{2+} respecto del Ca^{2+} basal (Amp%BI), constante de decaimiento (k_{dec}), utilizada para calcular velocidad de relajación (τ) del transitorio de Ca^{2+} , que se corresponde con la k_{dec} calculada al 67 % de la relajación y el $t_{1/2}$ que es el tiempo que tarda en recaptarse el 50 % de Ca^{2+} liberado (**Ilustración 4.3**) (Webmaster, 2020).

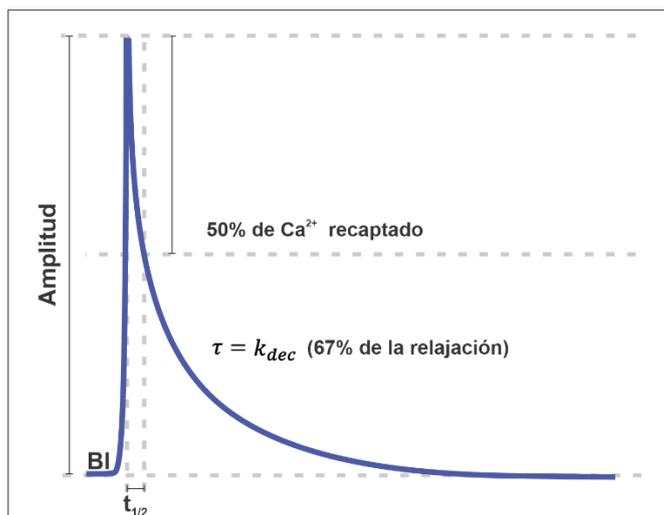


Ilustración 4.3. Esquema de un transitorio de Ca^{2+} con los parámetros calculados.

Bl: Ca^{2+} basal, **Amplitud:** Amplitud del transitorio de Ca^{2+} , **τ :** tau o constante de decaimiento al 67 % de relajación, **k_{dec} :** constante de decaimiento, **$t_{1/2}$:** tiempo medio (que muestra el tiempo que tarda en recaptarse el 50% del Ca^{2+} liberado).

Los mismos parámetros se midieron para la liberación de Ca^{2+} generada a partir del pulso de Cafeína. Para el acortamiento del cardiomiocito sólo se tuvo en cuenta la amplitud de acortamiento respecto de la longitud celular.

La caída de los transitorios de Ca^{2+} se debe a la retoma de Ca^{2+} por la SERCA2a, al NCX funcionado en modo directo, y en menor medida a la captación de Ca^{2+} por la mitocondria a través del MCU y la extrusión por las ATPasas sarcolemas como se mencionó en el **Capítulo 1-Sección 1.5**. Durante el transitorio generado por el pulso de Cafeína, la caída de señal de Ca^{2+} se debe principalmente al funcionamiento del NCX, debido a la inhibición de SERCA2a. Esto nos permitió estimar la actividad de la SERCA2a, restando el τ del pulso de Cafeína del τ del transitorio como se describe en la siguiente formula;

$$\kappa_{SERCA2a} = \frac{1}{\tau_{Ca_iT}} - \frac{1}{\tau_{Caf}}$$

donde $\kappa_{SERCA2a}$ es la actividad estimada de SERCA2a, τ representa la velocidad de decaimiento del transitorio de Ca^{2+} inducido por estímulo eléctrico (Ca_iT) o del transitorio de Ca^{2+} inducido por Cafeína (Caf).

4.2.2. Medida de liberaciones espontáneas de calcio

Las células fueron cargadas con el indicador Fluo-3-AM 10 μM por 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y luego se realizó un lavado en buffer HEPES con 2 mM CaCl_2 . El Fluo-3-AM es una sonda de simple excitación ($\lambda = 506\text{nm}$) y simple emisión ($\lambda = 526\text{nm}$), muy sensible a Ca^{2+} , ya que posee una K_D de 325 nM, y aumenta la emisión de fluorescencia cuando se une al mismo, lo que permite detección de cambios rápidos y de baja concentración de Ca^{2+} , ideal para la medida de liberaciones espontáneas de Ca^{2+} como chispas o *sparks* y ondas de Ca^{2+} . Como se mencionó para el Fura-2-AM, este indicador también posee un extremo acetometil éster que permite que atraviese la membrana celular y quede retenido en el citoplasma.

Una vez cargadas las células, fueron perfundidas en una cámara conectada a un microscopio confocal Zeiss LSM 410, y se estimularon por un minuto a 0,5 Hz para abastecer al RS. Luego la liberación espontánea de Ca^{2+} fue medida en quiescencia y en confocalidad, en el modo barrido lineal durante 10 minutos, excitando con el láser de argón a 488 nm y colectando la fluorescencia por encima de 515 nm. Cada imagen obtenida consiste en líneas de 512 pixeles obtenidas en intervalos de 4 milisegundos. Las imágenes fueron visualizadas con el programa *Image J* utilizando el *plugin Sparkmaster* para medir las proporciones de los *sparks* de Ca^{2+} . A partir de estas imágenes se midió la frecuencia de *sparks* (f_{sparks}) por segundo por 100 μm , y la masa de cada *spark* (M_{spark}) teniendo en cuenta las siguientes formulas:

$$f_{sparks} = \frac{n^{\circ} sparks}{seg \times 100\mu m} \quad M_{spark} = Amp \times FWHM \times FDHM$$

donde *Amp* es igual a la Amplitud del *spark*, FWHM representa el ancho a la mitad de la amplitud máxima (por sus siglas en inglés *full width at half-maximum amplitude*), y FDHM es la duración a la mitad de la amplitud máxima (por sus siglas en inglés *full duration at half-maximum*). La **Ilustración 4.4** muestra estos parámetros.

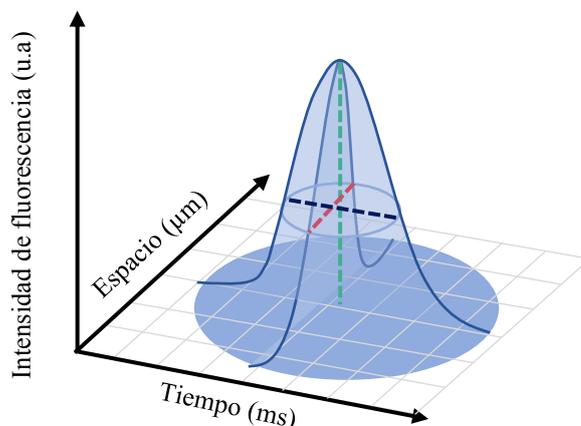


Ilustración 4.4. Esquema representativo de las dimensiones de un spark.

Esquema muestra las 3 dimensiones (3D) de un spark, donde la línea punteada verde representa la amplitud del spark, la línea punteada roja representa el ancho a la mitad de la altura máxima (FWHM, full width half-maximum amplitude) y línea punteada negra representa la duración a la mitad de la altura máxima (FDHM, full duration half-maximum amplitude).

4.2.3. Ensayos de unión de rianodina tritiada

El ensayo de unión de rianodina tritiada ($[^3\text{H}]\text{Ry}$) o *binding* de $[^3\text{H}]\text{Ry}$, por sus siglas en inglés, fue llevado a cabo para evaluar la actividad del RyR2. El fundamento de esta técnica se basa en que el canal se encuentra cerrado a bajas concentraciones de Ca^{2+} y se abre sucesivamente a medida que aumenta el Ca^{2+} en el medio hasta que llega a un *plateau* máximo, en donde todos los canales se encuentran abiertos. El rango de concentraciones en el que esto ocurre se ha estudiado y normalmente se utiliza entre 10 nM y 100 μM Ca^{2+} libre. La rianodina se une al canal cuando el mismo se encuentra en estado abierto por lo que el aumento en la señal de $[^3\text{H}]\text{Ry}$ implica un aumento en la apertura de canales, obteniendo la actividad máxima o *binding* máximo a altas concentraciones de Ca^{2+} . Al utilizar concentraciones de Ca^{2+} crecientes, si la curva de *binding* $[^3\text{H}]\text{Ry}$ presenta un *plateau* mayor, esto implica una mayor actividad máxima o V_{max} del RyR2.

Los homogenatos fueron preparados como se explica en *Preparación de homogenato*. y se determinaron las proteínas por el *Método de Bradford* como se detalla en el *APÉNDICE I*.

Para preparar las muestras para realizar el ensayo de *binding* de $[^3\text{H}]\text{Ry}$ los μl correspondientes para obtener 50 μg finales de proteína de los homogenatos de corazón y de las células cultivadas

(ver 0 y 2.2.3. , respectivamente), fueron colocados en 50 μ l buffer de *binding* (composición: 200 mM KCl, 20 mM Na-HEPES, pH = 7.4). Conjuntamente se agregó el volumen de [³H]Ry (*Perkin Elmer*, Boston, MA, USA) para obtener una concentración de 6,5 nM, y suficiente CaCl₂ y el quelante EGTA para que la relación final aporte una concentración de Ca²⁺ libre de 10 nM, 100 nM, 316 nM, 1 μ M, 3.16 μ M, 10 μ M, y 100 μ M. La relación Ca²⁺/EGTA fue calculada con el programa MaxChelator (<https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/>). Este preparado para cada tubo de reacción con una concentración de Ca²⁺ específica, se realizó por duplicado. En un tercer tubo de reacción se colocaron los mismos reactivos mencionados, pero en presencia de 20 μ M rianodina sin marcador radioactivo (MP Biomedicals), para evaluar el pegado inespecífico. La reacción de *binding* de [³H]Ry fue incubada 2 horas en baño termostático a 37 °C y en agitación. Pasado el tiempo de incubación, se filtraron las soluciones mediante el uso de filtros *Whatman* (GF/B), remojados previamente con agua bidestilada. Los filtros fueron lavados 3 veces con agua bidestilada con el uso de un cosechador Brandel M24-R. Luego las muestras retenidas en los filtros fueron incubadas una noche con líquido de centelleo. Finalmente, el *binding* de [³H]Ry se determinó mediante la lectura en un contador de centelleo. Las curvas fueron normalizadas según la concentración de proteínas para calcular la V_{max}. Para expresar y analizar los datos se utilizó el programa *Origin 9* (*Origin Lab, Northampton, MA, USA*). Los resultados fueron ajustados matemáticamente con la ecuación de Hill:

$$y = V_{max} \frac{x^n}{x^n + k^n}$$

donde; *V_{max}* es el máximo alcanzado, *x* representa la concentración de Ca²⁺, *k* es una constante y *n* es el coeficiente de Hill.

4.3. Resultados

4.3.1. Manejo del calcio citosólico

Para el estudio del manejo de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados (ver *Aislamiento de cardiomiocitos*) de corazones prediabéticos, se midió el Ca^{2+} citosólico mediante la fluorescencia del indicador de Fura-2-AM utilizando un sistema de epifluorescencia (*Ion Optix*, Milton, MA).

La **Figura 4.1.a** muestra un registro típico obtenido de la fluorescencia que producen los transitorios de Ca^{2+} , estimulando eléctricamente a los cardiomiocitos a 0,5 Hz, y el transitorio de Ca^{2+} inducido por el pulso de Cafeína, utilizado para estimar el contenido de Ca^{2+} del RS. En la **Figura 4.1.b** se observa el acortamiento celular medido por detección de bordes. Los trazos en negro corresponden a cardiomiocitos aislados de animales WT DC y en verde a los DRF. Para una mejor visualización, en los recuadros rojos de la **Figura 4.1** se muestra magnificado un solo transitorio de Ca^{2+} (**i**) y el pulso de Cafeína (**ii**), donde se marcó con una línea punteada (fucsia para DC y azul para DRF) el decaimiento de cada pico.

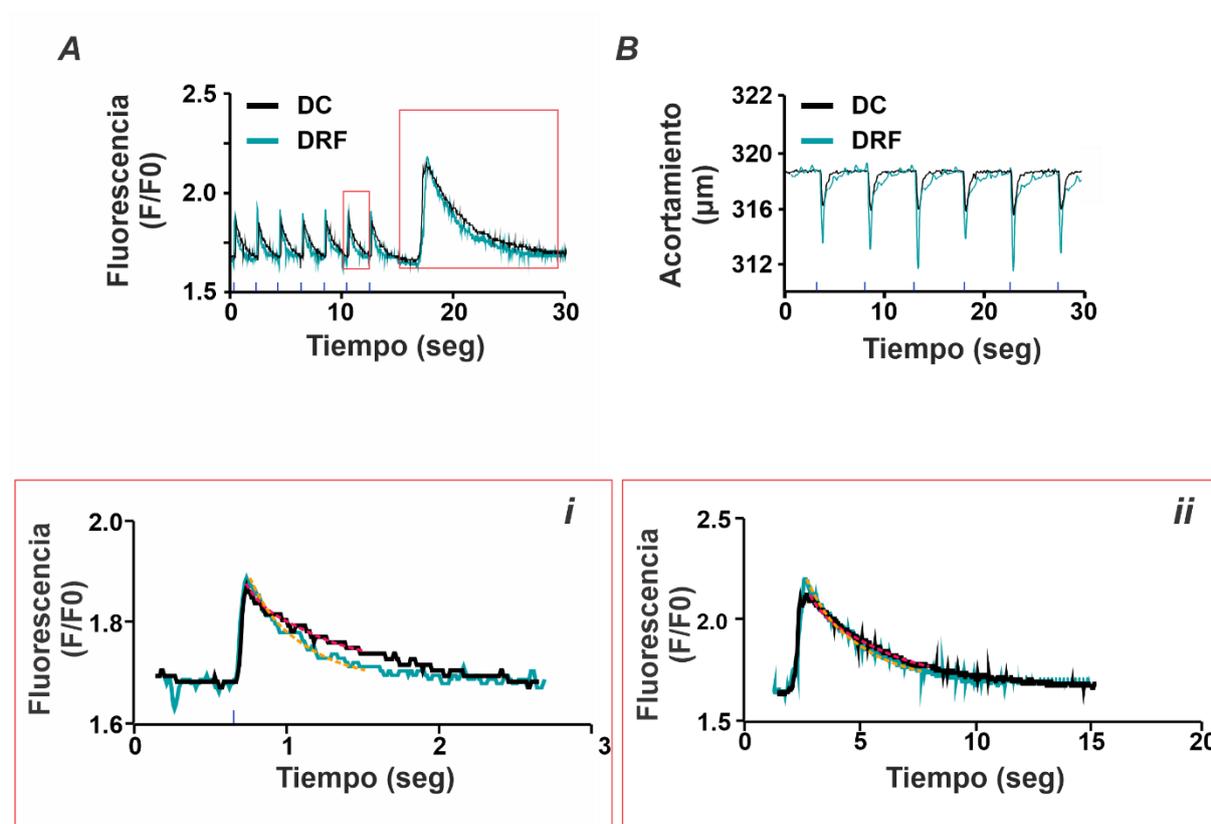
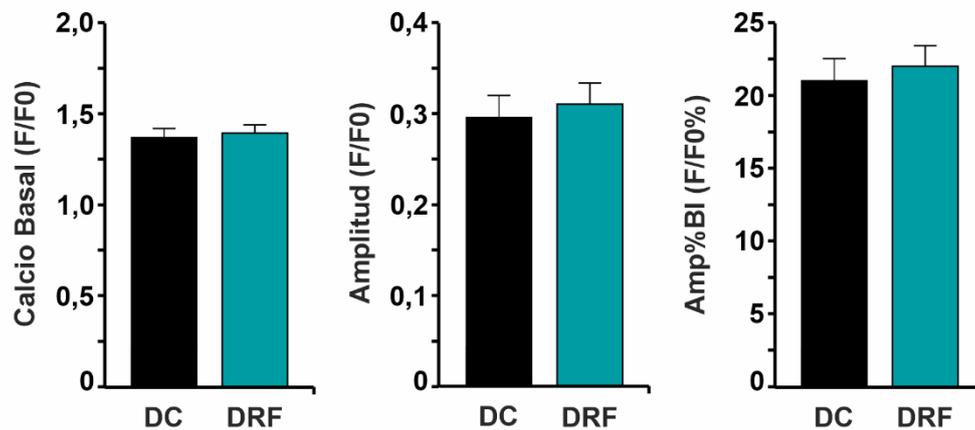


Figura 4.1. Registros representativo de la medida de calcio citosólico y acortamiento celular. **A,** Registro representativo obtenido de cardiomiocitos aislados de animales WT DC (curva negra) y DRF (verde), cargados con Fura-2-AM y estimulados eléctricamente a 0,5 Hz de frecuencia. Luego de medir el transitorio de Ca^{2+} , se dejó de estimular al cardiomiocito y se realizó un pulso de Cafeína (15 mM) para estimar el contenido de Ca^{2+} del RS. En los recuadros (i) e (ii) se magnificó un transitorio de Ca^{2+} inducido por el estímulo eléctrico y el transitorio de Ca^{2+} inducido por el pulso de Cafeína, respectivamente, marcando el decaimiento exponencial de cada pico con una línea punteada; fucsia para DC y naranja para DRF. **B,** Registro representativo del acortamiento celular de los cardiomiocitos estimulados eléctricamente a 0,5 Hz de frecuencia. **DC:** dieta control, **DRF:** dieta rica en fructosa, **F/F0:** fluorescencia/fluorescencia basal.

En la **Figura 4.2.a**, se muestran los resultados promedios obtenidos de todos los cardiomiocitos estudiados. El transitorio de Ca^{2+} de los cardiomiocitos de animales WT DRF no presentó cambios en el Calcio Basal, en la Amplitud, ni en la amplitud de pico representada en porcentaje del Ca^{2+} basal (Amp%BI). En cuanto al acortamiento, se encontró un aumento en el acortamiento de los cardiomiocitos DRF respecto del acortamiento promedio de cardiomiocitos de ratones DC (**Figura 4.2.a**). A su vez, cuando se analizaron los parámetros del decaimiento del transitorio de Ca^{2+} , relacionados con la recaptación de Ca^{2+} por el RS y la actividad del NCX, se encontró una disminución en el $t_{1/2}$ y en el tau (τ , representa la constante de decaimiento de los transitorios calculada al 67%) en cardiomiocitos de animales WT DRF respecto DC, lo que indica una recaptación más rápida de Ca^{2+} (**Figura 4.2.b**).

A



B

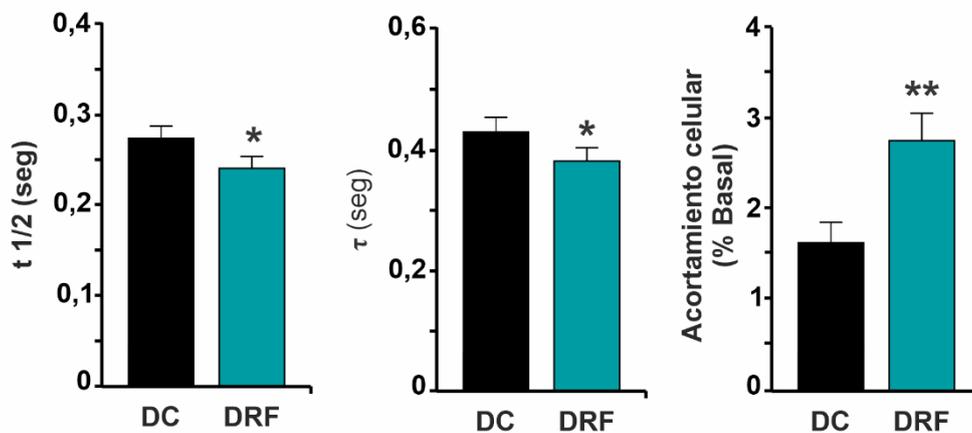


Figura 4.2. La prediabetes genera alteraciones en la velocidad de recaptación de Ca^{2+} y acortamiento de cardiomiocitos aislados.

Gráficos de barra promedio de los parámetros obtenidos de los transitorios de Ca^{2+} estimulando a los cardiomiocitos eléctricamente a 0,5 Hz. **A**, de izquierda a derecha; Calcio Basal, Amplitud del transitorio de Ca^{2+} (Amplitud), y Amplitud del transitorio de Ca^{2+} respecto del calcio basal (Amp%BI). **B**, de izquierda a derecha tiempo medio ($t_{1/2}$), tau (τ) del transitorio de Ca^{2+} y el acortamiento celular representado en % de la longitud basal. Las barras representan los datos promedio \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 30 - 42$ cardiomiocitos de 3 – 6 ratones por grupo.

Los cambios en la liberación y recaptación de Ca^{2+} pueden verse influenciados o generar modificaciones en el contenido de Ca^{2+} del RS. Este se estimó realizando un pulso de Cafeína 15 mM, que activa al unísono todos los RyR2, generando una liberación masiva del Ca^{2+} contenido en el RS, y a su vez inhibe la recaptación de Ca^{2+} por la SERCA (Kong et al., 2008; Varro et al., 1993), por lo que la caída del transitorio de Ca^{2+} inducido por Cafeína es un índice indirecto de la actividad del NCX. No hubo diferencias en la amplitud del transitorio del pulso de Cafeína en los animales tratados con DRF respecto de los animales DC (como puede

apreciarse en el registro representativo mostrado en la **Figura 4.1**), pero si se observaron cambios en la velocidad de recaptación del Ca^{2+} . Como se observa en la **Figura 4.3** se encontró disminuido el $t_{1/2}$ y el τ , lo que indica un aumento en la velocidad de recaptación de Ca^{2+} en el transitorio producido por el pulso de Cafeína en animales tratados con la DRF, demostrando una mayor actividad del NCX.

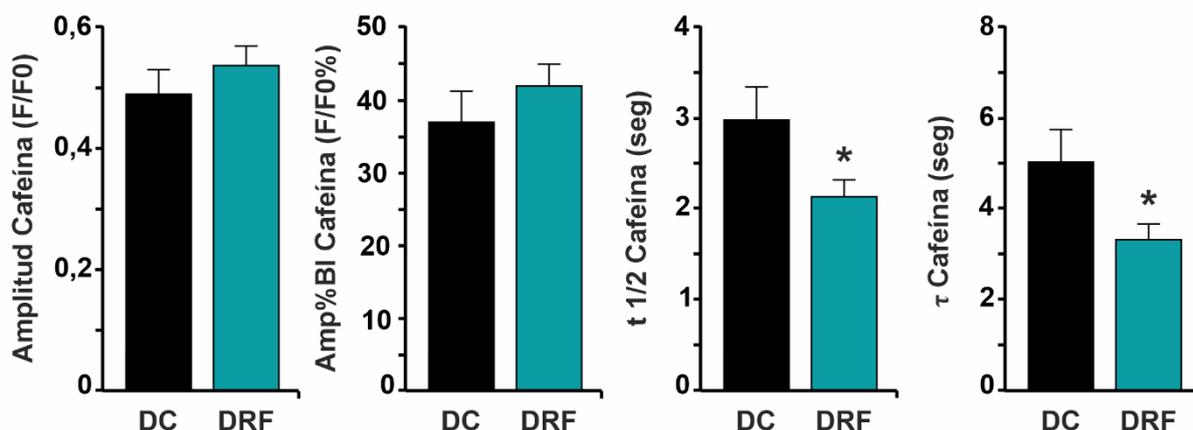


Figura 4.3. Parámetros del transitorio de Ca^{2+} generado por el pulso de Cafeína. Se midieron los parámetros del transitorio de Ca^{2+} generado por un pulso de Cafeína 15 mM. De izquierda a derecha; Amplitud del transitorio de Ca^{2+} inducido por un pulso de Cafeína (Amplitud Cafeína), Amplitud respecto del calcio basal (Amp%BI Cafeína), tiempo medio ($t_{1/2}$ Cafeína) y tau (τ Cafeína). **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. Las barras representan los datos promedio \pm SEM. * $p < 0,05$, $n = 15 - 29$ cardiomiocitos de 3 - 6 ratones por grupo.

A partir de estos datos se calculó el porcentaje de Ca^{2+} liberado respecto del contenido en el RS o *fractional release* (FR). El FR se encontró aumentado en los animales DRF, lo que muestra que, si bien el contenido de Ca^{2+} del RS no se ve modificado respecto de los animales DC, si hay un aumento de Ca^{2+} liberado respecto del contenido total que presentaron (**Figura 4.4**).

Por otro lado, debido a que la caída de los transitorios de Ca^{2+} se debe a la retoma de Ca^{2+} por la SERCA2a y al NCX funcionado en modo directo, mientras que la caída del transitorio de Ca^{2+} inducido por el pulso de Cafeína sólo se debe a la actividad del NCX, se puede estimar la actividad de SERCA2a. Para calcular la actividad de SERCA2a estimada (κ SERCA2a), se restó la inversa del τ del transitorio de Ca^{2+} inducido por el pulso de cafeína de la constante de decaimiento del transitorio de Ca^{2+} provocado mediante el estímulo eléctrico, como se explicó

en la sección *Microscopia de epifluorescencia*. La κ SERCA2a se encontró aumentada en los ratones DRF respecto de los ratones DC (*Figura 4.4*).

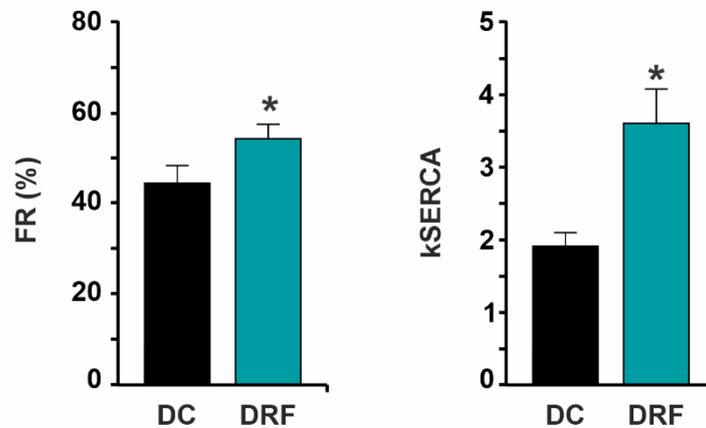


Figura 4.4. La prediabetes aumenta la liberación de calcio respecto del contenido de calcio del retículo sarcoplasmático y la actividad de SERCA2a.

Gráfico de barras del Fractional Release y la actividad estimada de SERCA. El FR es el porcentaje de Ca^{2+} que se libera del RS respecto del contenido de Ca^{2+} total del mismo. $kSERCA$ es calculada como la diferencia entre la caída durante el transitorio de Ca^{2+} , que se encuentra dada por la retoma de Ca^{2+} por la SERCA2a y al NCX, y la caída del transitorio de Ca^{2+} inducido por el pulso de Cafeína, que sólo se debe a la actividad del NCX. Se encontró un aumento de ambos parámetros en los cardiomiocitos de ratones tratados con DRF respecto de los cardiomiocitos de ratones tratados con DC. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa, **FR**: fracción liberada, **kSERCA**: actividad estimada de SERCA2a. * $p < 0,05$, $n = 15 - 29$ cardiomiocitos de 3 - 6 ratones por grupo.

4.3.2. Pérdidas espontáneas de calcio

Debido a que en ratas tratadas con la DRF se encontraron arritmias relacionadas con una pérdida de Ca^{2+} , estudiamos las pérdidas de Ca^{2+} desde el RS en los corazones prediabéticos de ratón mediante el uso de microscopia confocal. Para esto, se aislaron cardiomiocitos de ratones WT, DC y DRF, y se estudiaron los cambios rápidos en las liberaciones de Ca^{2+} por microscopia confocal. La *Figura 4.5.a* muestra imágenes representativas del escaneo lineal para estos cardiomiocitos de ratones tratados con DC y DRF, y en la *Figura 4.5.b* los resultados promedio obtenidos para los eventos espontáneos de liberación de Ca^{2+} (SCaRE, del inglés *spontaneous Ca²⁺ release events*). Los SCaRE representan: los *sparks* o chispas de Ca^{2+} , producidas cuando se abre un *cluster* de RyR2; ondas de Ca^{2+} , generadas a partir de la apertura de varios *clusters* de RyR2; y/o contracciones espontáneas, debido a estas liberaciones de Ca^{2+} masivas de forma simultánea. Los SCaRE se contabilizaron y normalizaron respecto del área celular y el tiempo de escaneo lineal, y se expresaron como SCaRE/100 μm x seg. Como puede observarse en los datos promedio, los cardiomiocitos de ratones tratados con DRF presentaron

un aumento en la frecuencia de *sparks*, ondas y contracciones espontáneas. Usualmente la frecuencia de *sparks* se normaliza por el contenido de Ca^{2+} del RS, ya que, si este cambia, puede aumentar o disminuir la cantidad de *sparks*. En estos experimentos debido a que el contenido de Ca^{2+} del RS resultó el mismo en cardiomiocitos DC y DRF (ver **Figura 4.3**), se asumió que este parámetro no afectó los datos obtenidos para la frecuencia de *sparks*.

De cada *spark* de Ca^{2+} se midieron distintos parámetros como se observa en la **Figura 4.5.c**; la Amplitud (F/F_0), el ancho a la mitad de la altura máxima (FWHM, *full width half-maximum amplitude*), el diámetro a la mitad de la altura máxima (FDHM, *full duration half-maximum amplitude*), y la pérdida de Ca^{2+} mediada por *sparks*, definida como la frecuencia de *sparks* x la masa de *spark* (para más información de las fórmulas utilizadas ver las **sección 4.2.2.**). En los cardiomiocitos de animales DRF los *sparks* presentaron un aumento en la Amplitud, y disminución en el FWHM y el FDHM. Aunque estos últimos parámetros fueron menores en los *sparks* producidos en cardiomiocitos aislados de ratones DRF, se observó un aumento en el *leak* o pérdida de Ca^{2+} . Posiblemente dado que el incremento en la frecuencia de *sparks* es tan alto, se encuentre compensando la disminución en el FWHM y FDHM otorgando un mayor *leak* final.

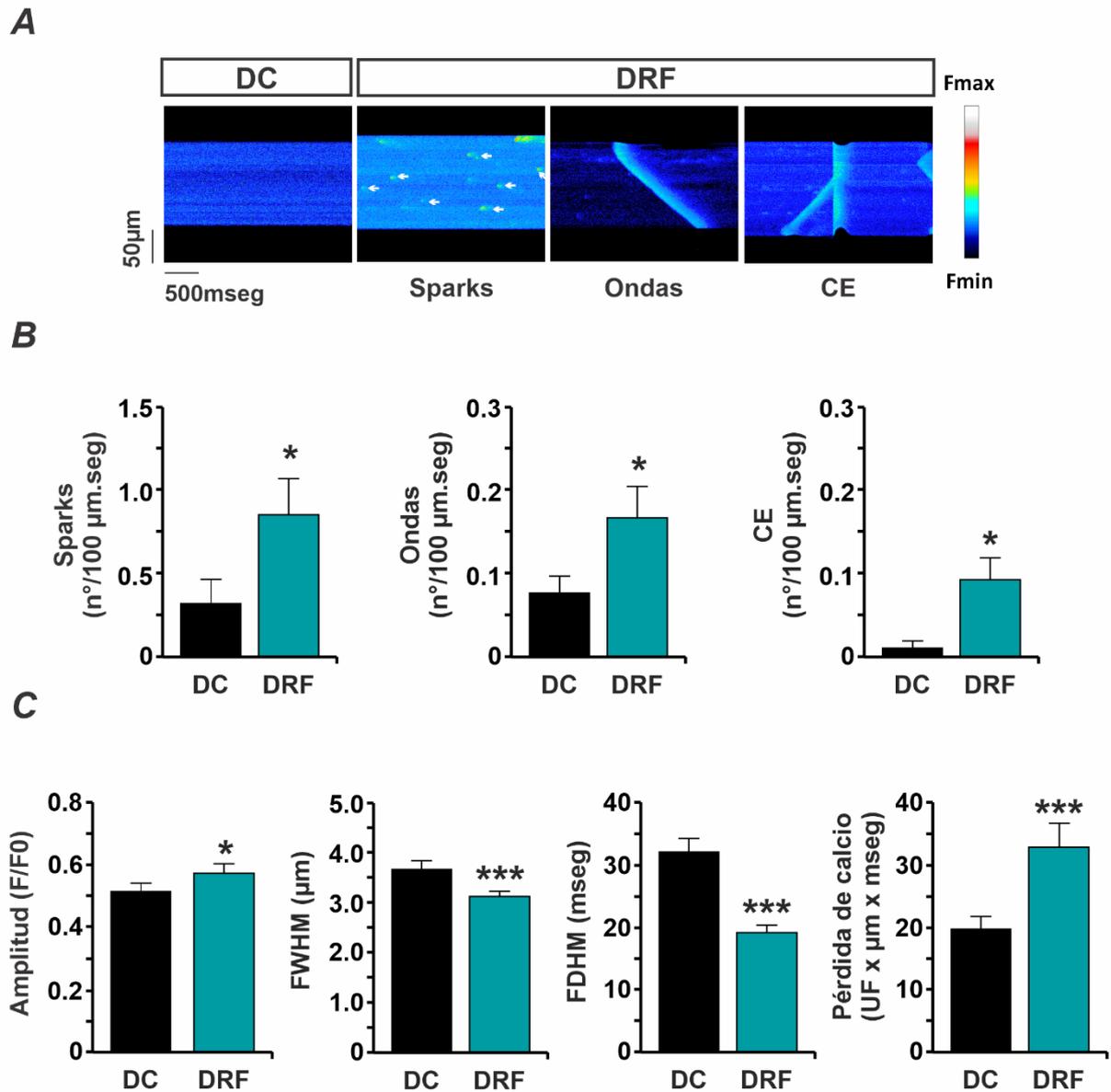


Figura 4.5. Los cardiomiocitos de ratones prediabéticos presentan liberaciones espontáneas de Ca^{2+} .

A, Imágenes representativas de microscopía confocal en modo lineal de cardiomiocitos de ratones WT, DC y DRF, que muestran sparks (marcadas con flechas blancas) de Ca^{2+} , ondas de Ca^{2+} , y contracciones espontáneas, en los cardiomiocitos de ratones WT DRF. **B,** Frecuencia de sparks, ondas y contracciones espontáneas promedio en cardiomiocitos de ratones WT, DC y DRF. **C,** Parámetros de los sparks, de izquierda a derecha Amplitud (F/F0), el ancho a la mitad de la altura máxima (FWHM) y la duración a la mitad de la altura máxima (FDHM), la pérdida de Ca^{2+} mediada por sparks (UF x μ m x seg) que es igual a la masa de sparks (calculada como; $M_{spark} = \text{Amplitud} \times \text{FWHM} \times \text{FDHM}$) por la frecuencia promedio de los mismos. **WT:** wild type o cepa salvaje, **DC:** dieta control, **DRF:** dieta rica en fructosa, **CE:** contracciones espontáneas, **FWHM:** full width half-maximum amplitude, **FDHM:** full duration half-maximum amplitude. Promedio \pm SEM, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, $n = 6 - 9$ cardiomiocitos de 3 ratones por grupo.

4.3.3. La actividad del RyR2 se encuentra aumentada en células HEK293 tratadas con alta glucosa y en corazones prediabéticos

Debido a que las liberaciones de Ca^{2+} del RS se producen a través de la apertura de los RyR2, para investigar el mecanismo de la pérdida de Ca^{2+} se evaluó la actividad del RyR2 mediante el *Ensayos de unión de rianodina tritiada*. Los ensayos se realizan utilizando distintas concentraciones de Ca^{2+} crecientes, en los rangos que han sido descrito y permiten un aumento de la apertura del RyR2 y la unión de la $[\text{}^3\text{H}]\text{Ry}$.

Los ensayos de unión de la $[\text{}^3\text{H}]\text{Ry}$ se realizaron en un modelo *in vitro* de células HEK293 inducibles en condiciones de GN (glucosa normal) y glucosa alta (GA), y en homogenatos de corazones de ratones WT tratados con DC y DRF.

En la *Figura 4.6.a* se muestran las curvas promedio obtenidas para las células HEK293, cultivadas en el medio de GN o GA, junto con los resultados promedio de las V_{max} (actividad máxima), donde puede observarse un aumento de este parámetro del RyR2 en las células expuestas a un medio de GA respecto de las GN.

Al igual que en el modelo *in vitro*, los corazones prediabéticos también presentaron un aumento en la actividad máxima del RyR2 respecto de los corazones DC (*Figura 4.6.b*).

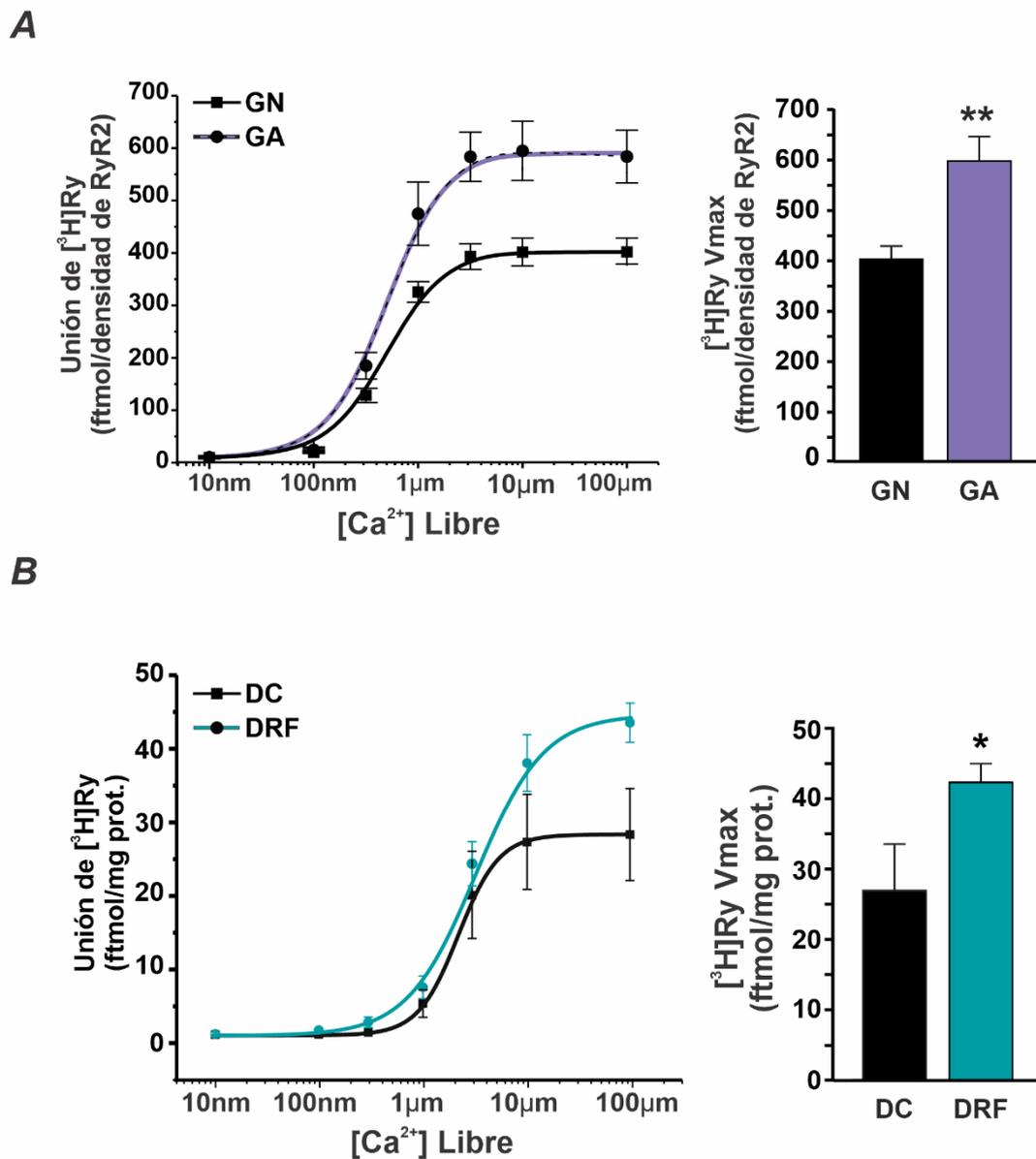


Figura 4.6. La exposición a glucosa alta y la prediabetes generan un aumento de la actividad de los RyR2 expresados en células HEK293 y en corazones de ratones prediabéticos.
A, Curvas de unión de Rianodina tritiada normalizada por la densidad de RyR2 en células HEK293 que expresan RyR2 recombinantes expuestas a glucosa normal y glucosa alta. En los gráficos de barras se observan los resultados promedio de la actividad máxima del RyR2 o V_{max} . **B**, curvas de unión a $[^3H]Ry$ normalizadas por miligramo de proteína, de homogenatos de corazones de animales WT DC y DRF, y gráficos de barras con los resultados promedio de V_{max} . **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa, $[^3H]Ry$: rianodina tritiada, **GN**: glucosa normal, **GA**: glucosa alta. * $p < 0,05$, ** $< 0,01$, $n = 6$ por grupo

4.4. Conclusión y discusión

En los experimentos realizados para estudiar el manejo de Ca^{2+} se evidenció que en los cardiomiocitos de ratones DRF no se presentaron cambios en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} respecto de los cardiomiocitos de ratones DC. Sin embargo, sí se produjo un aumento en el acortamiento celular, y en el FR en los cardiomiocitos de ratones DRF. Esto demuestra una mayor liberación de Ca^{2+} respecto del contenido total de Ca^{2+} en el RS, que afecta la sensibilidad de las proteínas contráctiles generando mayor acortamiento celular. El FR mayor puede deberse a un aumento en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} o una disminución en el contenido de Ca^{2+} del RS. No obstante, en este trabajo no encontramos diferencias significativas en ninguno de estos parámetros. Lo que sí observamos es un aumento en el ciclado de Ca^{2+} (mayor pérdida de Ca^{2+} con mayor retoma por SERCA2a), como se discutirá en detalle, que puede estar influenciando al FR.

Los cardiomiocitos de ratones tratados con la DRF presentaron una mayor velocidad en la recaptación de Ca^{2+} , tanto en el transitorio de Ca^{2+} inducido por estimulación eléctrica como en el transitorio de Ca^{2+} inducido por un pulso de Cafeína. Esto demuestra que, en los cardiomiocitos aislados de animales prediabéticos, se produce un aumento en la actividad de la SERCA2a, también evidenciado en el cálculo de la actividad estimada de SERCA (kSERCA). Cuando SERCA2a presenta una mayor velocidad de recaptación de Ca^{2+} , es posible que aumente el contenido de Ca^{2+} del RS (Diaz et al., 2005; Eisner D. A. et al., 2000), y que este contenido genere una mayor salida de Ca^{2+} en el siguiente transitorio. Este efecto de mayor contenido y por ende mayor salida de Ca^{2+} en el transitorio, se debe a que como se mencionó, los RyR2 se encuentran regulados por proteínas como CSQ2 o HRC, que participan como sensores de Ca^{2+} luminal (I. Györke et al., 2004; Sacchetto et al., 1999). Al medir el contenido de Ca^{2+} del RS mediante pulsos de cafeína, no se encontraron diferencias en la Amplitud del transitorio generado. Esto posiblemente se deba a que como se mostró en los experimentos de microscopia confocal, los cardiomiocitos de animales prediabéticos presentaron un mayor “leak” o pérdida de Ca^{2+} . En conjunto el análisis de los resultados muestra que en los cardiomiocitos de ratones prediabéticos se produce un aumento de lo que llamamos ciclado de Ca^{2+} : hay un aumento en la retoma de Ca^{2+} del RS, que activa la pérdida de Ca^{2+} del mismo, generando nuevamente mayor retoma, y produciendo finalmente más Ca^{2+} en el citoplasma en diástole, sin cambios en el contenido del RS.

Por otro lado, el *leak* de Ca^{2+} seguramente se corresponde con el un aumento de la actividad de RyR2 observado, demostrado con los experimentos de *binding* de [^3H]Ry. El RyR2 puede activarse por varios mecanismos, pero fundamentalmente se produce por un aumento de la carga de Ca^{2+} del RS o un aumento a la sensibilidad del Ca^{2+} . Como fue mencionado en la introducción del presente capítulo, la regulación del RyR2 es muy compleja, pero al no encontrar aumento en el contenido de Ca^{2+} del RS, deducimos que el aumento de sensibilidad del canal es lo que genera la mayor apertura del mismo y pérdida de Ca^{2+} .

Los cambios en el ciclado de Ca^{2+} pueden activar muchas proteínas reguladoras de los procesos que ocurren en el cardiomiocito, necesarios tanto para la contracción como para el metabolismo celular, por lo que estas alteraciones podrían ser el comienzo de los efectos deletéreos que generen la muerte celular en los corazones prediabéticos. En el **Capítulo 7** se continúa el estudio de los mecanismos por el cual el RyR2 se encuentra hiperactivo.

Capítulo 5. Remodelamiento del tejido cardiaco prediabético

5.1. Introducción

5.1.1. Organización del tejido cardiaco

La estructura cardiaca se encuentra estrictamente organizada de manera compacta. Como es conocido la mayor parte del corazón está formada por el miocardio, compuesto por tejido muscular estriado cardiaco, con células musculares cardiacas o cardiomiocitos principalmente. Los cardiomiocitos se diferencian del musculo estriado esquelético en varios aspectos, pero principalmente, son células más chicas, ramificadas, que se comunican por uniones desmosómicas. Estas uniones se encuentran en zonas llamadas discos intercalares, donde las dos membranas celulares se unen y se denotan claramente en las imágenes de MET. Dentro de los cardiomiocitos también se encuentra una ultraestructura particular que sigue un patrón específico. Los miofilamentos se ubican de forma longitudinal, paralelos al eje de la célula, y mediante MET pueden distinguirse diferentes zonas que describen la estructura de los sarcómeros. Como se muestra en la fotografía de MET de la **Ilustración 5.1** un sarcómero se ve delimitado entre dos líneas Z, que se observan como una zona transversal más electrodensa y oscura (Franzini-Armstrong, 1973). Cercana a la línea Z, se presenta una zona clara que se corresponde con los miofilamentos finos, luego una zona más oscura, correspondiente al solapado de filamentos gruesos y finos, y una zona central más clara, que se corresponde únicamente a los filamentos gruesos. En el centro del sarcómero, se encuentra la banda H que se observa como una sección clara con una banda oscura central, la línea M, donde se unen los filamentos gruesos de miosina (Challice & Virágh, 2013) (**Ilustración 5.1**). La bandas y líneas descriptas se muestran en el esquema inferior a la imagen de un sarcómero obtenido por MET en la **Ilustración 5.1**.

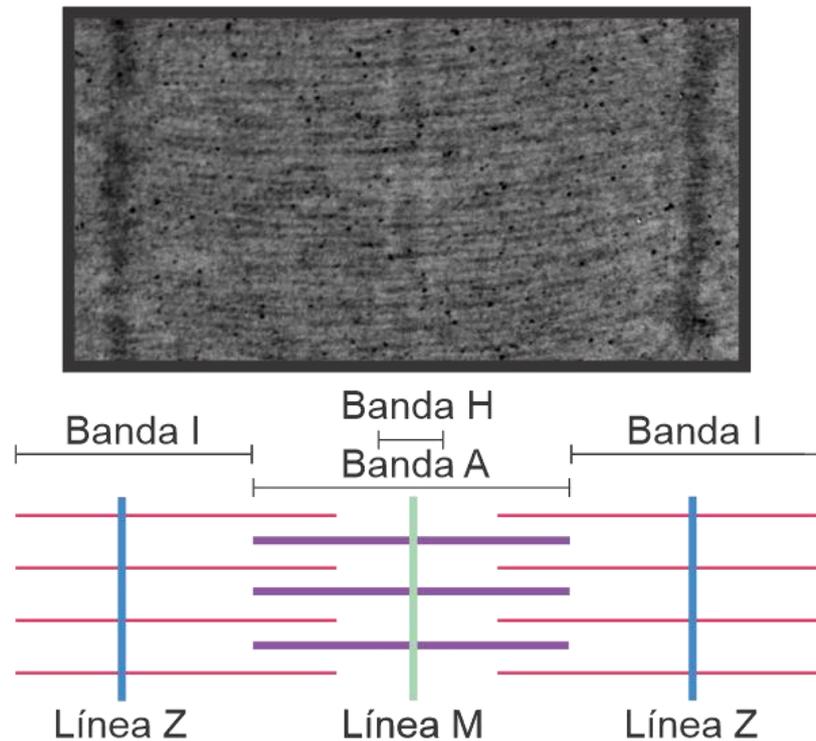


Ilustración 5.1. Unidad contráctil del cardiomiocito: Sarcómero.

Imagen de microscopia electrónica de transmisión (MET) de tejido cardiaco junto con un esquema que muestra la organización del sarcómero, y las bandas y líneas observadas. Cada sarcómero se encuentra delimitado entre dos líneas Z (azul). Las zonas en que delimitan una línea Z y filamentos finos de actina (fucsia) forman la banda I. La banda A se encuentra conformada principalmente por filamentos gruesos de miosina (violeta), y contiene la línea M (verde) y la banda H. La banda H se forma por la línea M y filamentos gruesos de miosina.

Debido a que el corazón requiere altos niveles de energía los cardiomiocitos presentan un gran número de mitocondrias dispersas en todo el tejido. Las mitocondrias ubicadas cercanas a la membrana plasmática o sarcolema se denominan sub-sarcolemales (SSM, del inglés *subsarcolemmal mitochondria*), aquellas mitocondrias que rodean al núcleo son las perinucleares, y las que se ubican en las cercanías a los miofilamentos, en hileras a la par de los sarcómeros, se denominan mitocondrias intermiofibrilares (IMF). Las mitocondrias se distinguen como organelas oscuras, de tamaño variable, con doble membrana, siendo la membrana interna la que se ubica formando las crestas mitocondriales en el interior de la organela (**Ilustración 5.2**).

El corazón posee también un sistema de túbulos, la membrana se invagina en ciertas zonas, formando lo que se conoce como túbulo T, que pueden observarse en un corte longitudinal del tejido, como una luz circular, cerca de los miofilamentos, ubicados cercanos a una línea Z. Además, los cardiomiocitos poseen un RS desarrollado, que funciona principalmente como un reservorio de Ca^{2+} , y mediante MET puede observarse como espacios menos electrodensos de

diferentes tamaños, más pequeños que los túbulos T, rodeados por una membrana y ubicados cerca de los miofilamentos (conocido como *network RS*) o cercano al túbulo T (*jRS*, *junctional RS*) (*Ilustración 5.2*) (Chalice & Virágh, 2013).

En cuanto al núcleo, se ha descrito que un cardiomiocito puede tener de uno a tres núcleos. Estos se observan como espacios oscuros, rodeados por una doble membrana. En las cercanías del núcleo se observan también mitocondrias, denominadas en este caso mitocondrias perinucleares (Chalice & Virágh, 2013).

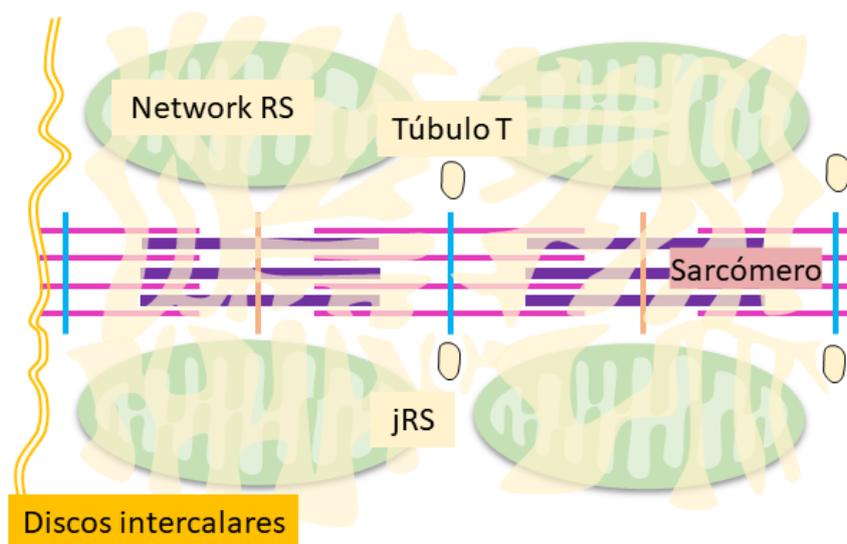


Ilustración 5.2. Esquema de la ultraestructura cardíaca.

En el esquema se muestra la ubicación de los miofilamentos (rosa y violeta) formando los sarcómeros (delimitados por las líneas Z en celeste) con las mitocondrias organizadas entre ellos. El sistema de túbulos (amarillo) se muestra en amarillo. Los túbulos T se ven transversales a los miofilamentos, cercanos a la línea Z. El junctional RS se ubica junto al túbulo T para formar lo que se conoce como diada, y el network RS distribuido en todo el cardiomiocito. El disco intercalar señala la conjunción de las membranas de dos cardiomiocitos (naranja). **jRS**: junctional RS.

5.1.2. Alteraciones en la organización tisular

El remodelamiento cardíaco se ha observado en distintos modelos patológicos como la constricción aortica (S. Kim et al., 2020), isquemia/reperfusión (Yanagiya et al., 1994) y cardiomiopatía dilatada (Olkowski et al., 2020). Mediante MET se ha descrito que en estas patologías se produce un desordenamiento, con formación de vacuolas, agregados proteicos en el citoplasma, agregados de glucógeno, con cambios en la distribución de mitocondrias, degradación de la matriz y membrana mitocondrial, y miofibrillas interrumpidas, respecto de

los corazones animales controles (S. Kim et al., 2020; Olkowski et al., 2020; Yanagiya et al., 1994). Se ha encontrado que las mitocondrias de estos cardiomiocitos pierden no sólo la estructura de sus crestas, sino que también pierden su función al cambiar su morfología. Además, en el modelo de constricción aortica se describe una disminución en la relación RS-mitocondria otorgando la responsabilidad de esto a la proteína mitofusina 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2), ya que se observó una disminución en su expresión y en la colocalización con RyR2 (S. Kim et al., 2020). El rol de las Mfn1 y 2 se ha estudiado en los últimos años debido a que se comenzó a notar que además de su rol característico o canónico en la fusión mitocondrial, estas proteínas tienen otras funciones no canónicas. Un rol no canónico de las mitofusinas es encargarse de conectar y relacionar a la mitocondria con otras mitocondrias y con otras organelas como el RE/RS (Csordás et al., 2006; Csordás & Hajnóczky, 2009; García-Pérez et al., 2011). La comunicación del RS-mitocondria a su vez es sumamente importante dado que en las zonas de contacto de estas organelas, llamadas MAMs (del inglés, *mitochondria-associated membranes*) se intercambian metabolitos como AG, moléculas señalizadoras como ROS y Ca^{2+} , entre muchas otras, de vital importancia para el funcionamiento del ECB y del cardiomiocito en general (Csordás et al., 2006; Csordás & Hajnóczky, 2009; García-Pérez et al., 2011). En las MAMs se encuentran una variedad amplia de proteínas como VDAC (del inglés *voltage dependent anion channel*), Grp75 (del inglés *glucose-regulated protein 75*), Mfn1, Mfn2, Inf2 (del inglés *inverted formin 2*), Actina, entre muchas otras, que participan de los intercambios de metabolitos y la comunicación entre organelas (Csordás et al., 2018).

Debido a que nuestro modelo aborda cambios en el corazón previo al desarrollo de la CMD, el remodelamiento cardiaco podría desencadenarse como una primera medida de prevención, o como una consecuencia patológica en estos corazones. Es así es que, nos propusimos estudiar el remodelamiento cardiaco y cambios en la ultraestructura cardiaca, de los miofilamentos, las mitocondrias y en el sistema de túbulos, para poder discernir si estos cambios pueden ayudar a prevenir los disturbios cardiacos producidos en la CMD, o son la base molecular de las alteraciones que se producen finalmente en la CMD.

Es así como el objetivo específico de este capítulo fue caracterizar el remodelamiento cardiaco en animales tratados con la DRF y estudiar la relación RS-mitocondria en los corazones prediabéticos.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Microscopia electrónica de transmisión

Preparación de las muestras para MET. Los corazones de los animales destinados para esta técnica se extrajeron y se lavaron rápidamente en buffer HEPES (146.2 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.35 mM NaH₂PO₄, 1.05 mM MgSO₄, 11 mM Glucosa, pH = 7.4) para eliminar los restos de sangre de las arterias coronarias. Luego, se separó el ventrículo izquierdo del derecho y de las aurículas. El ventrículo izquierdo se embebió en glutaraldehído (2 % v/v) a 4 °C y se cortó en láminas siguiendo el recorrido de las fibras cardiacas. Estas láminas luego fueron cortadas transversalmente para generar muestras de 1 mm³. Tanto la base como el ápex fueron descartadas.

Una vez hecha la primera fijación, cada muestra fue lavada en buffer fosfato (168 mM Na₂HPO₄, 49 mM NaH₂PO₄) y post-fijadas en OsO₄ (1 % v/v) por 1 hora a 4 °C. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en series graduadas de alcohol (desde alcohol 50° hasta acetona), se embebieron en resina epoxy (Spurr, 1969) y se dejaron polimerizar a 60°C por 24 horas. De los cortes semifinos se realizaron cortes ultrafinos con ultramicrotomo (Ultracut R; Leica EM UC7), los cuales se montaron en grillas y fueron teñidos con una solución de acetato de uranilo y citrato de plomo (1% v/v) (Reynolds, 1963). Las grillas fueron examinadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200 Zeiss usando una cámara digital (Erlangshen ES1000) para la toma de imágenes.

Análisis de las imágenes. La distancia entre el RS y las mitocondrias se midió en imágenes tomadas con una magnificación de 80000x. Para este análisis se eskeletonizó tanto el RS como las mitocondrias con el programa *ImagePro Plus software (v6.3 Media Cybernetics, Rockville, MD, USA)*, mediante el bordeado de las organelas para delimitar la membrana. Una vez hecho esto, se trazaron al menos 10 líneas perpendiculares entre las membranas de dos organelas adyacentes para contabilizar la distancia promedio.

5.2.2. Determinación de la expresión de proteínas

La determinación de proteínas que comunican el RS con la mitocondria, que se ubican en los microdominios entre ambas organelas, se determinó mediante *western blot* como se menciona en la **sección Western blot**, utilizando anticuerpos primarios Anti-VDAC, Anti-Mfn2 y Anti-Grp75 (para más información ver la **Tabla 0.1.**) en homogenatos de tejido cardiaco. GAPDH o Na⁺/K⁺ ATPasa, fueron utilizadas como control de carga.

5.3. Resultados

5.3.1. Remodelamiento en el tejido cardiaco de animales prediabéticos

Para evaluar si efectivamente se producía este remodelamiento tisular y su posible efecto en la cascada apoptótica se realizaron fotografías del tejido cardiaco en un microscopio electrónico de transmisión como fue detallado anteriormente.

Al observar las micrografías de tejido cardiaco de ratones WT tratados con DC, se reconoce una distribución ordenada de las mitocondrias en un arreglo del tipo “hileras” entre los miofilamentos, como se describió en la introducción, que comúnmente es el perfil encontrado en el tejido cardiaco. El análisis de las micrografías de tejido cardiaco de ratones WT tratados con DRF muestra que este patrón se pierde, y las mitocondrias se organizan en “clusters” o cúmulos y los miofilamentos no respetan el direccionamiento lineal. Si bien el análisis cuantitativo de este desarreglo es complejo, fue consistente en todas las micrografías tomadas como se observa en la **Figura 5.1**.

Este desarreglo tisular de los corazones de ratones tratados con DRF se encontró asociado a un aumento en el número de vacuolas presente en el tejido (señalizadas con flechas fucsias en la **Figura 5.1**) que es muestra de los procesos deletéreos que está el corazón prediabético (Olkowski et al., 2020). Las mitocondrias en su proceso de degradación poseen distintos estadios que van desde la pérdida de las crestas en ciertos puntos, pasando por un estadio en donde se pierde por completo la membrana interna, pero se conserva la membrana externa, hasta la formación final de una vacuola. Las vacuolas formadas se ven como un espacio claro, rodeado por una fina membrana (Chaanine, 2019). En el tejido cardiaco de animales tratados con la DRF se observaron este tipo de estructura, que pueden ser el resultado final de la degradación mitocondrial. Sumado a esto, y como se retomará en el **Capítulo 6** las mitocondrias presentaron espacios entre las crestas que se condice con *swelling* mitocondrial, uno de los estadios intermedios de esta degradación.

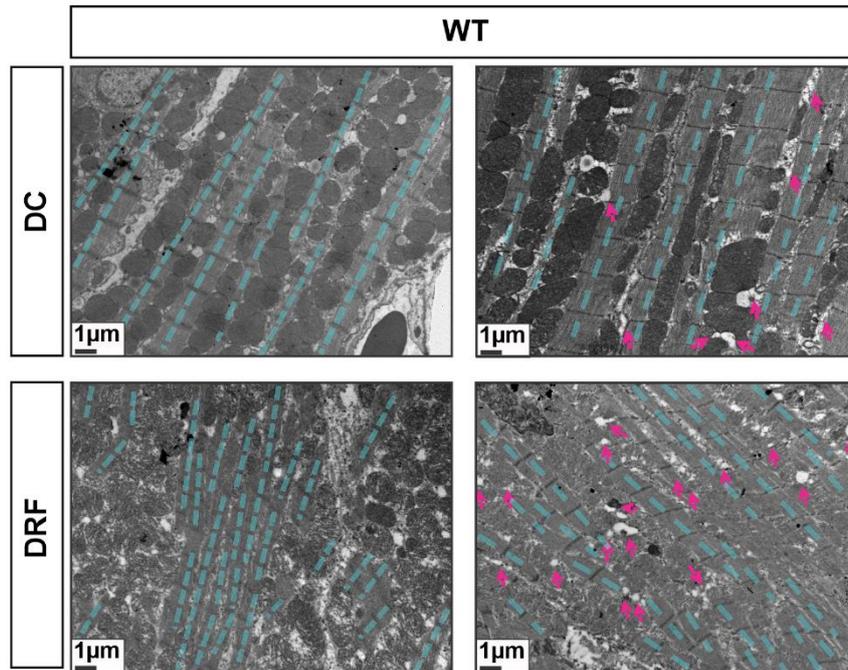


Figura 5.1. La prediabetes produce un desarreglo del corazón prediabético asociado a una mayor formación de vacuolas.

Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (MET) de muestras de tejido cardíaco de ratones WT, DC y DRF, en magnificación de 12000x. Las líneas punteadas celestes muestran la disposición de las miofibrillas en el tejido, rodeadas lateralmente por mitocondrias. Las flechas fucsias marcan las vacuolas en el tejido. La disposición de las miofibrillas está alineada con las mitocondrias en los tejidos de ratones WT tratados con DC, mientras que este patrón se encontró desordenado en los corazones de ratones WT tratados con DRF, con una mayor formación de clusters o cúmulos mitocondriales. El número de vacuolas se observó aumentado en las muestras de corazones de ratones WT tratados con DRF respecto de corazones de ratones WT tratados con DC. La barra de escala para todas las figuras representa 1 μm. **WT**: wild type, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa.

Por otro lado, en las micrografías tomadas de los corazones de animales tratados con la DRF se hallaron lisosomas, que no se observaron en ninguna de las micrografías tomadas para los corazones de ratones tratados con DC (**Figura 5.2**). Los lisosomas son la principal maquinaria encargada de la degradación proteica y se han relacionado con los procesos necesarios para desencadenar la autofagia, por lo que su número aumenta en presencia de daño cardíaco (Xuejun Wang & Robbins, 2014).

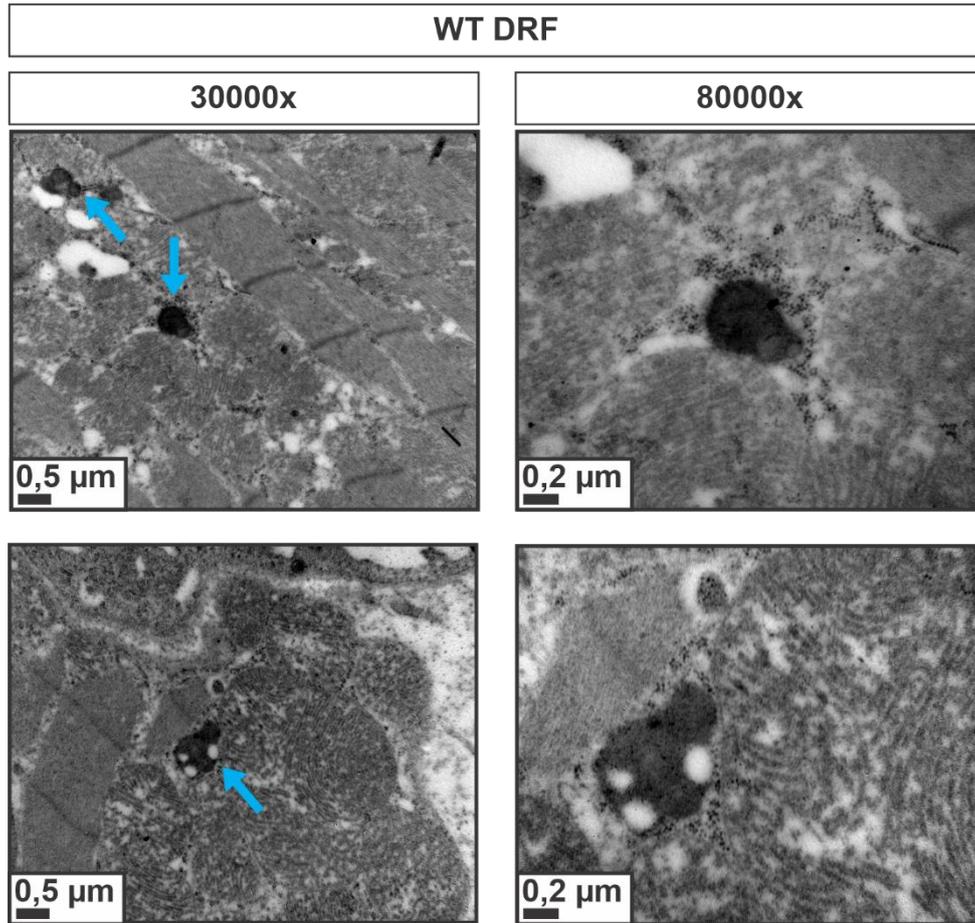


Figura 5.2. Lisosomas.

Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (MET), a 30000x y 80000x de magnificación, de los lisosomas observados solamente en tejido cardiaco de ratones tratados con la DRF. Los lisosomas se encuentran señalados con flechas celestes. DRF: dieta rica en fructosa, WT: wild type.

Además, se observó claramente que el tejido cardiaco de ratones tratados con la DRF exhibe un aumento en el número de gránulos de glucógeno en el citoplasma respecto de los corazones de

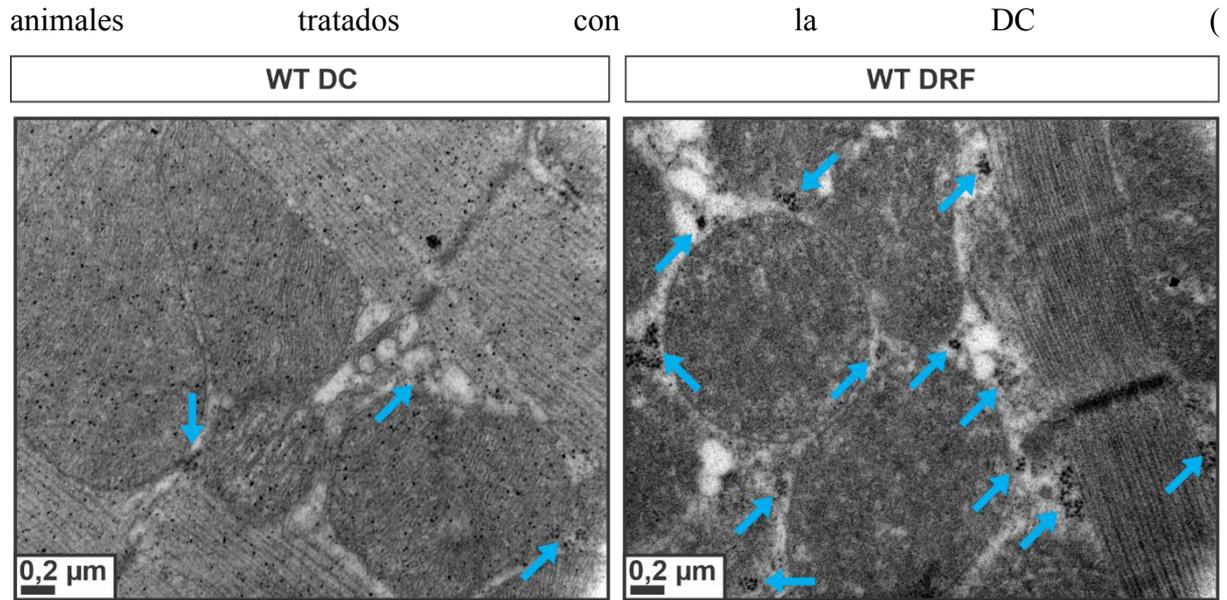


Figura 5.3). Esta observación es consistente con lo que ocurre con el metabolismo de los cardiomiocitos durante la CMD. En patologías crónicas donde el corazón se ve afectado, los cardiomiocitos dejan de utilizar AG para obtener ATP a partir del metabolismo de la glucosa, por lo que los reservorios de glucosa disminuyen (Stanley et al., 2005; Yanagiya et al., 1994). A diferencia de esto, en la CMD, el corazón no puede utilizar glucosa debido a la presencia de insulino-resistencia. Es así que la producción de ATP se debe casi exclusivamente al uso de AG, la glucólisis se encuentra inhibida por la misma vía de utilización de AG, y la glucosa se acumula, siendo almacenada en gránulos de glucógeno (Fillmore et al., 2014).

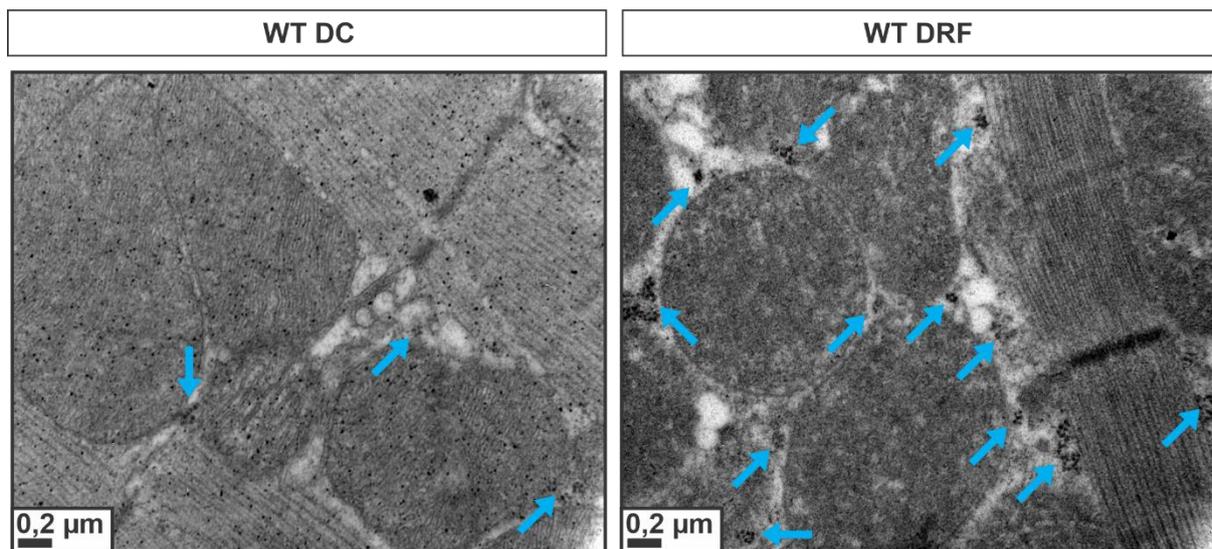


Figura 5.3. Gránulos de glucógeno.

Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (MET), en donde se observan marcados con flechas celestes los cúmulos de glucógeno. En los tejidos cardiacos de ratones tratados con la DRF (derecha) hay un aumento del número de cúmulos respecto de los tejidos de ratones DC (izquierda). **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa, **WT**: wild type.

5.3.2. El remodelamiento del tejido se acompaña de un acercamiento entre el RS y la mitocondria

Al estudiar en más extensión la organización del tejido cardiaco, para evaluar la relación entre el RS y la mitocondria, se encontró una disminución en la distancia que separa el RS de la mitocondria. La **Figura 5.4.a** muestra una figura representativa de MET de 80000x de magnificación, en donde se eskeletonizó la membrana del RS en azul y se coloreo la zona que separa el RS de la mitocondria para una mejor visualización. Los datos promedios indican una disminución en la distancia en los corazones de ratones tratados con la DRF de alrededor de 10 - 20 nm respecto de los corazones de ratones DC (**Figura 5.4.b**).

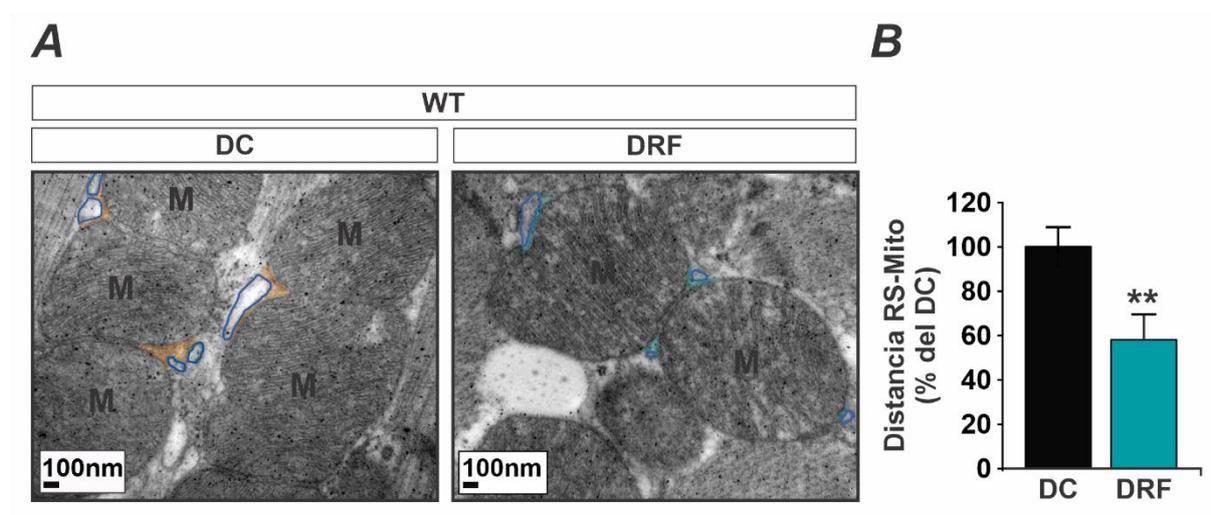


Figura 5.4. La prediabetes disminuye la distancia entre RS y mitocondria.

A, Fotografías representativas de microscopía electrónica de transmisión (MET) de tejido cardiaco de ratones WT tratados DC o DRF. Las mitocondrias fueron señalizadas con la letra "M", la membrana del RS fue eskeletonizada con una línea azul y la distancia RS-mitocondria se indicó en naranja para el tejido cardiaco de WT DC y verde para WT DRF. **B**, datos promedio obtenidos de la contabilización de distancia entre el RS expresados en porcentaje del DC. Se produjo una disminución de la distancia RS-mitocondria en los ratones WT DRF respecto de los ratones WT tratados con DC. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa, **WT**: wild type. Promedio \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. De 10 - 20 mediciones de 3 - 4 ratones por grupo.

5.3.3. La disminución de distancia entre organelas se debe a un aumento de la expresión de proteínas que participan de esta comunicación

Es conocido que la mitocondria se encuentra en estrecho contacto con el RS/RE y esta comunicación podría estar influenciando la cascada apoptótica. Como se mencionó, la relación entre las organelas se encuentra mediada por distintas y variadas proteínas que se ubican en las MAMs, entre las que se han descripto Grp75 y Mfn2 (Csordás et al., 2006, 2018). El jRS se ubica junto al túbulo T, próximo a los LTCC, enfrentado a las mitocondrias en zonas donde el canal VDAC es abundante, formando una relación directa entre organelas. Esta comunicación genera una vía ideal para el tráfico de Ca^{2+} desde el RS a la mitocondria (Csordás et al., 2018; Csordás & Hajnóczky, 2009). Por lo tanto, el siguiente paso para investigar esta relación fue evaluar cómo están involucradas estas proteínas en la proximidad del RS y la mitocondria de corazones prediabéticos. Como muestra la **Figura 5.5** la expresión de las proteínas Mfn2, Grp75, y VDAC se encontró aumentada en los tres casos en los corazones de ratones WT tratados con DRF respecto de los ratones WT tratados con DC.

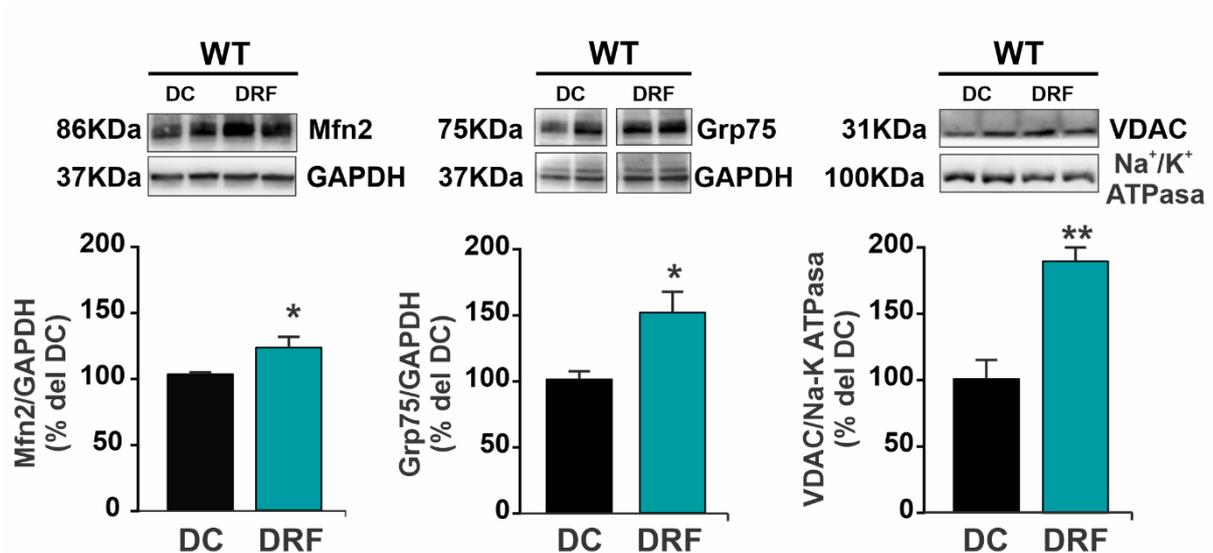


Figura 5.5. La prediabetes genera un aumento de la expresión de proteínas que participan en la comunicación entre el RS y la mitocondria.

Immunoblots representativos y resultados promedio de la expresión de Mfn2, Grp75, y VDAC en corazones de ratones WT tratados con DC o DRF. Se observó aumento en la expresión de las proteínas examinadas en los corazones de ratones WT DRF respecto de los corazones de animales tratados con DC. **DC:** dieta control, **DRF:** dieta rica en fructosa, **Mfn2:** mitofusina 2, **Grp75:** glucose-regulated protein 75, **VDAC:** voltage dependent anion channel. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 4 - 6$ por grupo.

5.4. Conclusión y Discusión

Estos resultados en conjunto demuestran que hay un remodelamiento cardiaco estructural deletéreo en la prediabetes. La distribución de mitocondrias en la cercanía a los miofilamentos en el miocardio, las mitocondrias IMF, favorece la llegada rápida de ATP producido por la organela a los sarcómeros vecinos. Mientras en los corazones de ratones tratados con la DC presentan este patrón, la DRF genera un agrupamiento de mitocondrias en cúmulos o *clusters*, en donde algunas mitocondrias estarán cerca de los sarcómeros y otras se verán rodeadas de mitocondrias. Este hecho puede influir en el buen funcionamiento del acoplamiento ECB.

En la CMD existen cambios en la contracción cardiaca, que generan tanto disfunción diastólica como sistólica, en donde se han observado cambios en la ultraestructura cardiaca (Lacombe et al., 2007; B. Luo, Li, Wang, Liu, Liu, et al., 2014; B. Luo, Li, Wang, Liu, Xia, et al., 2014). Es decir que, el remodelamiento cardiaco que ocurre en la prediabetes, puede agravarse, siendo el comienzo de la insuficiencia cardiaca que ocurre durante la DM.

El remodelamiento cardiaco se vio asociado a aumento en el número de vacuolas, la presencia de lisosomas y gránulos de glucógeno. Si bien parecen hechos aislados, son un conjunto de observaciones que refieren a la patogénesis de la prediabetes en el corazón. El aumento de vacuolas y presencia de lisosomas es normalmente asociado a eventos deletéreos producidos en el miocardio (Olkowski et al., 2020; I. Varga et al., 2018; Zhao et al., 2012), ya que están directamente relacionados con la muerte celular y la alteración mitocondrial. Sumado a esto, las mitocondrias también presentan alteraciones, signos de *swelling* o hinchamiento, que pueden afectar tanto su morfología, como su función y acoplamiento a las demás organelas y al aparato contráctil (se describirá en detalle en el **Capítulo 6**). A su vez, los depósitos de glucógeno muestran como la insulino-resistencia producida en los estadios tempranos de la DM, también afectan en el metabolismo de los cardiomiocitos, lo que impacta directamente en la contracción debido a la eficiencia que cada metabolito posee para la producción de ATP.

Por otro lado, mediante MET se midió y vio disminuida la distancia entre RS-mitocondria en el tejido cardiaco de ratones prediabéticos respecto de los ratones controles, indicando una mayor interacción entre ambas organelas. Esta distancia es sumamente importante para la función mitocondrial, ya que como se describió previamente, estos microdominios entre organelas participan en el intercambio de metabolitos y moléculas señalizadoras (Csordás et al., 2006, 2018). Además, en diferentes tejidos, se requiere Grp75 para formar complejos de

canales VDAC/Grp75/IP₃R (Patergnani et al., 2011), que favorecen el tráfico de Ca²⁺ desde el RS/RE a la mitocondria. Nuestros resultados sugieren que el aumento de la expresión de las proteínas como Mfn2, VDAC y Grp75 podría estar involucrado en este acercamiento y en el tráfico de metabolitos como Ca²⁺ y ROS. Este hallazgo es relevante en la cascada apoptótica, ya que implica un estrecho contacto entre el RS y la mitocondria, que podría favorecer el tráfico de Ca²⁺ y la posterior activación de los mecanismos apoptóticos como apertura del mPTP. Además, la mayor comunicación podría facilitar la exportación de ROS desde la mitocondria hacia este microdominio, alterando el estado redox de otras mitocondrias (Zorov et al., 2000) y de las proteínas que allí se encuentran, entre ellas CaMKII.

Finalmente, las observaciones mediante MET en el tejido cardíaco de ratones prediabéticos, indica que estos corazones ya presentan disturbios, observados como un desordenamiento de la disposición de los componentes tisulares cardíacos, con cambios en la relación entre organelas y modificaciones en el metabolismo de los cardiomiocitos. La posible causa de estos hallazgos se discutirá en el **Capítulo 8**, sin embargo, cabe resaltar que durante la prediabetes ya se desencadenan cambios estructurales en el corazón.

Capítulo 6. Rol de la mitocondria en el corazón prediabético

6.1. Introducción

Como se introdujo en el *Capítulo 1*, la mitocondria es una organela de doble membrana, abundante en el tejido cardiaco (~37 %). Uno de sus principales roles es la de producir ATP, necesario para la contracción y otras funciones celulares, pero también es la encargada de la producción moléculas señalizadoras, como los ROS, Ca^{2+} , y otros, y se encuentra involucrada en variadas vías de señalización celular. La producción de ATP está dada a partir del uso de NADH o fumarato por la ETC (cadena transportadora de electrones) que se encuentra acoplada a la F_0F_1 -ATP sintasa en la membrana interna mitocondrial (IMM, del inglés *inner mitochondria membrane*). Los sustratos para la ETC se obtienen a partir del ciclo de *Krebs* o TCA al cual ingresa Acetil CoA por el metabolismo de dos componentes, los AG y glucosa. Por lo tanto, las mitocondrias tienen un papel esencial en la patogénesis de la DM, la CMD y en la prediabetes, donde el uso de estos metabolitos se encuentran alterados. Como se mencionó, el corazón adquiere la mayor parte de su energía mediante la oxidación de AG y cambia su metabolismo a la oxidación de la glucosa en condiciones patológicas (Sharma et al., 2004; S. Y. Wang et al., 2020). Sin embargo, en la DM, el uso de glucosa está limitado debido a la presencia de la insulino-resistencia. En consecuencia, el corazón se ve obligado a usar AG casi exclusivamente para generar ATP y esto sobrecarga las mitocondrias y las somete a estrés oxidativo (Christoffersen et al., 2003; M. E. Hall et al., 2014). Estas alteraciones pueden influir en la producción de ATP y por ende en la contracción cardiaca, además de regular otros procesos como la biogénesis mitocondrial modulando la actividad de PPAR γ (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) y a PGC1 α (coactivador 1 α de PPAR γ) [197], que a su vez también afectan la contracción cardiaca. Se ha observado que en presencia

de PGC1 α se genera un aumento en la producción de ATP, mientras que la disminución de su expresión genera lo opuesto (Arany et al., 2005).

Por otro lado, las mitocondrias se encuentran cercanas al RS en los cardiomiocitos y participan en la captación de una pequeña fracción de Ca²⁺ durante cada latido del corazón (Gisela Beutner et al., 2005). El Ca²⁺ liberado del RS en los microdominios cercanos a las mitocondrias estimula la captación de Ca²⁺ mitocondrial. El canal VDAC ubicado en la membrana mitocondrial externa (OMM, del inglés *outer mitochondria membrane*) y el MCU (transportador de Ca²⁺ mitocondrial) en la IMM, con los principales encargados de conducir al Ca²⁺ desde los microdominios a la matriz mitocondrial (Csordás et al., 2006; de Brito & Scorrano, 2008). Dado que varias enzimas del ciclo TCA son activadas por Ca²⁺ en la matriz mitocondrial, es importante mantener la captación de Ca²⁺ mitocondrial para garantizar un buen acoplamiento ECB eficiente. Las interrupciones en el acoplamiento ECB efectivo pueden dar como resultado efectos perjudiciales tanto a nivel mitocondrial como celular, incluida la desregulación de Ca²⁺, falla energética, estrés oxidativo, daño celular y muerte (Brookes et al., 2004).

A continuación, se describirán los transportadores iónicos mitocondriales, el funcionamiento de la ETC, la producción de ATP y ROS por la mitocondria y la dinámica mitocondrial, junto con una breve introducción de los antecedentes de alteraciones en estos parámetros en corazones diabéticos.

6.1.1. Transportadores iónicos mitocondriales

Para mantener la homeostasis mitocondrial, las mitocondrias poseen varios transportadores iónicos que mantienen un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), la concentración de H⁺ en el microdominio, el pH mitocondrial tanto en la matriz como en el espacio intermembrana, la concentración de Ca²⁺, y la concentración de Na⁺, entre otros. Los principales transportadores relacionados con el Ca²⁺ mitocondrial, un ion muy importante para la función cardíaca, son MCU, el NCLX (intercambiador Na⁺/Ca²⁺/Li⁺), el mHCX (intercambiador H⁺/Ca²⁺ mitocondrial), y el mPTP, que se compone de varias proteínas y puede ser activado por Ca²⁺ y ROS y desencadenar la muerte celular.

Bajo condiciones fisiológicas, la captación de Ca²⁺ mitocondrial es mediada principalmente por el complejo MCU y ocurre mediante un proceso electrogénico conducido por un $\Delta\Psi$

característico que se encuentra entre -150 y -180 mV, generado por el bombeo de H^+ hacia el espacio intermembrana por la ETC (Paolo Bernardi, 1999; Santo-Domingo & Demareux, 2010). Este proceso a su vez puede verse favorecido por la interacción entre las mitocondrias con el RS/RE, en las MAMs (membranas asociadas a mitocondrias). Las MAMs fueron mencionadas brevemente en el **Capítulo 5**, y son de suma importancia ya que en estos microdominios se produce el traspaso de diferentes moléculas entre las organelas que funcionan como moléculas señalizadoras. Para el pasaje de Ca^{2+} se ha encontrado una relación entre el IP_3R (receptor de IP_3) del RE con la proteína GRP75, que ancla ambas organelas y VDAC, que permite el paso de Ca^{2+} al espacio intermembrana mitocondrial (Szabadkai et al., 2006). Debido a que el Ca^{2+} puede favorecer la producción de ATP (al activar enzimas del ciclo TCA) o generar la apertura del mPTP, la captación de Ca^{2+} mitocondrial es estrictamente regulada. La acumulación de Ca^{2+} dentro de la mitocondria se contrarresta por los intercambiadores NCLX (W. Li et al., 1992) y mHCX (Gunter et al., 1991) que extruyen el Ca^{2+} desde la matriz mitocondrial intercambiándolo por Na^+ o H^+ (Csordás et al., 2012; Rimessi et al., 2008), o puede liberarse a través de la apertura del mPTP en un proceso deletéreo (**Ilustración 6.1**). Los transportadores más importantes relacionados a nuestros estudios como el MCU y el mPTP se describirán en mayor detalle a continuación.

Complejo MCU. El complejo MCU es un canal ubicado en la IMM que se encarga de ingresar Ca^{2+} a la matriz mitocondrial. Este canal es un transportador de baja afinidad por el Ca^{2+} , con alta selectividad y conductancia de Ca^{2+} (Kirichok et al., 2004). Se encuentra formado por diferentes subunidades que generan el poro propiamente dicho por el cual atraviesa el Ca^{2+} y otras proteínas encargadas de modular la apertura del canal. Inicialmente se ha descrito que una sola molécula de MCU no puede formar *per se* el poro del complejo MCU, sino que se presenta en oligómeros arreglados en tetrámeros (Pallafacchina et al., 2018; Raffaello et al., 2013). Estos oligómeros se relacionan con una proteína codificada por el mismo gen que codifica para MCU, nombrada MCUB. MCUB es un regulador negativo de la apertura del complejo MCU, ya que se ha observado que su presencia y sobreexpresión disminuye la actividad del canal en ensayos de bicapa lipídica y en modelos celulares (Raffaello et al., 2013). La relación MCU:MCUB puede variar según el tejido y la necesidad de captación de Ca^{2+} en los mismos (Fieni et al., 2012). En el corazón es necesario que la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias este bien modulada, ya que un ingreso elevado puede disminuir mucho el Ca^{2+} disponible para el transitorio, conducir a una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y finalmente

producir muerte celular. Es así que si la relación MCU:MCU_b es baja con un aumento de MCU_b en el corazón, se generan bajas corrientes de Ca²⁺ en las mitocondrias (Fieni et al., 2012; Raffaello et al., 2013).

Dentro de los moduladores de la apertura del complejo MCU, la primera proteína descrita fue MICU1. MICU1 posee un motivo EF de unión al Ca²⁺ (*EF hand*) y se ubica en la IMM (Perocchi et al., 2010). Esta proteína mantiene al canal inactivo en condiciones de bajo Ca²⁺, para prevenir la entrada masiva de Ca²⁺ a la mitocondria y la sobrecarga de la organela, y tiene la capacidad de censar el Ca²⁺ para establecer un umbral y pasaje de Ca²⁺ por el MCU (Csordás et al., 2013). Otras proteínas de la familia MICU, como son MICU2 y MICU3, han sido estudiadas. Particularmente MICU2 se une covalentemente a MICU1, participando de la regulación del MCU, al censar el Ca²⁺ citosólico. Cuando el Ca²⁺ citosólico aumenta, se une a los dominios *EF-hand* de los dímeros MICU1-MICU2 permitiendo la regulación positiva de MICU1 sobre el MCU, generando la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria (Patron et al., 2014). En conjunto MICU1 y MICU2 son conocidas como “*gatekeeper*” del canal debido a su función en censar los niveles de Ca²⁺.

Otro modulador sumamente importante del MCU es la proteína transmembrana EMRE (del inglés *essential MCU regulator*) (Sancak et al., 2013). Se ha sugerido que EMRE es la encargada de censar el Ca²⁺ en la matriz mitocondrial, permitiendo que el MCU tenga doble sensor, MICU1-MICU2 para el Ca²⁺ citosólico y EMRE para el Ca²⁺ mitocondrial (Vais et al., 2016). Las alteraciones en la cantidad de EMRE generan aperturas del MCU incontroladas que provocan pérdidas o sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial (König et al., 2016; Patron et al., 2018).

Finalmente, VDAC no se encuentra específicamente formando parte del complejo MCU pero es el encargado de controlar la difusión de Ca²⁺ a través de la OMM. La ubicación de VDAC en la OMM no tiene una distribución en particular, sino que es más bien ubicua, sin embargo, puede ubicarse cercano al complejo MCU. La acumulación de Ca²⁺ en el espacio intermembrana promovida por VDAC, puede ser censado por las MICU1 y MICU2 (Gincel et al., 2001; Szabadkai et al., 2006) facilitando la apertura del complejo MCU (*Ilustración 6.1*).

mPTP. El mPTP se describe como un poro formado en las membranas mitocondriales, no selectivo, que permite el paso de solutos de hasta 1,5 kDa (Douglas R. Hunter & Haworth, 1979). En los primeros estudios realizados para estudiar al mPTP se observó que posee múltiples conductancias, lo que sugiere que posee varias subunidades que se oligomerizan en diversos grados (D. R. Hunter et al., 1976). Este poro ha sido estudiado durante muchos años

y continúa en estudio, siendo su estructura un tema de debate. Existen dos modelos propuestos para las proteínas que forman el mPTP en la actualidad. El modelo clásico propone que se compone por Bax, VDAC, TSPO (receptor periférico de benzodiazepinas) y hexoquinasa II (HKII) ubicadas en la OMM; creatina quinasa mitocondrial (mtCK) en el espacio intermembrana; ANT (transportador de nucleótidos de adenina) ubicada en la IMM; y CypD (ciclofilina D) mitocondrial unida a ANT en la matriz (G. Beutner et al., 1997; Halestrap & Davidson, 1990; K. W. Kinnally et al., 1993; Marzo et al., 1998). El segundo modelo, propone que los componentes descritos por el modelo clásico; Bax, VDAC, TSPO, HKII, mtCK, ANT y CypD, se encuentran unidos a PiC (portador de fosfato inorgánico, del inglés *Pi carrier*) (Kokoszka et al., 2004). Recientemente se han propuestos otros modelos en donde se incluyen la subunidad c de la F₀F₁-ATP sintasa (Mnatsakanyan & Jonas, 2020), el dímero/tetrámero de la ATP sintasa (Carraro et al., 2020) y distintos subtipos de ANT (Bround et al., 2020).

El mPTP mayormente se ve activado por el aumento de Ca²⁺ mitocondrial (Baumgartner et al., 2009) y/o de ROS (Seidlmayer et al., 2015), aunque se ha observado que ligandos de ANT, como ADP y palmitoil CoA, y P_i también pueden generar su apertura (Hurst et al., 2017; Morciano et al., 2015).

Por otro lado, el mPTP puede ser regulado por diferentes compuestos dentro de los cuales el más conocido y estudiado es la ciclosporina A (CsA), que bloquea la CypD (Fournier et al., 1987). También se ha observado que los competidores de Ca²⁺ como Mg²⁺ y Mn²⁺, los nucleótidos de adenina y los cambios en el pH de la matriz pueden inhibir la apertura del mPTP (P. Bernardi et al., 1992). Por último, proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak se translocan a la OMM para inducir la despolarización mitocondrial y liberación de citocromo c, formando parte del mPTP (Narita et al., 1998). Al estimularse Bax y Bak también pueden aumentar el Ca²⁺ mitocondrial (al promover el flujo de Ca²⁺ hacia la matriz mitocondrial), y consecuentemente, activar el mPTP (Scorrano et al., 2003) (**Ilustración 6.1**).

La apertura del mPTP se relaciona con la muerte celular por apoptosis dado que cuando el mPTP se encuentra abierto facilita el paso libre de H⁺, generando disipación del gradiente de H⁺, necesario para la producción de ATP y mantención del $\Delta\Psi$. Este proceso altera la producción de ATP y además revierte la F₀F₁-ATP sintasa que provoca la descomposición del ATP producido en el citosol por la glucólisis. El metabolismo se ve afectado aún más, lo que genera desregulación de Ca²⁺ y un aumento mayor en la apertura del mPTP (Hurst et al., 2017; Morciano et al., 2015).

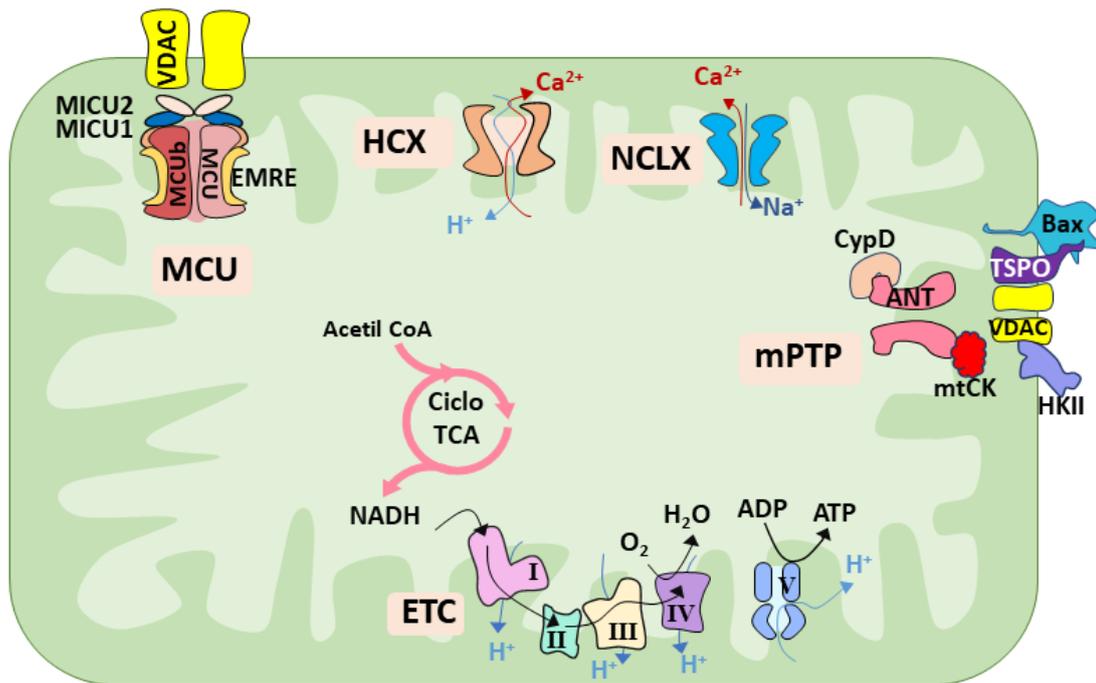


Ilustración 6.1. Esquema de los transportadores iónicos mitocondriales.

La mitocondria posee varios transportadores mitocondriales entre los que se encuentran: los complejos I-IV de la cadena transportadora de electrones; el complejo MCU acoplado a VDAC que genera la entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial; el intercambiador HcX y el NCLX que liberan Ca^{2+} a espacio intermembrana e ingresa H^+ , o Na^+/Li^+ , respectivamente; y el mPTP que puede activarse por Ca^{2+} o ROS principalmente. **MCU**: complejo transportador de Ca^{2+} , **Bax**: Bcl-2-associated X, **VDAC**: voltaje-dependiente anion channel, **TSPO**: receptor periférico de benzodiazepinas, **HKII**: hexoquinasa II, **mtCK**: creatina quinasa mitocondrial, **ANT**: transportador de nucleótidos de adenina, **CypD**: ciclofilina D, **ETC**: cadena transportadora de electrones, **HcX**: intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, **NCLX**: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$, **mPTP**: mitochondrial permeability transition pore.

6.1.2. Cadena transportadora de electrones y producción de ATP: fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa (OXPHOS del inglés *oxidative phosphorylation*) es el proceso en el cual se produce energía como ATP (fosforilación) acoplado al transporte de electrones (e^-) por la ETC (oxidación).

La ETC se encuentra compuesta por varios complejos nombrados desde el I-IV, que se encargan de generar la fuerza protón motriz, utilizada por el *Complejo V* o F_0F_1 -ATP sintasa. En la **Ilustración 6.2** se muestra un esquema de los distintos complejos ubicados en la membrana interna, encargados del transporte de e^- , con extrusión de H^+ y posterior producción de ATP.

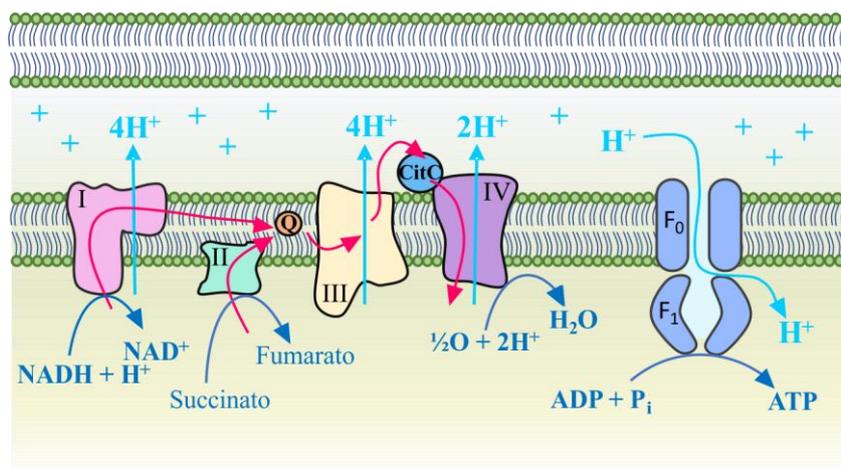
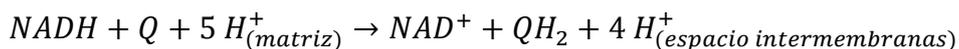


Ilustración 6.2. Esquema de la cadena transportadora de electrones.

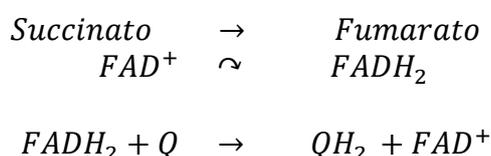
Los electrones son cedidos desde NADH por el Complejo I, o del pasaje de Succinato a fumarato por el Complejo II, respectivamente, hacia la ubiquinona (Q). Al oxidar NADH, el Complejo I libera 4 H⁺ al espacio intermembrana. Los electrones de la ubiquinona reducida son captados por los citocromos c oxidados del Complejo III, que quedan en estado reducido, liberando 4 H⁺ al espacio intermembrana. Los citocromos c reducidos son captados por el Complejo IV que reduce al O₂ para dar H₂O, transportando 2 H⁺ al espacio intermembrana. La energía de la fuerza protón motriz es utilizada por la bomba F⁰F¹-ATP sintasa (Complejo V esquematizado en azul) para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. **CitC**: citocromos c, **Pi**: fosforo inorgánico, **I**: Complejo I, **II**: Complejo II, **III**: Complejo III, **IV**: Complejo IV.

El comienzo del transporte de e⁻ puede ocurrir mediante los dadores NADH provenientes del ciclo de TCA a partir de los sustratos malato y glutamato, o a partir del succinato ingresando al *Complejo II*.

El *Complejo I*, también conocido como NADH deshidrogenasa o NADH-ubiquinona oxidoreductasa, es una enzima compleja de gran tamaño que presenta dos cofactores unidos de forma no covalente, la FMN (del inglés *flavin mononucleotide*) y ocho grupos hierro-azufre (FeS) todos unidos al dominio hidrofílico del *Complejo I* (Hirst, 2009). El *Complejo I* conduce la reacción de reducción de la ubiquinona (Q): en un primer paso de la reacción se produce el traspaso de los 2 e⁻ del NADH a la FMN, y en un segundo paso los e⁻ se transportan rápidamente por la cadena de grupos FeS llegando a la Q que será reducida. La FMN reducida puede oxidarse pasando un e⁻ al O₂, dando como resultado O₂⁻, una de las especies que forman los ROS producidos por las mitocondrias (Hirst, 2009). Los productos de la reacción serán NAD⁺ y ubiquinona reducida (QH₂), con la consecuencia del transporte de 4 H⁺ desde la matriz al espacio intermembrana, como se muestra en la ecuación final de reacción:

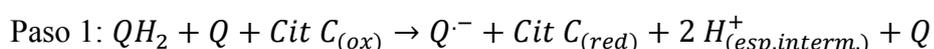


El *Complejo II*, succinato deshidrogenasa o succinato-Q oxidorreductasa es el segundo complejo por el cual pueden ingresar e⁻ a la ETC. El *Complejo II* forma tanto parte de la ETC como del ciclo de TCA. Se encuentra conformado por cuatro subunidades proteicas y contiene como cofactores a la flavín adenín dinucleótido (FAD), centros de FeS, y un grupo hemo (que no participa en la transferencia de e⁻) (Yankovskaya, 2003). Este complejo enzimático genera la reducción de succinato a fumarato, donde los electrones cedidos por el succinato son aceptados por FAD y a través de los centros FeS pasan a la Q, como se muestra en las siguientes reacciones:



Debido a que esta reacción no se encuentra acoplada a la liberación de H⁺ al espacio intermembrana, como ocurre en el *Complejo I*, se considera que mediante el *Complejo II* se produce menor cantidad de ATP.

El *Complejo III*, también conocido como citocromo c reductasa o Q-citocromo c oxidorreductasa es una enzima en forma de dímero, donde cada dímero cuenta con 11 subunidades proteicas, un centro de FeS y tres citocromos (un citocromo c1 y dos citocromo b) (Iwata et al., 1998). Los citocromos tienen un grupo hemo, en donde el hierro puede oxidarse o reducirse según sea necesario para generar la transferencia de e⁻. El citocromo c oxidado puede transferir sólo 1e⁻, por lo que toma los e⁻ de la QH₂, generada por los *Complejos I y II*, en dos pasos conocidos como ciclo Q (Trumpower, 1990). En el primer paso el *Complejo III* une tres sustratos; QH₂, citocromo c y Q. QH₂ es oxidado cediendo 1 e⁻ al citocromo c (que pasará a estado reducido), generando el pasaje de 2 H⁺ al espacio intermembrana, mientras Q acepta el segundo e⁻ y es reducido a Q⁻ (semi-ubiquinona). En el segundo paso se liberan los productos, excepto Q⁻, y se capta una nueva molécula QH₂. QH₂ cederá 1 e⁻ a un nuevo citocromo c y 1 e⁻ a Q⁻ para producir citocromo c reducido y QH₂, respectivamente. En este paso dos nuevos H⁺ son liberados al espacio intermembrana (Trumpower, 1990). Las ecuaciones involucradas son las siguientes:



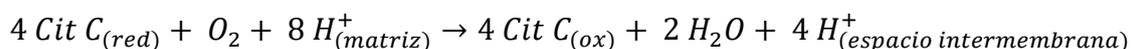
Paso 2: $QH_2 + Q^- + Cit C_{(ox)} + 2 H^+_{(matriz)} \rightarrow Q + QH_2 + Cit C_{(red)} + 2 H^+_{(esp.interm.)}$

Ecuación Final: $QH_2 + 2 Cit C_{(ox)} + 2 H^+_{(matriz)} \rightarrow Q + 2 Cit C_{(red)} + 4 H^+_{(esp.interm.)}$

donde Cit C (ox) refiere a citocromo c oxidado, Cit C (red) a citocromo c reducido, QH_2 es ubiquinona reducida, Q es ubiquinona oxidada, Q^- semi-ubiquinona, y esp.interm. refiere al espacio intermembranas.

Este pasaje de e^- y la formación de Q^- , puede generar ROS al transferir e^- al O_2 . Es así que dependiendo de la velocidad con la que pasen los e^- por el *Complejo III* puede también haber producción de ROS (Cadenas et al., 1977; Murphy, 2008; Nickel et al., 2014).

El *Complejo IV* o Citocromo c oxidasa consta de trece subunidades con dos grupos hemo y varios iones metálicos como cofactores como son cobre (Cu), magnesio (Mg) y zinc (Zn) (Tsukihara et al., 1996), que reduce el O_2 a H_2O transportando 4 H^+ al espacio intermembrana. Los e^- provenientes del citocromo c reducido son tomados por el *Complejo IV* y transferidos mediante los iones Cu y iones Fe de los grupos hemo de esta enzima hacia el O_2 para reducirlo a H_2O . Para reducir una molécula de O_2 es necesario la transferencia de 4 citocromos c reducidos, formando 4 citocromos c oxidados y transportar 4 H^+ al espacio intermembranas (Tsukihara et al., 1996). La ecuación final de las reacciones producidas es la siguiente:



donde Cit C (red) representa el citocromo c reducido y Cit C (ox) al citocromo c oxidado.

La transferencia de e^- a través de la ETC genera un potencial electroquímico o fuerza protón motriz (Δp), definido como (Mitchell, 2011):

$$\Delta p = \Delta \Psi + 60 \Delta pH$$

donde el gradiente de H^+ entre la matriz y el espacio intermembrana generan la diferencia de potencial químico (ΔpH) y la diferencia de cargas positivas y negativas generan el $\Delta \Psi$ (Mitchell, 2011).

La Δp es utilizada por el *Complejo V* o F_0F_1 -ATP sintasa para producir ATP a partir de ADP y P_i en la matriz mitocondrial. Se ha descrito que la F_0F_1 -ATP sintasa requiere del pasaje de entre 3 y 4 H^+ a la matriz mitocondrial para producir una molécula de ATP (Walraven et al., 1996).

La F_0F_1 -ATP sintasa consta de una porción transmembrana y de una porción que se encuentra en la matriz mitocondrial. La porción transmembrana, F_0 , está formada por un anillo de subunidades c unido a la proteína a , que forma el canal por el cual atraviesan los H^+ y que a su vez une a la proteína b , quién ancla todo el complejo a la porción F_1 . La porción F_1 se mantiene unida a F_0 también mediante la subunidades γ y la subunidad ϵ , que conforman el centro de F_1 . F_1 se encuentra formada por un anillo catalítico de tres subunidades α y tres subunidades β , conocidas por tener sitios de unión a nucleótidos, y por la subunidad δ que ancla al complejo F_1 a la proteína b de la porción F_0 (Leslie & Walker, 2000).

Cuando los H^+ ingresan a través del canal de la proteína a , el “rotor” de subunidades c de F_0 comienza a funcionar, lo que genera que gire el eje central de F_1 ; la subunidad γ . Este movimiento, aporta energía para que la subunidad β (inmóviles) de F_1 puedan catalizar la producción de ATP (Dimroth et al., 2006; Leslie & Walker, 2000) (*Ilustración 6.3*).

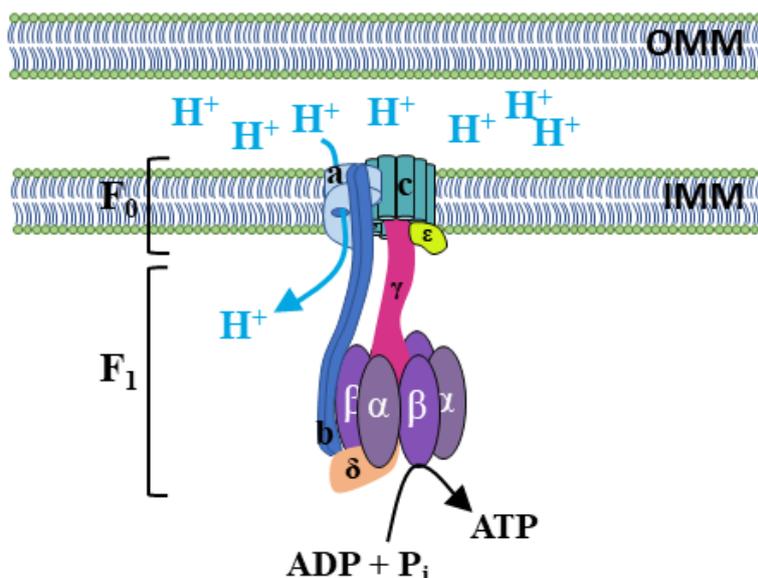


Ilustración 6.3. Esquema de la estructura de la F_0F_1 -ATP sintasa.

La F_0F_1 -ATP sintasa consta de dos porciones, una transmembrana (F_0) y otra ubicada en la matriz mitocondrial (F_1). F_0 se compone de un anillo de subunidades c unido a la subunidad a , ancla a la subunidad b y forma el canal para el pasaje de H^+ . Mientras la porción F_1 consta de un anillo formado por 3 subunidades α y 3 subunidades β , unidas a la subunidad b , y subunidad δ . F_1 posee un centro que funciona como “rotor” llamado subunidad γ que se encuentra unido a las subunidades c y a la subunidad ϵ . El pasaje de H^+ por la subunidad a hace girar a las subunidades c y a la subunidad γ otorgando energía para que la subunidad β genere la producción de ATP a partir de ADP y P_i .

La oxidación de los complejos en la ETC se encuentra acoplada a la producción de ATP por la F_0F_1 -ATP sintasa, es decir, si aumenta el ADP en el medio, la F_0F_1 -ATP sintasa comienza a fosforilar el ADP para producir ATP, y para ello los H^+ bombeados previamente al espacio intermembrana son nuevamente transportados a la matriz mitocondrial, ya que forman parte de la fuerza necesaria para que la F_0F_1 -ATP sintasa. En condiciones donde el ADP disminuye, el transporte de e^- y la extrusión de H^+ al espacio intermembrana disminuyen. Esto garantiza que los sustratos se oxiden, los electrones se transporten y el O_2 solamente cuando se requiere la síntesis de ATP. El acoplamiento mitocondrial puede representarse mediante el control respiratorio (CR) calculado a partir del consumo de O_2 en estado 3 (con ADP) y estado 4 (sin exceso de ADP). En situaciones patológicas, puede ocurrir que las mitocondrias de los cardiomiocitos se encuentren “desacopladas”, estado que puede simularse experimentalmente con desacoplantes farmacológicos como el FCCP (del inglés *Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone*). Cuando esto ocurre, se disipa el gradiente de H^+ (*proton leak*) y la F_0F_1 -ATP sintasa no puede producir ATP correctamente, lo que puede verse como una disminución en el CR, ya que se consume O_2 sin la producción de ATP correspondiente.

6.1.3. Producción y eliminación de ROS

La mitocondria es la principal organela involucrada en la producción de ROS (Jensen, 1966). Los ROS pueden ser radicales libres, como O_2^- (anión superóxido) y radical hidroxilo (OH^\bullet), o compuestos oxidantes no radicales, como oxígeno singlete (1O_2) y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno). La producción de ROS está estrechamente relacionada con la producción de ATP, el consumo de O_2 por las mitocondrias durante el pasaje de e^- en la ETC, y la señalización de Ca^{2+} mitocondrial (Brookes et al., 2004). En condiciones fisiológicas, las mitocondrias producen O_2^- a partir de la reducción del O_2 por el *Complejo I* o por el *Complejo III*, como se mencionó anteriormente. Este O_2^- que es dismutado a H_2O_2 por la acción de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) en la matriz mitocondrial (Cadenas et al., 1977; Nickel et al., 2014). El H_2O_2 es menos reactivo que el O_2^- , pero además puede ser eliminado de la matriz mitocondrial por los sistemas antioxidantes. El H_2O_2 se elimina en la matriz principalmente por el sistema de la glutatión peroxidasa (GPX) y la peroxiredoxina (PRX), que utilizan glutatión (GHS) y tioredoxina (TRX) como aceptores de electrones dando los productos glutatión oxidado (GSSH) y TRX oxidada, respectivamente. A su vez estos sistemas se combinan con la producción de $NADP^+$ (Bertero & Maack, 2018; Nickel et al., 2014), como se indica en el siguiente esquema (*Figura 6.4*).

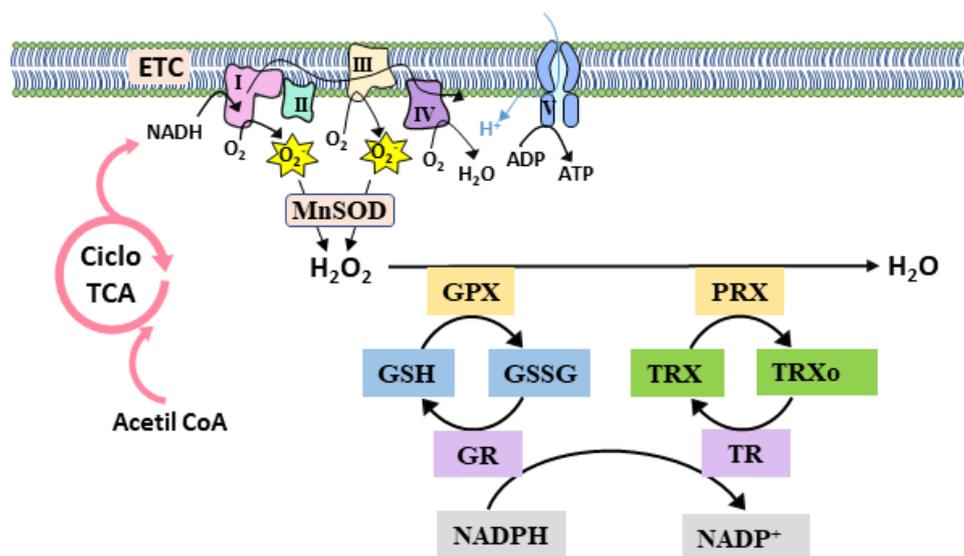


Ilustración 6.4. Esquema de la producción y eliminación de especies reactivas del oxígeno. Como se observa en el esquema la producción de ROS en la mitocondria se produce a través de la producción de superóxido (O_2^-) por los Complejos I y III cuando la ETC transporta e^- . Este O_2^- transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa (MnSOD). El H_2O_2 generado puede ser eliminado en la matriz mitocondrial por los sistemas reductores de la glutatión peroxidasa (GPX) y la peroxiredoxina (PRX) que se encuentran acoplados a la producción de $NADP^+$. La GPX cataliza la reacción de oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) y PRX cataliza la reacción de oxidación de la tioredoxina reducida (TRX) a tioredoxina oxidada (TRX_o). La enzima glutatión reductasa (GR) y tioredoxina reductasa (TR) son las encargadas de regenerar el GSH y TRX, respectivamente. Estas últimas reacciones se encuentran acopladas a la producción de $NADP^+$.

El estrés oxidativo se define como el desbalance entre las especies oxidantes y antioxidantes. El aumento de ROS citosólico puede ser a causa de un aumento de la producción y/o disminución de la eliminación. Un aumento neto de ROS de forma sostenida sin aumento en las especies antioxidantes eventualmente dañará a la célula por un aumento del estrés oxidativo. El incremento de estrés oxidativo ya ha sido descrito en mitocondrias de animales con DM (Bombicino et al., 2017; Rukavina-Mikusic et al., 2021). En estas situaciones puede tener lugar un proceso llamado liberación de ROS inducida por ROS, en donde los ROS producidos por una sola mitocondria pueden transferirse a una mitocondria adyacente, lo que lleva a una reacción en cadena en la que muchas mitocondrias consecutivas producen una cantidad masiva de ROS que es liberada al citosol, lo que finalmente lleva a un daño mayor causando lesiones celulares (Zorov et al., 2000, 2014).

6.1.4. Estructura y dinámica mitocondrial

La dinámica mitocondrial se realiza mediante dos procesos complementarios, fisión y fusión, que se encuentran en equilibrio en condiciones fisiológicas. El proceso de fusión genera una nueva mitocondria a partir de dos organelas, fusionando el contenido de ambas mitocondrias originales ayudando a mitigar el daño mitocondrial. La fisión crea dos nuevas mitocondrias a partir de una, lo que contribuye al recambio mitocondrial y facilita la apoptosis durante los altos niveles de estrés celular (Kane & Youle, 2010). Es así como la dinámica mitocondrial es responsable de la cantidad, forma y función mitocondrial. Además, tanto los procesos de fusión como los de fisión están relacionadas con la OXPHOS mitocondrial. Las mitocondrias que se encuentran bajo estrés metabólico con OXPHOS defectuosa promueven la fragmentación mitocondrial (Sauvanet et al., 2010).

El proceso de fisión está regulado por varias proteínas, pero las más importantes descritas y estudiadas son Drp1 (del inglés *dynamin-related protein 1*), que tiene la capacidad de vesicular membranas (Herskovits et al., 1993), y Fis-1, que conecta Drp1 con la OMM (Yoon et al., 2003). La fusión mitocondrial está controlada por dos proteínas principales: la proteína Opa1 (del inglés *optic atrophy 1*), ubicada en la IMM, y la Mfn1/Mfn2 (mitofusina 1 y 2), ubicada en la OMM (Cipolat et al., 2004). El equilibrio entre la fusión y la fisión mitocondrial es esencial e incluso defectos leves en la dinámica mitocondrial están asociados con la patogénesis de diferentes enfermedades. Además, la fisión suele estar asociada con procesos deletéreos y la fusión con mecanismos compensatorios, aunque ambos procesos son necesarios durante el desarrollo (Chen et al., 2003; Ishihara et al., 2009).

6.1.5. Mitocondrias en la CMD

La mitocondria es una de las organelas más importantes para el correcto funcionamiento del corazón por todas las funciones mencionadas anteriormente. Debido a que durante la CMD se producen alteraciones metabólicas que generan cambios en la producción de energía, es fundamental estudiar la función mitocondrial.

Durante la CMD se produce un aumento en el depósito de lípidos que afecta el funcionamiento y rendimiento mitocondrial. Los lípidos contribuyen a los cambios en la disponibilidad de sustrato que caracteriza al corazón diabético, que incluyen aumento en los AG libres y disminución de la acción de la insulina (Finck et al., 2003).

El cambio en el metabolismo cardiaco directamente afecta la función mitocondrial generando cambios en el consumo de O₂ por la ETC en las mitocondrias (How et al., 2006), la producción de ATP (Bombicino et al., 2017; Fang et al., 2018), y en la producción/eliminación de H₂O₂ (Anderson et al., 2009). Debido a que como mencionamos el metabolismo mitocondrial está estrechamente relacionado con la morfología y dinámica mitocondrial, durante la patología diabética también se han observado alteraciones de la dinámica como disminución en el tamaño, aumento de proteínas relacionadas con la fisión mitocondrial, entre otras, incluso en muestras de tejido cardiaco obtenidas de pacientes diabéticos (Dabkowski et al., 2010; Galloway & Yoon, 2015; Montaigne et al., 2014; Yu et al., 2006).

Por último, las alteraciones mitocondriales tanto en su función como morfología afectan no solo a estas organelas sino también a las células y al miocardio en general. Se ha observado que en corazones diabéticos ocurre muerte celular por aumento de la apertura del mPTP relacionando a la mitocondria con las causas de muerte celular (Anderson et al., 2011; X. Wang, 2001).

En este contexto investigar la función mitocondrial es primordial para la comprensión de los mecanismos desarrollados en la cascada apoptótica producida por la prediabetes en el corazón. Por lo tanto, el objetivo específico de este capítulo fue estudiar los cambios funcionales, metabólicos y en la dinámica mitocondrial producidos por la prediabetes, que puedan estar colaborando con los efectos deletéreos producidos en el corazón prediabético.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de corazón de ratón fueron aisladas por centrifugación diferencial en una centrífuga Sorvall RC5C. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, el corazón fue extraído del tórax y lavado en la solución buffer STE (250 mM sacarosa, 5 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, pH = 7.4) sobre hielo para mantener la temperatura a 4 °C. Una vez eliminada la sangre del corazón, el tejido fue cortado en pequeñas piezas y digerido utilizando 2,5 ml de buffer STE suplementado con proteasa bacteriana (2,5 U/ml), albumina de suero bovino (BSA del inglés *bovine serum albumin*, 0,5 % p/v), MgCl₂ (5 mM) y ATP (1 mM), por 4 minutos a 4 °C. Pasado ese tiempo, el tejido fue transvasado a un Potter Elvehjem de vidrio en donde se terminó de homogenizar. El homogenato fue centrifugado a 8000 g por 10 min para retirar la proteasa que queda en el sobrenadante y finalizar la digestión. Las mitocondrias obtenidas en el precipitado fueron resuspendidas en 4 ml de buffer STE y se centrifugadas a 700 g por 10 min para eliminar los núcleos y restos celulares. El sobrenadante fue colectado y centrifugado a 8000 g por 10 min para obtener en el precipitado la fracción mitocondrial. Las mitocondrias fueron lavadas realizando dos centrifugaciones más de 8000 g por 10 min más en buffer STE y resuspendiendo el precipitado final en 100 – 150 µl para obtener una concentración final de 8 – 12 mg/ml. Todo el procedimiento fue realizado manteniendo la temperatura a 4 °C.

La concentración de proteína en las mitocondrias aisladas fue medida por el método Lowry explicado en la sección *Método de Lowry* o *Método de Bradford* del *APENDICE I*.

La pureza del aislamiento mitocondrial también se corroboró por MET. Para esto las mitocondrias aisladas fueron fijadas en glutaraldehído (2% v/v) a 4 °C. Una vez hecha la primera fijación, cada muestra fue lavada en buffer fosfato (168 mM Na₂HPO₄, 49 mM NaH₂PO₄) y post-fijadas en OsO₄ (1 % v/v) por 1 hora a 4 °C. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en series graduadas de alcohol desde 50° hasta acetona, y embebidas en resina epoxy (Spurr, 1969) y se dejaron polimerizar por 24 horas a 60°C. De los cortes semifinos se realizaron cortes ultrafinos con ultramicrótomo (Ultracut R; Leica EM UC7), los cuales se montaron en grillas y tiñeron con una solución de acetato de uranilo y citrato de plomo (1 % v/v). Las grillas fueron examinadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200 Zeiss usando una cámara digital (Erlangshen ES1000) para la toma de imágenes.

Para corroborar la pureza del aislamiento también se realizó un *western blot* de las fracciones de homogenato total, sobrenadante y mitocondrias aisladas, midiendo la proteína citocromo c oxidasa (COX) que sólo se encuentra presente en la fracción mitocondrial.

6.2.2. Determinación de *swelling* mitocondrial

El *swelling* mitocondrial es un parámetro utilizado para evaluar el volumen de la mitocondria y la apertura del mPTP, que permite el paso de solutos de hasta ~1,5 KDa (Douglas R. Hunter & Haworth, 1979), uno de los eventos que ocurre en los procesos de muerte celular por apoptosis, generando hinchamiento o *swelling* de la organela. El *swelling* mitocondrial puede ser fisiológico si es leve, o puede corresponderse con el deterioro que poseen las mitocondrias del tejido en estudio. Este parámetro se midió a través de la detección del descenso de la dispersión de la luz (densidad óptica o D.O) en una suspensión de mitocondrias aisladas, inducido por el agregado de una solución de Ca^{2+} en un espectrofluorómetro (Aminco Serie Bowman 2). El agregado de las soluciones de Ca^{2+} promueve la entrada de iones y agua a las mitocondrias en suspensión, generando que se hinchen y dispersen más la luz, disminuyendo la D.O.

Las mitocondrias frescas aisladas a partir del conjunto de 6 corazones fueron incubadas en el medio de reacción (120 mM KCl, 20 mM MOPS, 10 mM Tris-HCl, 5 mM KH_2PO_4 , a pH = 7.4) y succinato (20 mM) como sustrato del *Complejo II*, a 37 °C durante 5 minutos. Luego de transcurrido el tiempo, fueron colocadas en una cubeta de plástico en el espectrofluorómetro, manteniendo la temperatura en 37 °C, en agitación continua durante todo el experimento. Para obtener la medida de D.O basal se registró la transmitancia a $\lambda = 540$ nm durante los primeros 2 minutos, y luego se agregó una solución de CaCl_2 (20, 100 o 200 mM) para inducir la apertura del mPTP.

La medida de *swelling* se expresó como la diferencia de D.O calculada entre la D.O basal y la DO posterior al agregado de cada solución de CaCl_2 .

6.2.3. Cuantificación de huecos o *holes* mitocondriales

Para cuantificar los espacios menos electrodensos (*holes* o huecos) presentes en las mitocondrias que se evidenciaron en las imágenes de MET, se utilizó el programa *Image ProPlus*. Las muestras para MET fueron preparadas como se indicó previamente en *Microscopía electrónica de transmisión*. Las imágenes tomadas a una magnificación de 30000x fueron utilizadas para medir este parámetro.

Cada mitocondria analizada fue eskeletonizada para delimitar los bordes de la organela y se midió el área total de la misma y el área ocupada por los *holes* observados. Las medidas se realizaron en al menos 3 mitocondrias de 3 fotografías tomadas de 3 corazones por cada tratamiento. En la **Figura 6.1** se muestra una ampliación de dos mitocondrias de cada grupo analizadas, donde los huecos fueron delimitados con una línea roja, utilizada para cuantificar el área ocupada por los huecos respecto del área total de la mitocondria.

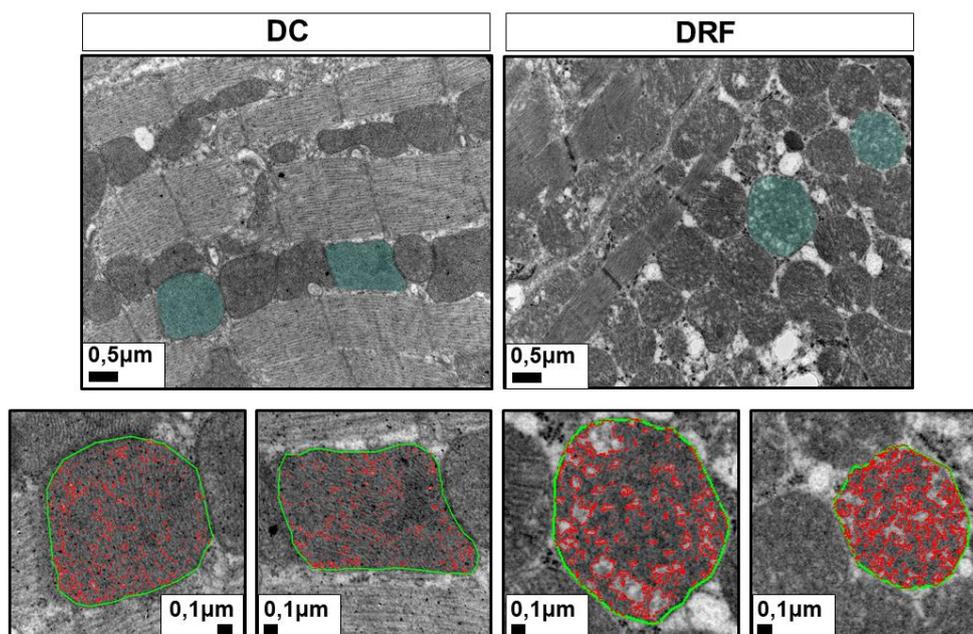


Figura 6.1. Medida de huecos mitocondriales por microscopía electrónica de transmisión. Imagen representativa del tejido cardiaco de animales tratados con DC (izquierda) y DRF (derecha) en donde se marcaron con verde las mitocondrias analizadas. En la parte inferior de la figura se muestran recuadros con una ampliación en la zona de las mitocondrias analizadas, con su membrana eskeletonizada (en verde), y los huecos señalizados y delimitados con una línea roja. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa.

6.2.4. Determinación de la capacidad de retención de calcio

La capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC), como su nombre lo indica, es la capacidad que tiene la mitocondria para captar y retener el Ca^{2+} que se encuentra en el medio extra-mitocondrial. La CRC se mide experimentalmente para evaluar la sensibilidad del mPTP, ya que como mencionamos, un aumento de Ca^{2+} sobre cierto umbral genera la apertura del mPTP. Frente a distintos agregados de Ca^{2+} la mitocondria captará la mayor cantidad de Ca^{2+} hasta que el mPTP se abra por completo y se libere todo el contenido mitocondrial al medio.

La CRC fue evaluada en mitocondrias aisladas frescas en el detector Varioskan® LUX (Thermo Scientific, MA, USA) mediante el registro de la emisión del indicador *Calcium Green-*

5N en forma de sal. Este indicador censa cambios en la concentración de Ca^{2+} en el medio externo a las mitocondrias debido a que no permea las membranas (*Error! Reference source not found.*), y es de simple excitación ($\lambda = 506 \text{ nm}$) y simple emisión ($\lambda = 532 \text{ nm}$). La K_D del *Calcium Green-5N* sal es igual a $14 \mu\text{M}$, lo que implica que tiene baja afinidad por el Ca^{2+} . Esta particularidad es importante porque le permite captar Ca^{2+} en cada agregado y liberarlo rápidamente, quedando disponible para que sea captado por las mitocondrias.

Para realizar las medidas de CRC las mitocondrias aisladas frescas (1 mg/ml) fueron incubadas en un medio (120 mM KCl , 20 mM MOPS , 10 mM Tris-HCl and $5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 7.4$) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente fue agregado el indicador *Calcium Green-5N* ($0.5 \mu\text{M}$) y se comenzó a registrar la fluorescencia (excitando a $\lambda = 506 \text{ nm}$ y colectando la señal a $\lambda = 532 \text{ nm}$). Luego de obtener una fluorescencia basal hicieron agregados secuenciales de CaCl_2 ($10 \mu\text{M}$) hasta que se alcanzó el punto de saturación de captación de Ca^{2+} mitocondrial, y se produjo la apertura del mPTP (**Figura 6.5**). La CRC fue expresada como nanomoles de Ca^{2+} (calculados a partir del número de agregados de pulsos de Ca^{2+} multiplicados por la concentración de Ca^{2+} utilizada) por miligramos de proteína mitocondrial.

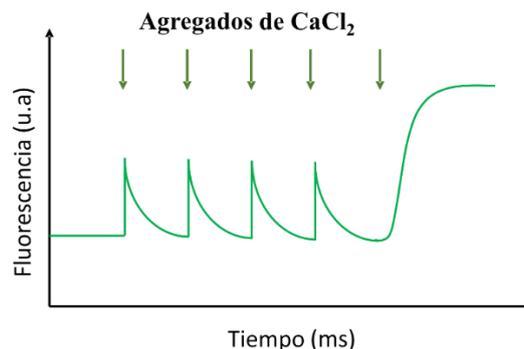


Ilustración 6.5. Esquema del protocolo utilizado para medir la capacidad de retención de Ca^{2+} .

Como se muestra en la figura, a medida que se realizan agregados de Ca^{2+} (señalizados con flechas), se produce un pico de fluorescencia, que luego disminuye a valores basales debido a la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias de la muestra. Este mecanismo se reproduce hasta que se abre el mPTP debido a que las mitocondrias no pueden captar y retener más el Ca^{2+} , arrojando un máximo en la fluorescencia.

6.2.5. Determinación del potencial de membrana mitocondrial

La determinación de $\Delta\Psi$ fue realizada en cardiomiocitos aislados (como se indica en el *Aislamiento de cardiomiocitos*), cargados con la sonda fluorescente JC-1. Este indicador tiene

la capacidad de cambiar la emisión de fluorescencia desde verde (~525 nm) a rojo (~590 nm) según sea el $\Delta\psi$ al que se acopla (*Ilustración 6.6*).

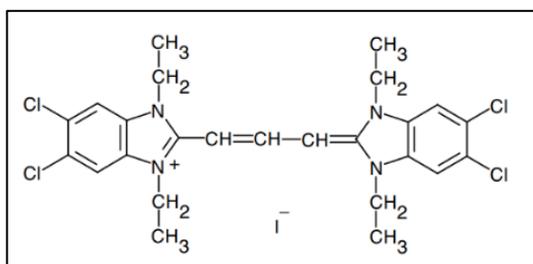


Ilustración 6.6. Estructura de la sonda fluorescente JC-1.

El indicador existe en su forma como monómero y puede ingresar selectivamente a las mitocondrias. Si al ingresar a la organela el $\Delta\psi$ es aproximadamente -180mV como ocurre en mitocondrias sanas, el JC-1 formará agregados que emiten a longitudes de onda cercanas al rojo. Mientras que, si las mitocondrias se encuentran dañadas y su potencial resulta menos negativo, el JC-1 mantendrá su forma monomérica que emite en longitudes de onda cercanas al verde (*Error! Reference source not found.*).

Una vez aislados los cardiomiocitos fueron incubados con JC-1 en una concentración de 3 μM a 37 °C por 20 minutos y luego se lavaron en el buffer HEPES durante 20 minutos. Las células incubadas se excitaron en un Microscopio Confocal LSM410 con un láser de Argón a 488 nm y la fluorescencia emitida se fue colectada a $\lambda = 530 \text{ nm}$ y $\lambda = 590 \text{ nm}$ (*Ilustración 6.7*).

El $\Delta\psi$ se estimó a partir de la relación de emisión en rojo y verde que presentaron las células, es decir el porcentaje de fluorescencia colectada a $\lambda = 590 \text{ nm}$ respecto de la fluorescencia colectada a $\lambda = 530 \text{ nm}$.

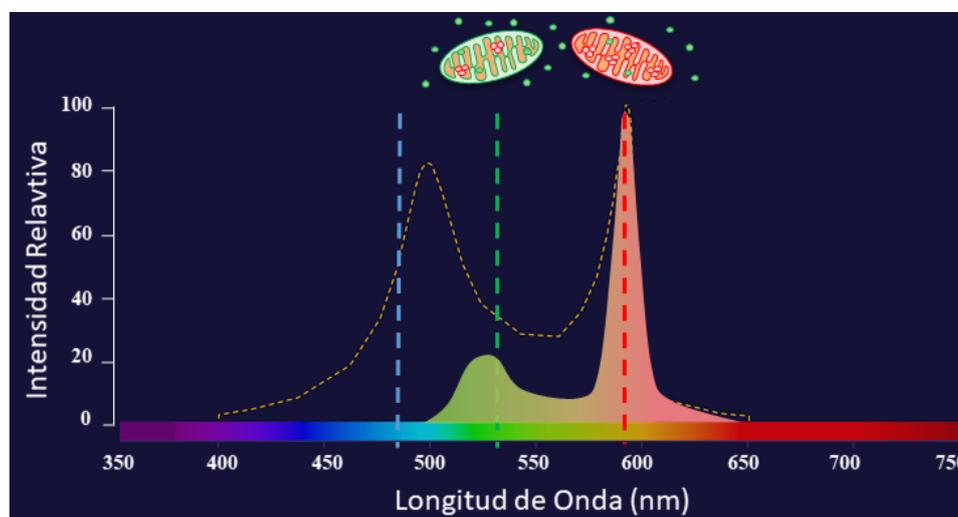


Ilustración 6.7. Espectro de excitación y emisión del indicador JC-1.

La línea punteada amarilla indica el patrón de excitación posible para el JC-1 y la línea recta punteada azul indica la excitación utilizada con el láser de Argón. La curva continua representa las dos emisiones posibles. Las líneas punteadas verde y roja muestran las emisiones a las que fue colectada la fluorescencia. Esquemáticamente se representó el mecanismo de JC-1 en una mitocondria sana (derecha, roja) y una mitocondria con pérdida del $\Delta\Psi$ (izquierda, verde), en la parte superior de la imagen.

6.2.6. Determinación del consumo de oxígeno mitocondrial

El consumo de O₂ mitocondrial puede determinarse en distintos estados respiratorios (*Ilustración 6.8*) de los cuales se obtiene distinta información del metabolismo, acoplamiento e integridad mitocondrial. La velocidad de consumo de oxígeno fue determinada utilizando un electrodo de Clark de alta resolución (*Hansatech Oxygraph, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, England*), que se encuentra adosado a una cámara de incubación con un baño termostatzado y manteniendo agitación constante.

El electrodo Clark se encuentra conformado por un cátodo de platino y un ánodo de referencia de plata (Ag) bañados en una solución de KCl. El electrodo se dispone en un compartimento, aislado de la cámara de incubación por una membrana que es permeable al O₂, lo que permite que sólo el O₂ alcance al cátodo del electrodo. Cuando el O₂ atraviesa la membrana, es reducido electrolíticamente (por una diferencia de potencial aplicado) generando una corriente que es estequiométricamente proporcional a la concentración de O₂ que atravesó la membrana. Esta corriente es registrada por el software y convertida a unidades de concentración de O₂.

Las mitocondrias aisladas frescas (0,4 – 0,6 mg/ml) fueron incubadas en la cámara del equipo conteniendo un buffer de respiración (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 3 mM HEPES, 1 mg/ml BSA, pH = 7.2) a 30°C y en agitación. El estado respiratorio 4 (estado 4: alto contenido de sustrato y bajo contenido de ADP) fue medido en presencia de malato (2 mM) y glutamato (5 mM), sustratos para el *Complejo I* de la ETC. Posteriormente se agregó ADP (25 mM) al medio para comenzar a medir el estado respiratorio 3 (estado 3: alto contenido de sustrato y de ADP). La velocidad de consumo de O₂ mitocondrial para cada estado, fue calculada a partir de las pendientes obtenidas del gráfico de consumo de oxígeno en función del tiempo (*Ilustración 6.8*).

Los resultados fueron expresados en nanogramos de átomo de oxígeno por miligramos de proteína en la muestra, y se calculó el cociente entre el estado 3 y estado 4 de consumo de oxígeno que representa el CR (control respiratorio).

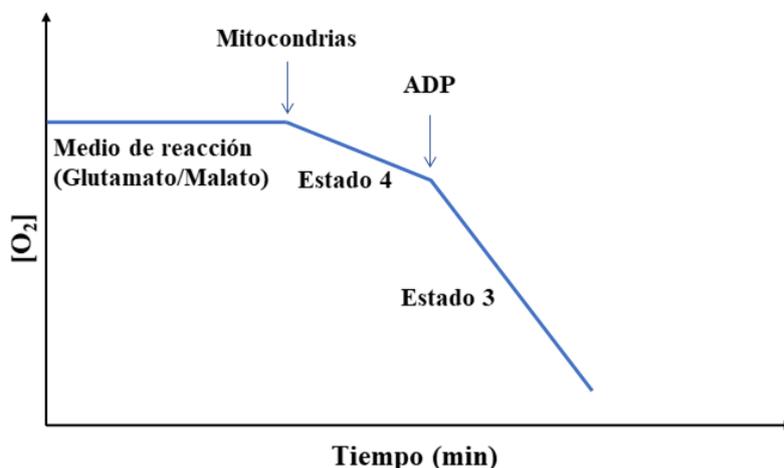


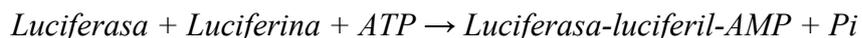
Ilustración 6.8. Esquema que representa el protocolo usado para medir los distintos estados de consumo de O_2 en las mitocondrias aisladas.

Las mitocondrias aisladas frescas fueron agregadas al medio de reacción para medir consumo de O_2 mediante un electrodo de Clark. El medio posee Malato y Glutamato, para estimular al Complejo I de la cadena transportadora de electrones. El gráfico muestra tres segmentos: en el primero solamente está presente el medio de reacción; el segundo, se corresponde con el estado 4 (agregado de mitocondrias); y el tercero, con el agregado de ADP representa el estado 3. El primer segmento muestra la ausencia de cambios en el consumo de O_2 , y en el segundo y tercer segmento se ejemplifica una disminución en la concentración de O_2 en el medio de reacción. La pendiente de estos últimos segmentos permite calcular la velocidad de consumo de O_2 por la mitocondrias en los estados energéticos mencionados.

6.2.7. Determinación de la producción de ATP

La producción de ATP es realizada por la F_0F_1 -ATP sintasa quién ingresa H^+ desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial a favor de su gradiente, para utilizarlo como fuerza (fuerza protón motriz o Δp) para adicionar un fosfato a la molécula de ADP. La producción de ATP se encuentra acoplada a la ETC ya que en el proceso de consumo de O_2 y transporte de e^- se extruyen H^+ al espacio intermembrana para generar el gradiente de H^+ (**Ilustración 6.2**).

La producción de ATP fue medida en mitocondrias aisladas frescas por el método luciferina/luciferasa utilizando el detector Varioskan® LUX (*Thermo Scientific*, MA, USA. La luciferasa de luciérnaga ha sido utilizada para medir el contenido de ATP en mitocondrias debido a su propiedad quimioluminiscente (Leach & Webster, 1986). Las reacciones producidas en la placa de incubación utilizadas para el experimento son las siguientes:



El luminómetro contabiliza la producción de luz ($h\nu$), que luego puede ser convertida en producción de ATP mediante una curva de calibración.

Para esto, 1 mg/ml de mitocondrias aisladas fueron incubadas en el medio de reacción (composición: 150 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0.1 % BSA, 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM MgCl_2 , 0.8 mM luciferina, 20 $\mu\text{g/ml}$ luciferasa, pH = 7.4) a 28 °C. Se agregó glutamato (1,25 mM) y malato (3 mM) como sustratos del *Complejo I*, y ADP (125 μM) como sustrato para la F_0F_1 -ATP sintasa, y se registró la señal. La luz obtenida de la reacción mencionada anteriormente se transformó a producción de ATP realizando una curva de calibración con ATP como estándar. Los resultados fueron expresados como velocidad de producción de ATP (nmol ATP/min x mg proteína).

6.2.8. Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 es una especie estable activa derivada del O_2 , que se produce en la mitocondria en condiciones fisiológicas a partir del anión O_2^- . Como se mencionó previamente, la ETC durante el transporte de e^- , consume O_2 que puede transformarse en O_2^- , el cual rápidamente es convertido a H_2O_2 por la acción de MnSOD. La concentración de H_2O_2 es normalmente mantenida en bajos niveles (1 nM - 100 nM) pero puede encontrarse aumentada en situaciones patológicas, y así como la producción de ATP y consumo de O_2 , es uno de los estudios utilizados para evaluar la integridad mitocondrial.

La velocidad de producción mitocondrial de H_2O_2 fue determinada a través de la utilización de la peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) en presencia de *Amplex Red* (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina) como detección fluorométrica. En presencia de HRP, el reactivo *Amplex Red* reacciona con H_2O_2 , en una relación estequiométrica 1:1, para dar el producto de oxidación resorufina, que emite fluorescencia roja. La resorufina tiene niveles máximos de excitación aproximadamente a $\lambda = 571$ nm y de emisión a $\lambda = 585$ nm.

Las mitocondrias aisladas frescas fueron incubadas en el medio de reacción (125 mM sacarosa, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2 , 0.01 % BSA, pH = 7.2) junto con el reactivo *Amplex Red* (25 μM), HRP (0.5 U/ml), y malato (2 mM) y glutamato (5 mM) como sustratos del *Complejo I*. La reacción fue detectada mediante el uso del detector Varioskan®

LUX (*Thermo Scientific*, MA, USA), excitando al reactivo *Amplex Red* a $\lambda = 563$ nm y colectando la fluorescencia de resofurina a $\lambda = 587$ nm. Para convertir los valores a concentración de H_2O_2 se realizó una curva de calibración usando H_2O_2 como estándar y los valores obtenidos fueron expresados como velocidad de producción H_2O_2 (nmol H_2O_2 /min x mg proteína).

6.2.9. Análisis de la morfología mitocondrial

Las muestras para MET fueron preparadas como se indicó previamente en *Microscopía electrónica de transmisión*, en el **Capítulo 5**). Las imágenes de MET fueron tomadas a varios aumentos para evaluar distintos parámetros mitocondriales y de las fibras contráctiles del corazón. Las imágenes tomadas a una magnificación de 12000x fueron utilizadas para medir el perímetro, diámetro Feret, área y redondez de las mitocondrias.

Debido a que las mitocondrias no son objetos esféricos, sino que tienen una forma irregular, el diámetro Feret y la redondez son parámetros más acordes y utilizados para evaluar el tamaño de las mitocondrias a partir de imágenes dos dimensiones. El diámetro Feret es una medida promedio de la distancia entre dos tangentes paralelas tomadas en todas las direcciones posibles (Pabst & Gregorova, 2007). En la **Ilustración 6.9** se esquematiza el diámetro Feret tomando como ejemplo sólo 3 tangentes paralelas para facilitar comprensión del análisis.

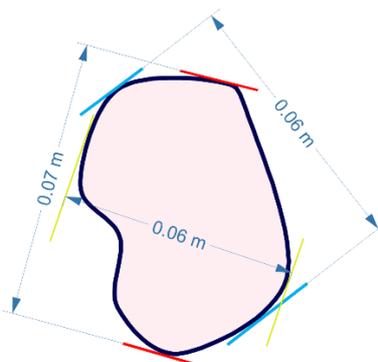


Ilustración 6.9. Esquema de la medida del Diámetro Feret.

En celeste, rojo y verde se representaron 3 tangentes y sus respectivas tangentes paralelas. Las líneas con flechas marcan la distancia medida entre dos líneas tangenciales paralelas que formarían parte del promedio del diámetro Feret. El relleno rosa muestra el área y la línea negra el perímetro del objeto.

La redondez de un objeto, como la mitocondria, demuestra cuán redonda es comparada con la redondez de un círculo. Para evaluarla fue utilizada la siguiente fórmula:

$$\text{Redondez} = \frac{P^2}{4 \times \pi \times A}$$

donde P es el perímetro y A es el área del objeto. Una vez que calculada la redondez de la mitocondria, se mide cuánto dista este parámetro del valor 1, que representa un círculo perfecto. Es así que estructuras más o menos redondas, se acercan más o menos, respectivamente, a este valor.

Las imágenes de 12000x y 30000x se utilizaron para contabilizar el número de mitocondrias en el tejido cardíaco. Se usaron al menos 9 imágenes de cada tejido preparado, y el número de mitocondrias se normalizó según el tamaño de la micrografía ($n^\circ/\mu\text{m}^2$).

6.2.10. Determinación de procesos de fisión y fusión

La determinación de procesos de fusión y fisión fue llevada a cabo mediante la medida de expresión de las proteínas Opa1 y Drp1, respectivamente. Para esto se prepararon homogenatos de corazón y se realizó un *western blot* como se indica en ***Western blot*** del ***APENDICE I***.

6.3. Resultados

6.3.1. La prediabetes altera la carga de Ca^{2+} mitocondrial y genera swelling mitocondrial

La mitocondria capta un pequeño porcentaje de Ca^{2+} en cada latido a través del MCU, el cual, como se mencionó anteriormente (*ver 6.1.1.*), tiene la particularidad de necesitar altas concentraciones de Ca^{2+} en los microdominios (espacios que relacionan a la mitocondria con el RS) para poder abrirse. La disminución distancia entre el RS y la mitocondria, sumado a las pérdidas de Ca^{2+} desde el RS pueden ser condiciones propicias para una mayor captación de Ca^{2+} mitocondrial y posterior sobrecarga de la organela. Por este motivo se estudió la CRC (capacidad de retención de calcio) de las mitocondrias, con el objetivo de evaluar la sensibilidad de estas organelas al Ca^{2+} extra-mitocondrial, junto con el *swelling* o hinchamiento mitocondrial en mitocondrias aisladas. Ambos procesos han sido descriptos relacionados con la sensibilidad del mPTP, a su vez asociado con la muerte celular por apoptosis.

Para el estudio del *swelling* y CRC mitocondrial se aislaron mitocondrias como se explica en la sección *Aislamiento de mitocondrias*. Durante los experimentos de *swelling* se midió la dispersión de luz que genera la suspensión de mitocondrias, previo y posterior al agregado de un pulso de Ca^{2+} de distintas concentraciones (20 mM, 100 mM, 200 mM) (*ver Determinación de swelling mitocondrial*). Para la determinación de CRC se midió la cantidad de Ca^{2+} extra mitocondrial con la sonda *Calcium Green 5N* en forma de sal realizando pulsos de Ca^{2+} 10 μM secuenciales hasta provocar la apertura del mPTP. Las mitocondrias pueden captar y retener Ca^{2+} , por lo que en cada pulso de Ca^{2+} agregado, la fluorescencia sube al unirse a la sonda *Calcium Green 5N* y luego disminuye, a causa de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria. Esto ocurre hasta que se alcanza un punto de saturación de captación de Ca^{2+} mitocondrial, y se produce la apertura del mPTP (*ver Determinación de la capacidad de retención de calcio*).

En la *Figura 6.2.a* se pueden observar micrografías de MET representativas de los aislamientos mitocondriales e *immunoblots* de las distintas fracciones obtenidas durante el proceso de aislamiento, en donde se midió la expresión de la enzima COX que solo está presente en las mitocondrias en la fracción final. Estos experimentos prueban la pureza de la preparación de mitocondrias aisladas y la preservación de la organela durante el protocolo. La *Figura 6.2.b* y *c* muestra los registros obtenidos de los experimentos de *swelling* mitocondrial y CRC, respectivamente, junto con sus datos promedios en mitocondrias aisladas de corazones de ratones tratados con DC o DRF. Las mitocondrias de ratones tratados DRF mostraron un mayor *swelling* mitocondrial ante el agregado de distintas concentraciones de Ca^{2+} , que puede

observarse como un incremento en la disminución de D.O, junto con una menor CRC, es decir, menor capacidad para captar y retener Ca^{2+} , que las mitocondrias de ratones tratados con DC. Estos resultados sugieren que el nivel de Ca^{2+} en mitocondrias de corazones de ratones prediabéticos se encuentra aumentados, próximo al umbral que activa la apertura del mPTP.

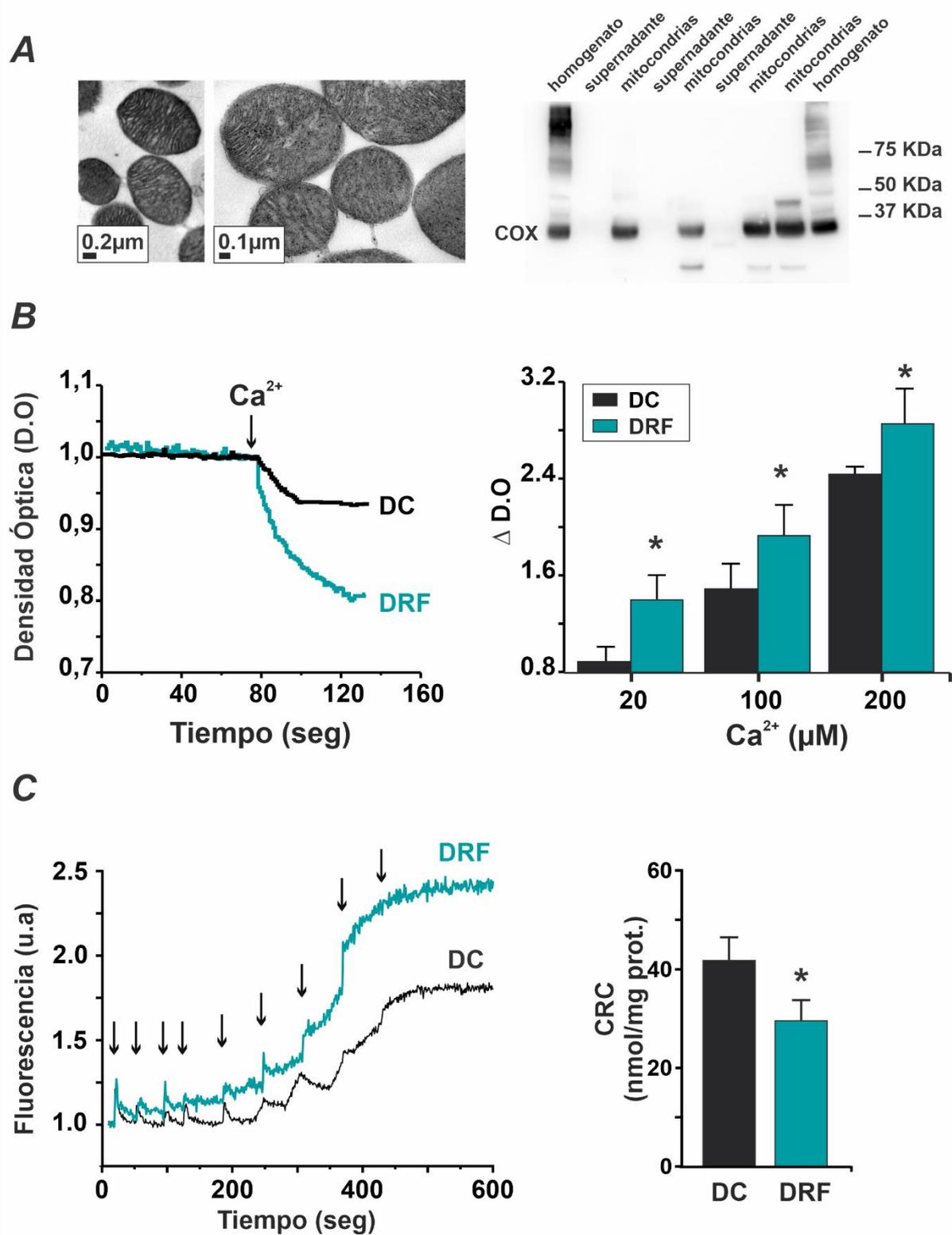


Figura 6.2. La prediabetes aumenta el swelling mitocondrial y disminuye la CRC.

A, Fotografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) de mitocondrias aisladas a dos magnificaciones diferentes e inmunoblots de las distintas fracciones obtenidas durante el proceso de aislamiento para evaluar su pureza. En estas muestras también se midió la expresión de la enzima citocromo c oxidasa, la cual sólo se observó sólo en la fracción

mitocondrial final. **B**, a la izquierda, trazos representativos de la medida de swelling mitocondrial por espectrometría de una suspensión de mitocondrias aisladas de corazones de ratones tratados con DC (negro) y DRF (verde), y a la derecha los valores promedio de densidad óptica, mostrando una mayor dispersión de la luz en las mitocondrias de ratones tratados con DRF luego de cada pulso de Ca^{2+} (20, 100 y 200mM). **C**, a la izquierda trazos representativos de medidas de capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC), medido con la sal fluorescente Calcium Green-5N, donde las flechas indican la adición de pulsos de Ca^{2+} a la suspensión de mitocondrias aisladas de corazones de ratones DC (en negro) y DRF (en verde). A la derecha, el gráfico de barras muestra los datos promedio obtenidos demostrando que las mitocondrias de corazones de animales tratados con DRF tienen una menor CRC que las DC. **COX**: citocromo c oxidasa, **D.O**: densidad óptica, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, $n = 5 - 6$ por grupo.

Además, en las fotografías de MET se halló que las mitocondrias de corazones prediabéticos poseen espacios menos electrodensos como “holes o huecos”, consistente con el swelling mitocondrial, junto con disrupción de su estructura y de las crestas mitocondriales, que no se observaron en mitocondrias de corazones de ratones tratados con DC (**Figura 6.3.a**). Para cuantificar estos espacios o holes, se utilizaron las imágenes tomadas en una magnificación de 30000x, se delimitó a la mitocondria en estudio para medir el área total de la misma, y a los holes observados para medir el área ocupa por estos. El área ocupada por los holes se normalizó con el área total. Como muestra **Figura 6.3.b**, al cuantificar este parámetro, se observó un aumento en las mitocondrias de corazones de ratones tratados con DRF. Alrededor de un 20 % del área mitocondrial de los corazones de ratones DRF, se ve dañado, y no es ocupado por las crestas mitocondriales como ocurre en los corazones de ratones DC, que sólo presentan un 5 % de espacios menos electrodensos.

A

B

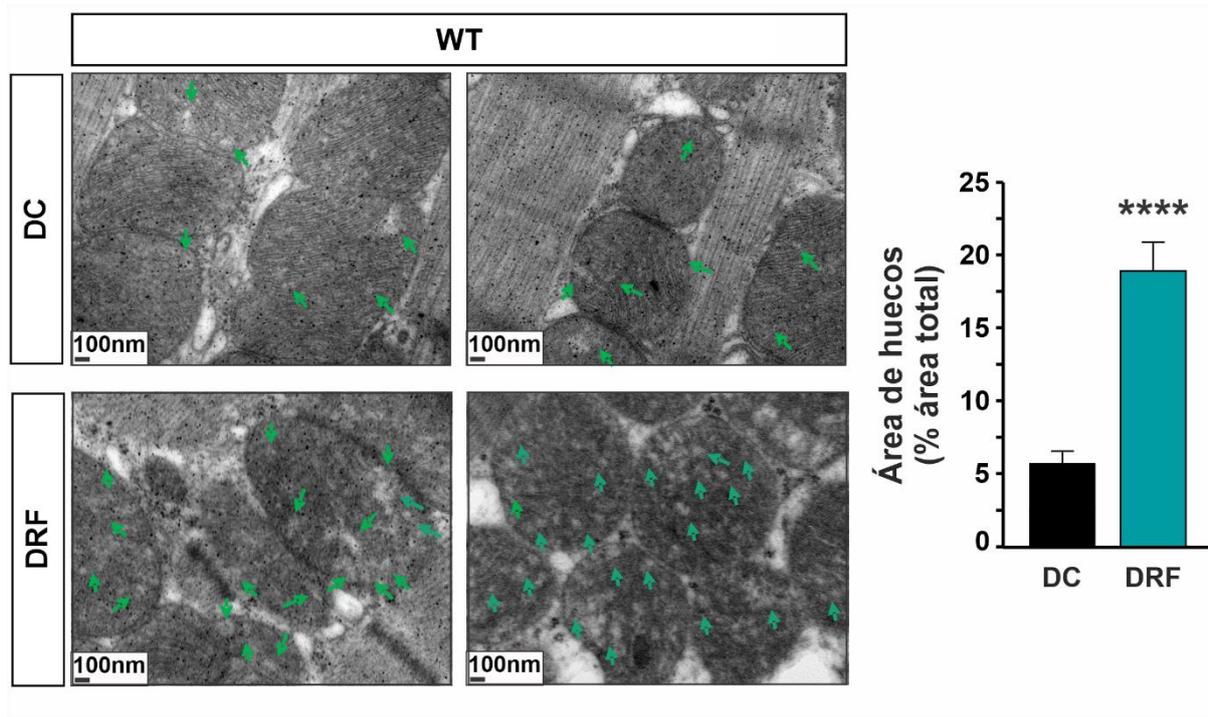


Figura 6.3. La prediabetes genera cambios en la estructura de las crestas mitocondriales y huecos en el interior de la mitocondria.

A, imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (MET) de muestras de tejido cardíaco de ratones WT tratados con DC y DRF, en magnificación de 80000x. B, gráfico de barras que representa el porcentaje de área mitocondrial ocupada por huecos o holes. En el tejido cardíaco de ratones WT DRF se observaron alteraciones en las crestas mitocondriales (indicado con flechas verdes), compatible con el swelling o hinchamiento mitocondrial, y disrupción de la organización intramitocondrial, en comparación con corazones de ratones WT tratados con DC. WT: wild type o cepa salvaje, DC: dieta control, DRF: dieta rica en fructosa. Promedio \pm SEM, **** $p < 0,0001$, se analizaron 9 mitocondrias de 3 imágenes diferentes por cada corazón, $n = 3$ corazones por grupo.

6.3.2. La prediabetes induce cambios en el potencial de membrana mitocondrial

Los cambios en la captación de Ca^{2+} pueden influenciar el $\Delta\psi$ y viceversa, por lo tanto, debido a que observamos cambios en la CRC y sobrecarga de Ca^{2+} , podría generarse despolarización de la membrana mitocondrial en los corazones prediabéticos. El $\Delta\psi$ se evaluó en cardiomiocitos aislados de ratones tratados con DC y DRF, cargados con el indicador de $\Delta\psi$ mitocondrial, JC-1. Este indicador, como se indica en la sección **Determinación del potencial de membrana mitocondrial**, es una sonda que se une a la membrana mitocondrial y emite fluorescencia a distintas longitudes de onda según el $\Delta\psi$ mitocondrial. La emisión roja indica un $\Delta\psi$ mitocondrial de aproximadamente -180 mV, mientras que la emisión verde indica un $\Delta\psi$

mitocondrial mayor (menos negativo). La disminución de la relación de intensidades de emisión registradas a 590 nm y 530 nm (590/530 nm) indica una mayor despolarización mitocondrial. En la **Figura 6.4** se observan fotografías representativas de cardiomiocitos aislados de ratones WT tratados con DC y DRF en las distintas emisiones (590 y 530 nm) junto con la imagen de ambas emisiones en conjunto. Como se aprecia en la imagen representativa y se observa en los resultados promedios, se encontró una mayor relación de emisiones 590/530 nm, y por ende, en la despolarización mitocondrial en los cardiomiocitos de ratones WT DRF respecto de los cardiomiocitos de ratones WT DC.

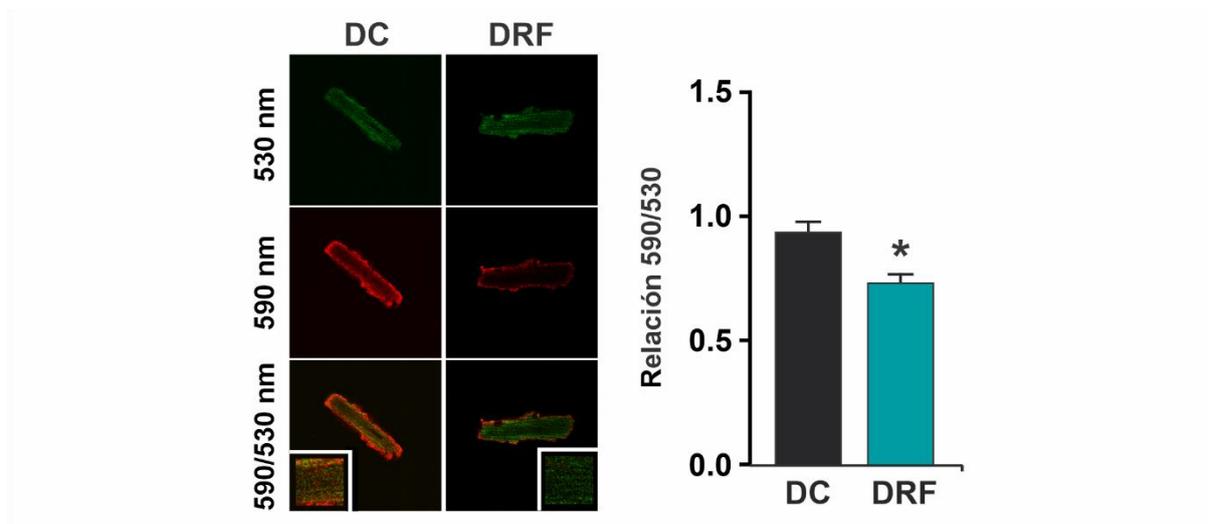


Figura 6.4. La prediabetes afecta el potencial de membrana mitocondrial.

Fotografías representativas de cardiomiocitos aislados de ratones WT tratados con DC y DRF, cargados con el indicador de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), JC-1. El indicador emite a $\lambda = 530 \text{ nm}$ y 590 nm , y la relación de emisión 590/530 nm expresa la magnitud de despolarización en las mitocondrias de los cardiomiocitos. En los resultados promedios mostrados en el gráfico de barra se observa despolarización mitocondrial por una disminución en la relación 590/530 nm en cardiomiocitos aislados de ratones WT DRF respecto de los cardiomiocitos aislados de ratones WT DC. **WT**: wild type o cepa salvaje, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, 16 - 27 cardiomiocitos de 3 - 5 animales por grupo.

6.3.3. La prediabetes desencadena alteraciones en el metabolismo mitocondrial cardiaco

Debido a que el Ca^{2+} mitocondrial activa a 3 de las deshidrogenasas del ciclo TCA, su mayor captación puede ser beneficiosa, o si se supera cierto límite, puede terminar en procesos deletéreos como ocurre con la apertura del mPTP. Debido a esto, la proximidad RS-mitocondria puede ser útil para aumentar la actividad mitocondrial en la prediabetes, pero puede tornarse perjudicial y afectar tanto propiedades como funciones mitocondriales cuando supera un umbral crítico. Basados en las diferencias en la ultraestructura del tejido y las

alteraciones en el manejo de Ca^{2+} , nos propusimos evaluar si el metabolismo y la bioenergética mitocondrial se veían afectados por la DRF. Para ello, medimos el consumo de O_2 mitocondrial y la velocidad de producción de ATP y de H_2O_2 en mitocondrias aisladas (para más detalle ver *Determinación del consumo de oxígeno mitocondrial, Determinación de la producción de ATP, y Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno*).

Las mitocondrias de ratones tratados con la DRF mostraron un incremento del consumo de O_2 en estado 4 (estado respiratorio en reposo, sin ADP extra) sin cambios del consumo de O_2 en estado 3 (estado respiratorio en actividad, con el agregado de ADP) respecto de las mitocondrias de ratones tratados con DC. Apoyando estos resultados, el cociente entre el estado 3 y estado 4 o CR, que representa la integridad y el acoplamiento mitocondrial se encontró disminuido en las mitocondrias de corazones de ratones tratados con DRF respecto de las mitocondrias DC (*Figura 6.5.a*).

La velocidad de producción de ATP no mostró diferencias en mitocondrias de ratones tratados con DRF respecto de DC (*Figura 6.5.b*), pero si se observaron cambios en la velocidad de producción mitocondrial de H_2O_2 . Como se muestra en la *Figura 6.5.b* las mitocondrias de ratones tratados con DRF tienen un aumento en la velocidad de producción de H_2O_2 respecto de las mitocondrias de ratones tratados con DC. El aumento en el consumo de O_2 en estado 4 y la disminución del CR junto con una mayor velocidad de producción de H_2O_2 , demuestran que hay alteraciones en el metabolismo mitocondrial de los corazones prediabéticos.

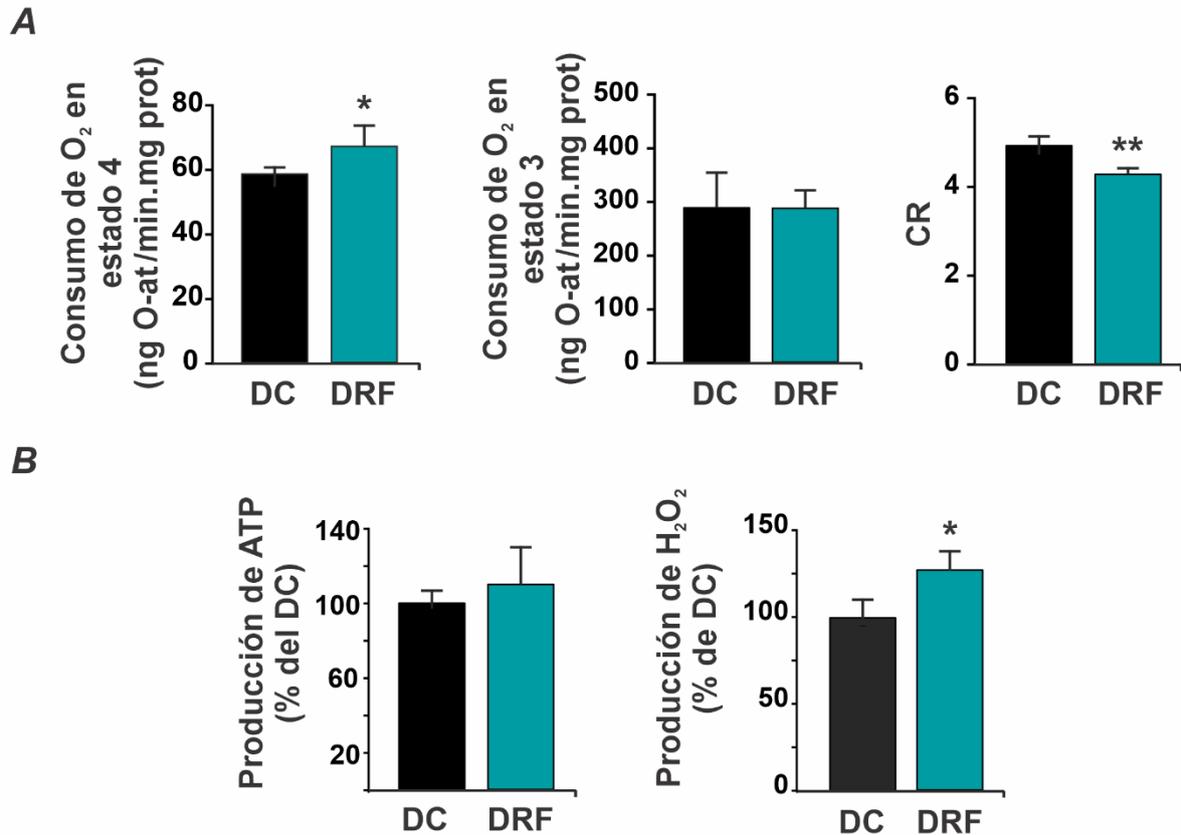


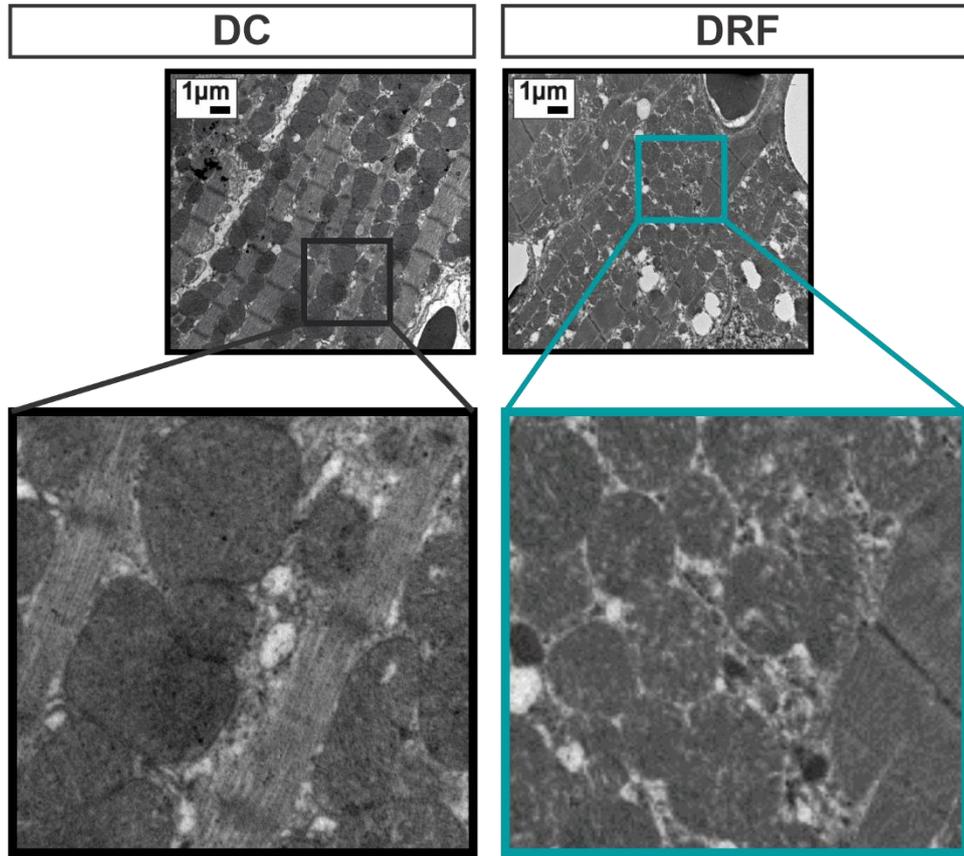
Figura 6.5. Los corazones prediabéticos presentan alterado el metabolismo mitocondrial. Mitocondrias aisladas de ratones tratados con DC y DRF. **A**, promedio de la velocidad de consumo de O₂ en estado 4 (sin ADP extra), en estado 3 (con la adición de ADP), y la relación control respiratorio. El control respiratorio fue calculado como la velocidad de respiración en estado 3/estado 4. **B**, promedio de las velocidades de producción de ATP y de H₂O₂, expresadas como % del grupo DC. El consumo de O₂ en estado 4 aumento y el CR disminuyó, mientras se encontró un incremento en la producción de H₂O₂ sin cambios en la producción de ATP en las mitocondrias de los corazones de ratones tratados con DRF respecto de DC. **CR**: control respiratorio, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, $n = 4$ por grupo

6.3.4. La prediabetes afecta la morfología mitocondrial

Debido a que se encontró una disfunción mitocondrial asociada a la prediabetes en estos animales, investigamos si estas alteraciones estaban asociadas con cambios en la morfología mitocondrial. Para abordar esto, tomamos fotografías del tejido cardiaco mediante MET de ratones tratados con DC y DRF. La **Figura 6.6** muestra que la DRF generó alteraciones morfológicas en mitocondrias de estos corazones cuando se compararon con mitocondrias de corazones de ratones tratados con DC. Se encontró una disminución significativa en el tamaño (diámetro y área), y en el índice de redondez y diámetro Feret mitocondrial, junto con un aumento en la densidad mitocondrial (número

de mitocondrias/unidad de área) en corazones de ratones tratados con DRF respecto de aquellos tratados con DC.

A



B

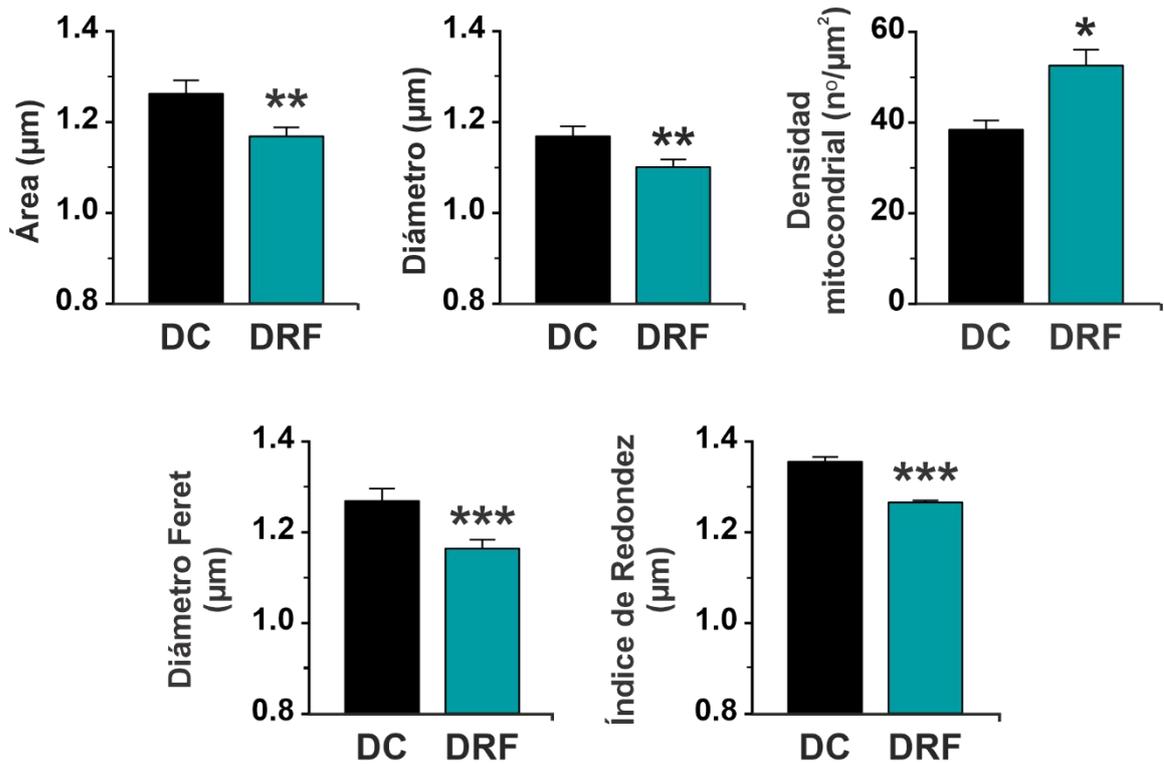


Figura 6.6. Las mitocondrias de corazones prediabéticos presentan modificaciones en la morfología y densidad mitocondrial.

A, Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) de tejido cardíaco de animales tratados con DC y DRF. Los recuadros, negro para DC y verde para DRF, muestran una ampliación realizada en una zona del tejido abundante en mitocondrias, para apreciar mejor la morfología mitocondrial. *B*, datos promedio \pm SEM en los gráficos de barras, de parámetros de morfología mitocondrial (Índice de Redondez, Diámetro Feret, Área, y Diámetro) y densidad mitocondrial (número de mitocondrias/unidad de área). Los corazones de ratones tratados con DRF presentan una disminución en el diámetro y área, y se acercan a la mayor redondez y diámetro Feret (valor = 1), mientras la densidad mitocondrial aumenta con respecto a los corazones de ratones tratados con DC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. $n = 196 - 255$ mitocondrias analizadas de fotografías tomadas, de 3 corazones por cada tratamiento. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa.

Estos cambios se acompañaron de un aumento de las vacuolas observadas en las fotografías de corazones de ratones tratados con DRF respecto de los corazones de ratones DC. Como se mencionó previamente, en el **Capítulo 5**, esto puede corresponderse con alguno de los estadios terminales de la fragmentación mitocondrial dada durante los procesos deletéreos en el corazón.

6.3.5. Los corazones prediabéticos presentan un desbalance en la dinámica mitocondrial

La disminución en el tamaño de las mitocondrias, el aumento en la densidad mitocondrial y las alteraciones a nivel metabólico en estas organelas, sugieren que puede haber fragmentación mitocondrial en los corazones prediabéticos. Esto puede ocurrir por un aumento en la fisión, disminución de la fusión o ambos. Como se mencionó previamente Opa1, Mfn1 y Mfn2 han sido descritas como proteínas esenciales para la fusión mientras Drp1 es el mayor regulador de la fisión mitocondrial (Cipolat et al., 2004; A. R. Hall et al., 2014; Herskovits et al., 1993). Para evaluar estos procesos medimos la expresión de estas proteínas en homogenatos de corazón de ratones tratados con DC y DRF. Como puede observarse en la **Figura 6.7**, se encontró un aumento en la expresión de Drp1 en los corazones de ratones tratados con DRF respecto de los corazones de ratones DC, sin cambios significativos en la expresión de Opa1.

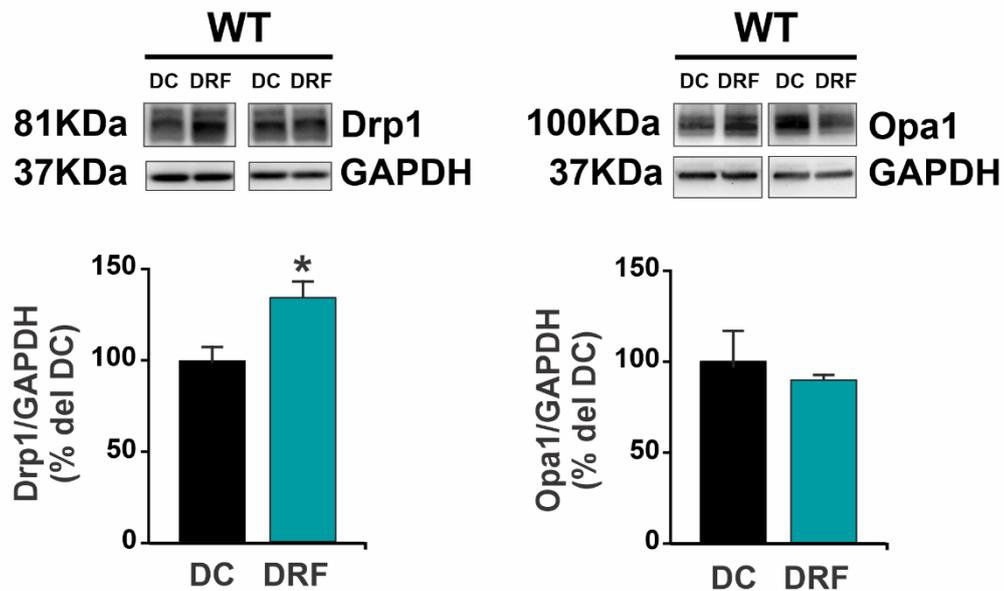


Figura 6.7. La prediabetes induce un aumento en la expresión de proteínas de fisión mitocondrial.

Inmunoblots representativos de la expresión *Drp1* y *Opa1*, proteínas de fisión y fusión, respectivamente, y valores promedio en los gráficos de barras. Los homogenatos de corazones de ratones WT DRF mostraron un incremento en la expresión de *Drp1*, pero no se observaron cambios en la expresión de *Opa1* respecto a los WT DC. $n = 3 - 5$, $* p < 0,05$. **WT**: wild type o cepa salvaje, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa.

Estos resultados muestran un desbalance en la dinámica mitocondrial que favorece la fisión mitocondrial, relacionada a eventos deletéreos.

6.4. Conclusión y Discusión

Los resultados de este capítulo demuestran que la mitocondria es una organela activa en la patogénesis del corazón prediabético, participando en la cascada apoptótica. Muy posiblemente las alteraciones a nivel mitocondrial se correlacionen con las pérdidas de Ca^{2+} a través del RS disminuye la distancia entre ambas organelas, y aumenta la expresión de proteínas que se ubican en los microdominios entre organelas como Mfn2, Grp75 y VDAC, que favorecerían el tráfico del ion a la mitocondria.

El Ca^{2+} mitocondrial juega un papel elemental para la mitocondria, dado que se encuentra equilibrado con consumo de O_2 en la ETC, la producción de ATP y de ROS (Brookes et al., 2004). Un desbalance en estos parámetros puede causar la apertura del mPTP, generando pérdidas de solutos y compuestos que llevan a la apoptosis celular, dado que tanto el aumento de Ca^{2+} como el aumento de los ROS pueden causar la apertura de este poro.

En el modelo de prediabetes, se encontró un aumento del *swelling* mitocondrial, una disminución de la CRC y cambios en el $\Delta\Psi$. Estos tres parámetros en conjunto señalan un aumento en la sensibilidad y apertura del mPTP, que conducirán a un mayor daño de la organela y la célula. Nuestros experimentos para medir de $\Delta\Psi$ fueron realizados en cardiomiocitos enteros aislados, y esto tuvo como objetivo mantener el entorno celular, particularmente el Ca^{2+} de los microdominios RS-mitocondria, que puede variar este parámetro.

Cabe mencionar, que al abrirse el mPTP, en conjunto con la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, se liberan desde las mitocondrias diferentes componentes, entre los que se encuentra el citocromo c que, como se discutió en el **Capítulo 2**, es uno de los primeros pasos de la activación de proteínas pro-apoptóticas que desencadenan la muerte celular.

Los experimentos realizados para medir el metabolismo mitocondrial demostraron que, asociados a los cambios en la CRC, *swelling* y $\Delta\Psi$ mitocondrial, se vio afectada la funcionalidad de la organela. Se presentó un aumento de consumo en el O_2 en estado 4, con menor CR que no se relacionó con un aumento en el ATP producido, lo que finalmente generó mayor producción de H_2O_2 . La producción de ROS por la ETC se genera en los *Complejos I y III* durante el pasaje de e^- . Cuando la ETC se encuentra en estado 4, con abundante sustrato disponible, pero con una concentración limitada de ADP, es más propensa a producir ROS, debido a que los complejos se encuentra mayormente en estado reducido y los e^- se transportan más fácilmente (Murphy, 2008; Nickel et al., 2014). Cuando hay ADP en exceso, la ETC utiliza estos e^- para la producción de ATP y no hay formación exacerbada del ROS. En el caso de las

mitocondrias de animales prediabéticos, se produce un aumento de consumo de O₂ evidentemente destinando a la producción de ROS. A su vez, el aumento en los ROS puede desencadenar un aumento en el estrés oxidativo en el cardiomiocito. En este trabajo no medimos componentes del sistema antioxidante, por lo que no podemos concluir que específicamente hay un desbalance entre especies oxidantes y reductoras, y por ende un aumento de estrés oxidativo. Sin embargo, como se comentará en el **Capítulo 7**, si encontramos un aumento de peroxidación lipídica en los corazones prediabéticos, lo que apoya la posibilidad de que el aumento de ROS esté acompañado de un aumento en el estrés oxidativo.

Por otro lado, los experimentos de MET demostraron cambios en la morfología mitocondrial. Las mitocondrias provenientes de animales prediabéticos son en promedio más pequeñas y redondas, y presentaron alteraciones en la estructura de sus crestas, acorde al desempeño defectuoso de la organela. Al analizar el tejido de los corazones prediabéticos, y los cambios producidos en las mitocondrias, puede concluirse que suceden procesos de fraccionamiento mitocondrial, a su vez relacionados con un aumento en la expresión de las proteínas de fisión como Drp1, sin cambios en la expresión de proteínas de fusión, como Opa1. En conjunto, estos resultados indican que los procesos de fisión están predominando en el tejido cardiaco de ratones prediabéticos. Esto puede deberse a que el corazón necesita conservar a esta organela en el mejor estado posible para mantener la producción de ATP y contractilidad en estadios tempranos de la patología.

Capítulo 7. Rol de la enzima CaMKII en el corazón prediabético

7.1. Introducción

7.1.1. Estructura y activación de la enzima CaMKII

Como se mencionó en el capítulo introductorio, la enzima CaMKII es una quinasa serina/treonina que responde a cambios en la concentración de Ca^{2+} (Jett et al., 1987). Existen 4 isoformas (α , β , γ , y δ), de las cuales CaMKII γ y δ , son ubicuas, siendo la isoforma δ la predominante en el corazón (Maier & Bers, 2002). Se conocen once formas de *splicing* alternativo de CaMKII δ nombradas desde la letra A hasta la K, que poseen diferente ubicación dentro de la célula, por ejemplo CaMKII δ -B presenta una secuencia de 11 aminoácidos en un sitio variable que determina su ubicación en el núcleo, mientras CaMKII δ -C se encuentra en el citoplasma (Edman & Schulman, 1994; Gray & Heller Brown, 2014).

CaMKII, es una enzima homo- o hetero-multimérica compuesta por 6-12 subunidades. Cada monómero, pesa 50 KDa, y poseen alrededor de 480 aminoácidos conformados en 3 dominios; un dominio catalítico asociado al grupo amino-terminal, un dominio regulador (que contiene autoinhibidores y es donde se une calmodulina (CaM)) en la sección central, y un dominio de asociación responsable de la oligomerización de la enzima en el carboxi-terminal (A. P. Braun & Schulman, 1995; Maier & Bers, 2002). Como se muestra en la **Ilustración 7.1**, el dominio regulador que posee la región autoinhibidora, se encuentra cercana al sitio activo del dominio catalítico, bloqueando el acceso a los sustratos. Cuando el Ca^{2+} aumenta, la CaM une 4 iones Ca^{2+} formando el complejo CaM/ Ca^{2+} que se une al dominio regulador para desplazar así la región autoinhibidora. De esta forma CaMKII queda activa y con la posibilidad de autoactivarse.

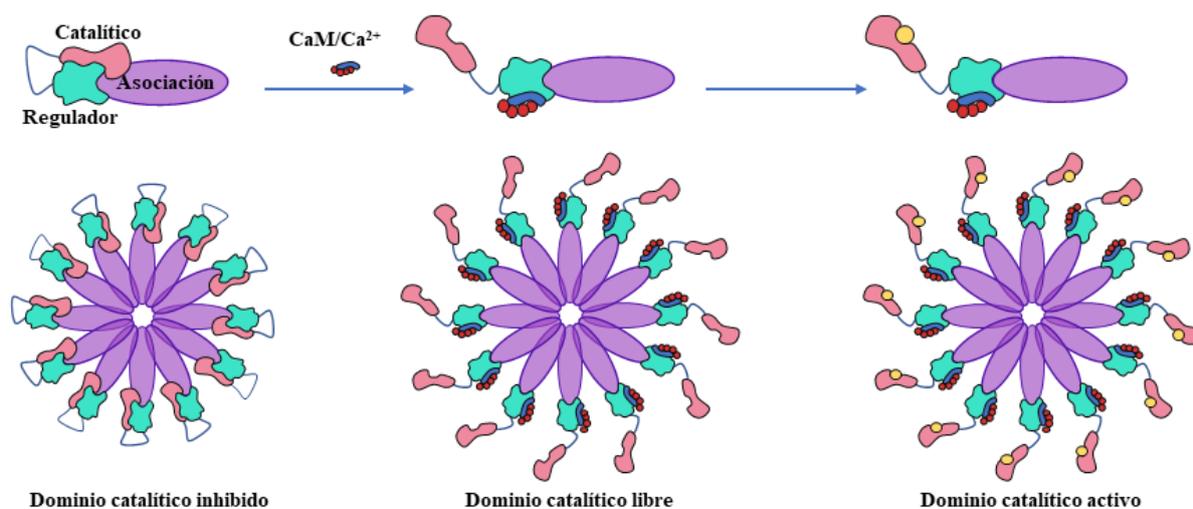


Ilustración 7.1. Esquema de la estructura de la enzima CaMKII.

En el estado inactivo, el dominio regulador (en verde) se encuentra inhibiendo los sitios de unión a sustrato del dominio catalítico (rosa). En presencia de Ca^{2+} , se forma el complejo CaM/Ca^{2+} que se une al dominio regulador, generando un cambio conformacional que libera al estado catalítico. En este estado, la enzima CaMKII puede fosforilar sus sustratos (círculos amarillos) y puede auto fosforilarse para independizarse de la concentración de Ca^{2+} . **CaM:** calmodulina.

La unión de CaM/Ca^{2+} al sitio regulatorio tiene un K_D de alrededor de 10 - 70 nM cuando el Ca^{2+} es elevado (Gaertner et al., 2004). Cuando la exposición a Ca^{2+} es prolongada o frecuente, como ocurre durante la sístole, se produce autofosforilación entre las subunidades de CaMKII en el sitio Thr²⁸⁷, que genera una afinidad 1000 veces mayor por CaM/Ca^{2+} , generando independencia de la concentración de Ca^{2+} para mantenerse activa (Lai et al., 1987; Meyer et al., 1992). Además, el agregado de un grupo fosfato al sitio Thr²⁸⁷ genera un aumento en las cargas negativas que impide la unión de los dominios regulador y catalítico (Lai et al., 1987), favoreciendo así que CaMKII se mantenga activa. La autofosforilación de CaMKII es particularmente prevalente durante el estímulo β -adrenérgico en el corazón (Erickson, Patel, et al., 2011). Para inactivar a la enzima CaMKII existen fosfatasas como PP-1 y PP-2 que pueden revertir la fosforilación en el sitio Thr²⁸⁷ (Strack et al., 1997). Además, otro mecanismo regulador independiente de fosfatasas es la autofosforilación del sitio Thr³⁰⁷ que previene la unión de CaM al dominio regulador (Rellos et al., 2010).

Además de la activación por CaM/Ca^{2+} , la enzima CaMKII puede activarse por otras modificaciones postraduccionales como ROS, nitrosilación, y glicosilación, donde se agrega un grupo O-GlcNAc (del inglés *O-linked N-acetylglucosamine*) a la enzima (Erickson et al.,

2013, 2015; Palomeque et al., 2009). Particularmente, la oxidación de CaMKII es una de las modificaciones postraduccionales más estudiadas ya que se ha encontrado oxidada en diferentes condiciones patológicas participando de los efectos deletéreos en estas patologías (B. J. He et al., 2011; Palomeque et al., 2009; Sommese et al., 2016; Velez Rueda et al., 2012). Para activarse por oxidación, CaMKII posee los sitios Met²⁸¹/Met²⁸² que pueden ser oxidados en condiciones de estrés oxidativo (Erickson, He, et al., 2011). Además, se ha observado que el cambio en el estado redox del residuo Met²⁸², permite que no vuelvan a unirse el sitio catalítico y regulador de la enzima, garantizando la actividad de CaMKII aunque cambien los niveles de Ca²⁺ en el medio (Rellos et al., 2010). La enzima encargada de disminuir la actividad de CaMKII por oxidación es la enzima metionina sulfamida reductasa (Erickson et al., 2008). Por su lado, la modificación postraducciona producida con el agregado de grupos O-GlcNAc se ha observado en condiciones de alta glucosa (Erickson et al., 2013; S. Lu et al., 2020). La glicosilación de CaMKII con el agregado del grupo O-GlcNAc es catalizado por la O-GlcNAc transferasa en presencia de UDP-N-acetilglucosamina, en condiciones de alta glucosa como en la diabetes (Hart et al., 2007). En esta situaciones, cuando CaMKII se activa inicialmente por CaM/Ca²⁺ puede sufrir el agregado del grupo O-GlcNAc en el sitio Ser²⁸⁰ del dominio regulatorio, resultando en la activación autónoma de la enzima (Erickson et al., 2013). La nitrosilación se ha descrito durante el estímulo β adrenérgico, donde el NO aumenta. Gutierrez *et. al.*, observaron que la activación de CaMKII se previene al inhibir el aumento de NO generado ante un estímulo β adrenérgico. También se ha demostrado *in vitro* que la CaMKII posee residuos Cys²⁹⁰ que pueden ser S-nitrosilados (Gutierrez et al., 2013).

7.1.2. Función de CaMKII en el acoplamiento excitación-contracción

Como se introdujo en el **Capítulo 1**, la enzima CaMKII ha sido identificada como un partícipe importante en la regulación de canales iónicos y proteínas que participan en el ECC (Maier & Bers, 2007). Inicialmente se observó que CaMKII se encontraba prevalentemente activa durante los estímulos β adrenérgicos, siendo esta actividad dependiente de la compleja relación entre Ca²⁺, PKA y fosfatasa. Posteriormente, CaMKII se comenzó a estudiar en situaciones patológicas donde podía mantenerse activa independientemente de PKA y el aumento de Ca²⁺ (Erickson, Patel, et al., 2011).

CaMKII puede fosforilar varios sitios en el LTCC, lo que genera un aumento del ingreso de Ca²⁺ durante la fase 2 del potencial de acción. Se ha descrito que CaMKII puede asociarse a

la subunidad $\alpha 1c$ del LTCC y fosforilar regiones que están implicadas en la regulación de la función del canal (Hudmon et al., 2005). También, como se describió detalladamente en el **Capítulo 4**, el RyR2 tiene varios sitios fosforilables por distintas quinasas, entre las cuales se encuentra CaMKII. El sitio consenso para CaMKII en el RyR2 es Ser²⁸¹⁴, y su fosforilación produce un aumento de la P_0 y actividad del canal, generando mayor salida de Ca^{2+} desde el RS al citosol (T. Guo et al., 2006; X. H. Wehrens et al., 2004). Otra proteína del RS en donde se conoce la acción de CaMKII es PLN. Se ha observado que cuando CaMKII se encuentra activa puede fosforilar el sitio Thr¹⁷ en PLN, lo que produce la separación de esta proteína de SERCA2a y aumenta la recaptación de Ca^{2+} del RS (Mundiña-Weilenmann et al., 1996).

Por otro lado, CaMKII también puede regular la apertura de canales Na^+ fosforilando los sitios Ser⁵¹⁶, Thr⁵⁹⁴ y Ser⁵⁷¹ del mismo, lo que enlentece la inactivación rápida del canal, generando una entrada lenta de Na^+ (Wagner et al., 2006). La entrada de Na^+ puede limitar la salida de Ca^{2+} por el intercambiador NCX, o incluso permitir el ingreso de Ca^{2+} por esta vía, modificando con este mecanismo también, los niveles de Ca^{2+} citosólicos (Weber et al., 2003).

Los efectos de CaMKII se extienden a organelas como las mitocondrias y también a nivel nuclear. Utilizando inhibidores de CaMKII se encontró que la enzima tiene efecto sobre la función mitocondrial debido a que puede influenciar la entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial, y consecuentemente generar alteraciones en su función y muerte celular, que se previnieron al inhibir a la enzima (Joiner et al., 2012).

A nivel nuclear, la isoforma CaMKII δ B es la responsable de las alteraciones producidas. En los primeros estudios realizados para diferenciar la actividad de CaMKII δ B y C, encontró que en presencia de CaMKII δ B se producía un aumento de la expresión del factor natriurético y aumento en la organización de miofilamentos en cardiomiocitos neonatos, ambos índices de hipertrofia, que no ocurría en presencia de CaMKII δ C (Ramirez et al., 1997). De acuerdo a esto, se realizaron otros estudios que indican que la señalización de CaMKII δ B activa varios factores de transcripción, entre los que se encuentran MEF-2 (del inglés *myocyte enhancer factor*), HSF1 (del inglés *heat shock factor 1*) y GATA-3 (Little et al., 2009; Y.-M. Lu et al., 2010; Peng et al., 2010).

Sorprendentemente, a pesar de las múltiples funciones fisiológicas de CaMKII, ratones *knockout* para la enzima tienen un ECC y sobrevivida normal si no son sometidos a estrés (Grimm et al., 2015).

7.1.3. Efectos deletéreos de CaMKII en el corazón

La enzima CaMKII ha sido asociada mayormente a eventos deletéreos en el corazón cuando se encuentra hiperactiva. Algunos ejemplos de esto son: la producción de arritmias, señalización de marcadores de inflamación, hipertrofia y apoptosis.

CaMKII puede promover la producción de arritmias por una prolongación del potencial de acción debido a que puede aumentar la P_0 del LTCC (Greenstein et al., 2014) y también al aumentar la activación de RyR2 por la fosforilación en el sitio Ser²⁸¹⁴, provocando pérdidas de Ca²⁺ desde el RS (McCauley & Wehrens, 2011).

Además se ha observado que CaMKII puede aumentar la expresión de genes pro-inflamatorias mediante señalización del factor NF- κ B (Singh et al., 2009). Posterior a una infusión de angiotensina II, CaMKII induce la activación de NF- κ B, expresión de citoquinas y quimoquinas inflamatorias, iniciando la formación del inflamosoma, y reclutando macrófagos, lo que finalmente generarán fibrosis en el tejido cardiaco (Willeford et al., 2018).

La apertura del mPTP, el aumento de la apoptosis celular y la producción de hipertrofia, también se han atribuido al aumento de la actividad de la enzima (Backs et al., 2009; S. Xu et al., 2016; W.-Z. Zhu et al., 2003).

En la DM, donde existe un aumento en la glucemia, CaMKII es activada mediante glicosilación, por el agregado del grupo O-GlcNac y esto genera susceptibilidad a las arritmias (Erickson et al., 2013). Durante el desarrollo de la DM se ha descrito que hay un aumento en los ROS que desencadenan distintos efectos dependientes del estrés oxidativo (Jay et al., 2006). En este caso, además de la activación por O-GlcNac, la activación de CaMKII por estrés oxidativo (ox-CaMKII) ha sido estudiada, y se demostró que el aumento de ox-CaMKII provoca aumento de la mortalidad en pacientes diabéticos que sufrieron un infarto de miocardio (M. Luo et al., 2013).

En cuanto a la prediabetes, en el grupo de trabajo se ha encontrado un aumento de arritmias dependientes de CaMKII (Sommese et al., 2016). Para el estudio de las arritmias en este modelo se realizaron ECG en animales WT y animales SRAIP (poseen el péptido inhibidor AIP dirigido al RS) tratados con DC y DRF, para generar prediabetes. En los animales WT DRF se observó un aumento en las arritmias producidas bajo condiciones de estrés, generadas con una dosis de Epinefrina+Cafeína, mientras que en los animales SRAIP DRF se obtuvo un registro normal, similar al registro obtenido para ratones WT DC (Sommese et al., 2016). En este trabajo, además de describir los efectos de CaMKII, se estudió la forma de activación de la enzima, y se encontró un aumento en la expresión de ox-CaMKII y de estrés oxidativo, por lo

que se concluyó que el aumento de estrés oxidativo genera la activación de CaMKII que promueve el aumento de arritmias (Sommese et al., 2016).

En este contexto y con todo lo abordado a través del trabajo de tesis, nos preguntamos si CaMKII se encuentra hiperactiva por un aumento de estrés oxidativo, y generando las alteraciones en el manejo de Ca^{2+} que promueven la apoptosis cardiaca en el modelo de prediabetes. Por lo que el objetivo específico que será abordado este capítulo fue comprobar que CaMKII se encuentra involucrada en los mecanismos deletéreos que presenta el corazón prediabético que culminan en la apoptosis.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Inhibidores de CaMKII

Para el estudio de CaMKII existen diversas herramientas que se basan en modular a la enzima, ya sea de forma genética o farmacológica. Un inhibidor utilizado usualmente para evaluar efectos de forma aguda es KN-93. Este compuesto se une competitivamente al sitio de CaM/Ca²⁺ lo que impide la unión posterior de ATP. Debido a que actúa sobre el dominio regulatorio, es capaz de evitar la activación y autofosforilación. KN-93 presenta efectos inespecíficos (Gao et al., 2006) por lo que debe compararse con experimentos realizados en presencia de su análogo inactivo, KN-92 (Sumi et al., 1991). Estos inhibidores fueron utilizados en el cultivo de las células HEK293 como se describe en el *Modelo Celular* en el **Capítulo 2**. El dominio catalítico de CaMKII posee sitios de autofosforilación que fueron utilizados para desarrollar inhibidores peptídicos (autocamida-2 y 3) (Hanson et al., 1989). Teniendo la base de acción de la autocamida-2, se generó un péptido análogo no fosforilable, cambiando un residuo Thr por alanina, llamado AIP (del inglés *autocamide-2-related inhibitory peptide*) (Ishida et al., 1995). AIP ha sido utilizado para la inhibición aguda de la activación de CaMKII (Vila-Petroff et al., 2007).

Para inhibir de forma crónica la actividad de CaMKII los estudios se enfocaron en generar animales transgénicos que presentan inhibición en la activación de CaMKII o en sus blancos fosforilables. En el corazón, y particularmente relevantes para este trabajo, se generaron los animales AC3I (R. Zhang et al., 2005); que expresan un péptido inhibidor de CaMKII en todo el miocardio, y los SRAIP (Ji et al., 2003); que poseen el péptido AIP dirigido al RS lo que impide que CaMKII fosforile sus blancos en el RS. En este sentido también se desarrollaron animales *knock-in* como S2814A (Chelu et al., 2009), que poseen el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 mutado a alanina, por lo que no puede ser fosforilado por CaMKII, o los S2814D (Van Oort et al., 2010) que poseen el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 mutado a aspartato, que les permite tener una pseudofosforilación máxima constitutiva. Estos animales transgénicos se describieron en detalle en el **Capítulo 2**.

7.2.2. Medida de estrés oxidativo: TBARS

La peroxidación lipídica es un marcador de estrés oxidativo que puede medirse fácilmente a través de un método de quimioluminiscencia, mediante la detección de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (*TBARS*, por sus siglas en inglés *thiobarbituric acid reactive species*). El

producto final de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados es el malondialdehído (MDA). El MDA es un aldehído reactivo que puede reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA, del inglés *thiobarbituric acid*) para formar un producto colorimétrico (rosa) que absorbe a $\lambda = 532 - 535$ nm. Este producto es proporcional al MDA presente en la muestra.

Para esta determinación, los corazones fueron homogenizados con un buffer fosfato (140 mM KCl, 25 mM KH_2PO_4) y centrifugados a 1000 g por 10 minutos para extraer los restos celulares que quedan en el precipitado. Se mezclaron 500 μl del sobrenadante con 1500 μl de ácido tricloroacético (10 % p/v) y 1 ml de TBA (0.67 % p/v), y se llevó a ebullición por 15 minutos. Se dejó enfriar y se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a $\lambda = 535$ nm ($\epsilon = 1,56 \times 10^5/\text{mM}\cdot\text{cm}$). Los resultados fueron expresados en relación a la cantidad de proteínas de cada muestra.

7.2.3. Medida de *sparks* en ratones AC3I

Los ratones AC3I y AC3C son animales transgénicos que poseen insertado en su genoma un mini-gen que codifica para la expresión de un péptido inhibidor (o péptido inactivo en el caso de los AC3C) de CaMKII acoplado a la proteína GFP, por lo que emiten fluorescencia verde sin el agregado de ningún componente extra. Por este motivo, la medida de *sparks* mediante el uso de sondas como Fluo-3-AM, que emite fluorescencia en longitudes de onda cercanas al verde, pueden implicar una desventaja en la visualización de estos eventos. Es así que para medir las SCaRE en estos ratones se utilizó el indicador Rhod-2-AM, que posee simple excitación a $\lambda = 551$ nm, y emite fluorescencia en longitudes de onda cercanas al rojo ($\lambda = 581$ nm).

Las células fueron cargadas con el indicador 10 μM por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y luego se realizó un lavado en buffer HEPES con 2 mM CaCl_2 . Como se mencionó para los indicadores utilizados previamente, este indicador también posee un extremo acetometil éster que permite que atraviese la membrana celular y quede retenido en el citoplasma. Una vez cargadas las células, fueron perfundidas en una cámara conectada a un microscopio confocal Zeiss LSM 410, y se estimularon por un minuto a 1 Hz para abastecer al RS. Luego la liberación espontánea de Ca^{2+} fue medida en quiescencia y en confocalidad, en el modo barrido lineal durante 10 minutos, excitando con el láser a $\lambda = 543$ nm y colectando la

fluorescencia en el rango de $\lambda = 575 - 635$ nm. Cada imagen obtenida consiste en líneas de 512 píxeles obtenidas en intervalos de 4 milisegundos.

La mayoría de los métodos utilizados para los experimentos que se realizaron para evaluar la función de CaMKII fueron explicados en los capítulos previos.

7.3. Resultados

7.3.1. CaMKII se encuentra involucrada en el mecanismo de producción de la apoptosis.

Como se mencionó anteriormente, CaMKII se ha visto involucrada en los mecanismos deletéreos que producen arritmias en los corazones prediabéticos (Sommese et al., 2016), por lo que en este trabajo nos propusimos evaluar el rol de la enzima en la apoptosis. Para esto se utilizaron animales SRAIP que poseen inhibida la fosforilación por CaMKII en el RS tratados con DC y DRF. Se realizó la medida de apoptosis por la técnica TUNEL, y mediante el índice Bax/Bcl-2 (de la misma manera que se indicó en **3.2. Materiales y Métodos**).

Como se observa en la **Figura 7.1.a y b**, en los ratones SRAIP no se produjeron cambios en las medidas de apoptosis por TUNEL cuando se trató con la DRF respecto de la DC, y tampoco hubo cambios en la medida de apoptosis al realizar la medida de la relación Bax/Bcl2 (**Figura 7.1.c**). Esto implica que la enzima CaMKII se encuentra involucrada en la cascada apoptótica que se produce en el corazón prediabético, ya que la inhibición de la fosforilación de sus blancos en el RS mediante el uso de ratones SRAIP, evita la apoptosis al someter a los ratones a la DRF.

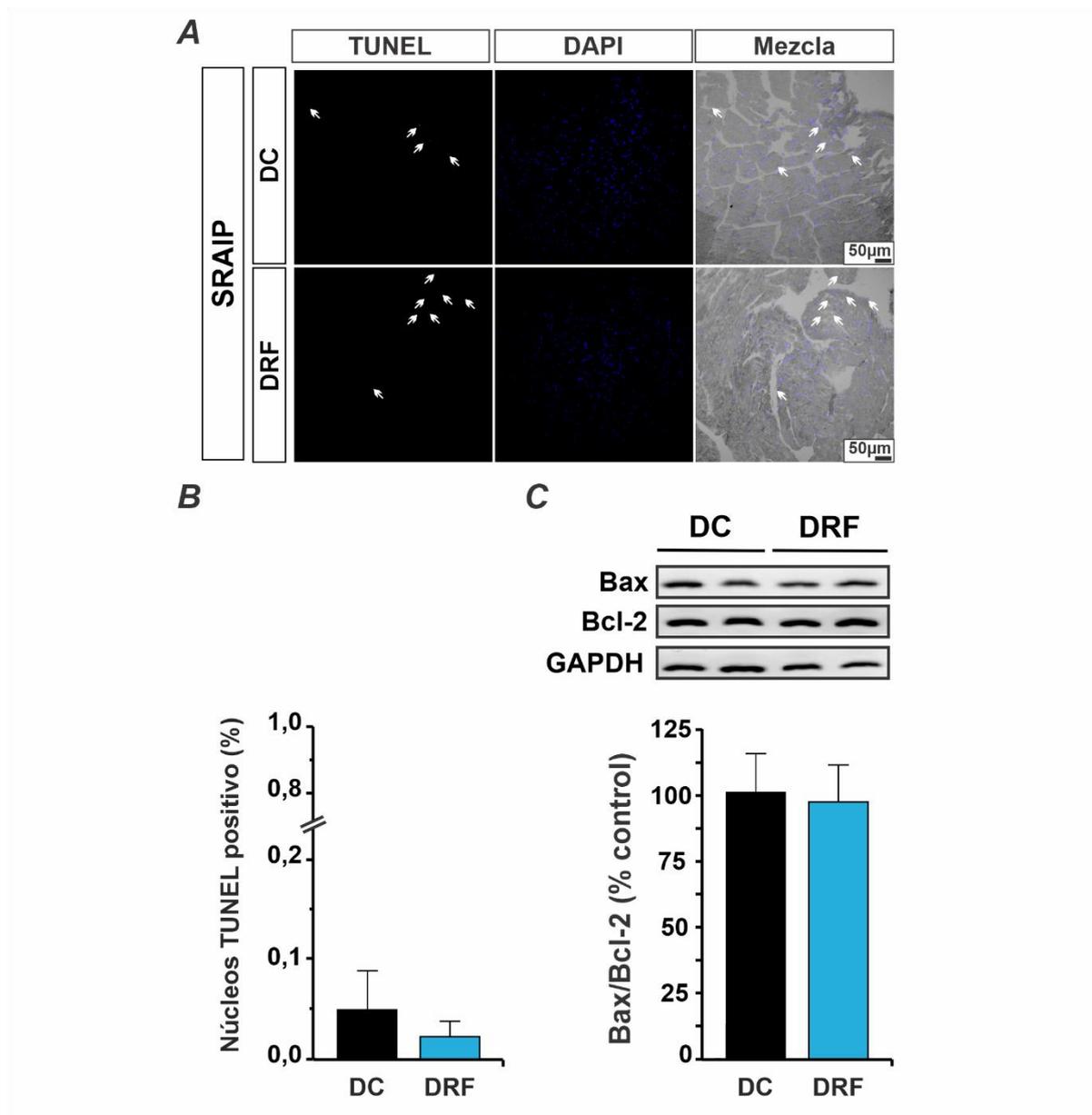


Figura 7.1. La inhibición de la actividad de CaMKII sobre sus sitios blanco en el RS previene la apoptosis.

A, Fotografías representativas de tejido cardiaco de animales SRAIP, que expresa un péptido inhibidor de CaMKII dirigido al RS, tratados con DC y DRF, con la marcación de TUNEL para núcleos apoptóticos (puntos rojos marcados con flechas), DAPI para núcleos, y la mezcla de ambas fotografías. **B,** gráfico de barras con los promedios \pm SEM donde se muestra que no hay diferencias significativas en el porcentaje de núcleos TUNEL positivo entre los grupos. **C,** relación de la expresión Bax/Bcl2 (como indicador de apoptosis), que se observó igual en los grupos DC y DRF. **TUNEL:** núcleos con el DNA fragmentado, **DAPI:** marca núcleos, **Bax:** proteína pro-apoptótica, **Bcl-2:** proteína anti-apoptótica, **DC:** dieta control, **DRF:** dieta rica en fructosa. $n= 4 - 6$ ratones por grupo.

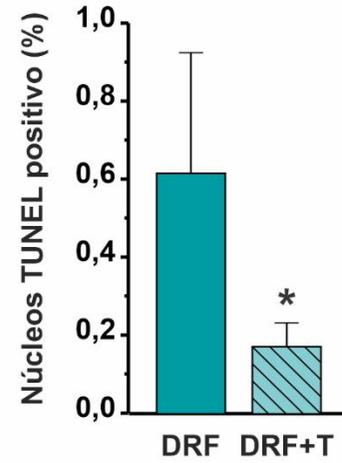
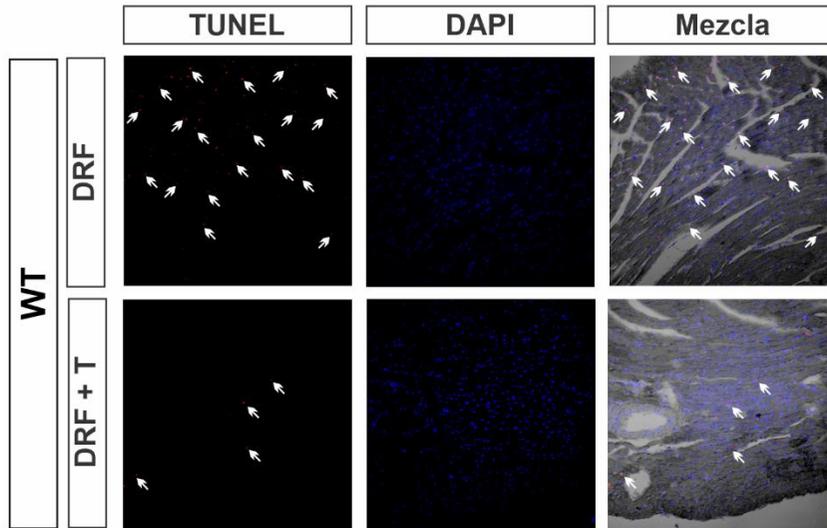
7.3.2. Mecanismo de activación de CaMKII en la cascada apoptótica

Se han descrito a los ROS como activadores de mecanismos que desencadenan la apoptosis (Y. He et al., 2018), y además se han usado como blancos para fármacos terapéuticos usados para prevenir el daño en la CMD (Ni et al., 2016). A su vez, los ROS también han sido asociados a la activación de enzimas como CaMKII (M. Luo et al., 2013; Palomeque et al., 2009). En estudios previos se observó que las arritmias producidas en los corazones de ratas prediabéticas se debían a un aumento en la activación de CaMKII por oxidación (Sommese et al., 2016). Para evaluar si efectivamente la apoptosis demostrada en el modelo de prediabetes estaba desencadenada por un aumento en el estrés oxidativo y le consecuente activación de CaMKII, se utilizó el secuestrador de ROS, Tempol, en el agua de bebida de los ratones junto con el tratamiento de la dieta rica en fructosa (DRF + T) como se menciona en la sección **Modelo Animal**, y se realizaron medidas de apoptosis y de estrés oxidativo con la técnica TBARS, en ratones WT y SRAIP tratados con DC, DRF y DRF+T.

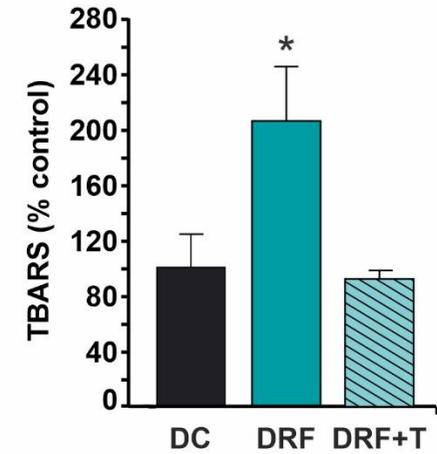
En los animales WT que tomaron la DRF+T, se evitó el desarrollo de la apoptosis en el tejido cardiaco ya que se observaron menor cantidad de núcleos TUNEL positivos, con DNA fragmentado, que en los animales tratados con la DRF (**Figura 7.2.a**). Sumado a esto, al medir el estrés oxidativo por TBARS, se observó un aumento en el tejido cardiaco proveniente de animales WT DRF que se previno al utilizar DRF + T (**Figura 7.2.b**). Esto indica que efectivamente el Tempol inhibe la producción de estrés oxidativo, y colabora en disminuir la apoptosis en el tejido cardiaco.

Al realizar los mismos experimentos en los ratones SRAIP para comprobar el rol de la CaMKII, se observó que no hay diferencias entre en el grupo DRF respecto del grupo DRF + T (**Figura 7.2.c**). Este resultado era esperable ya que en el grupo DRF no se había observado aumento de apoptosis inicialmente como se mencionó en el apartado anterior (**Figura 7.1**). Sin embargo, la medida de TBARS indica que en estos animales si presentan un aumento de estrés oxidativo generado por la DRF que se previene en el grupo DRF + T (**Figura 7.2.d**). Con todo esto se deduce que, en la situación en donde hay un aumento de estrés oxidativo con CaMKII inhibida, no se produce apoptosis. Esto revela que los ROS directamente no son la causa de la muerte celular y que necesariamente deben activar CaMKII para que se produzca el fenómeno apoptótico. Consecuentemente, estos resultaos muestran que el estrés oxidativo producido por la prediabetes activa a la enzima CaMKII, quién es responsable de los eventos posteriores que generan finalmente apoptosis.

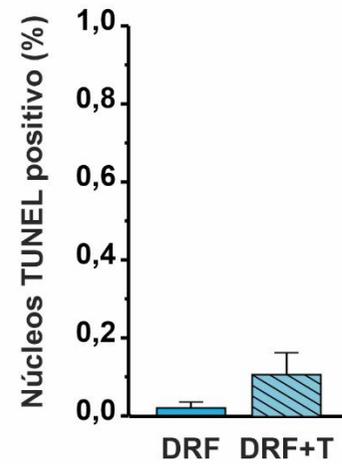
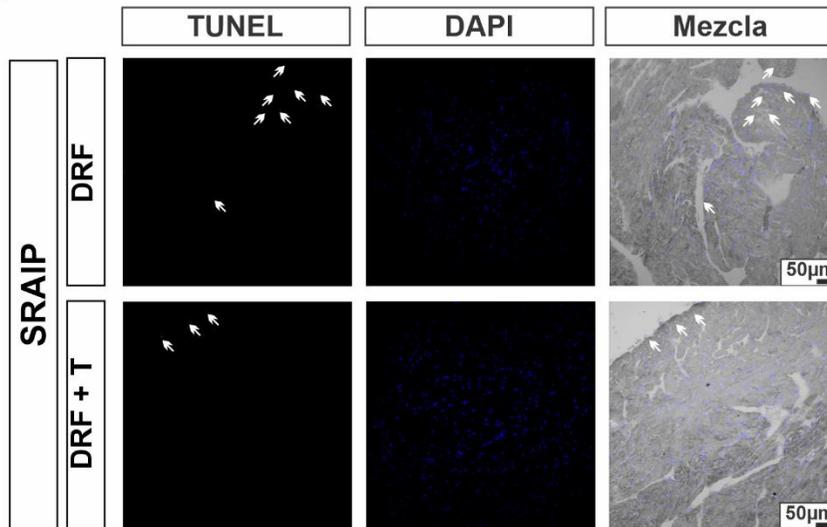
A



B



C



D

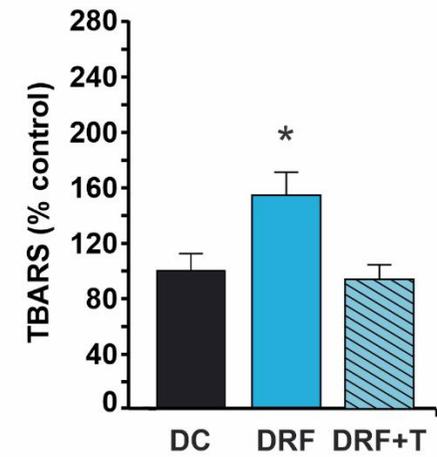


Figura 7.2. Los ROS activan a la enzima CaMKII y desencadenan apoptosis en el corazón prediabético.

A, fotografías representativas de tejido cardiaco de animales WT DRF y DRF+T, con la marcación de TUNEL para núcleos apoptóticos (puntos rojos marcados con flechas), DAPI para núcleos y la mezcla de ambas fotografías, junto con sus respectivos gráficos de barras con los promedios \pm SEM. **B**, medida de las ROS por la técnica TBARS en animales WT DC, DRF y DRF+T. En los ratones WT se reduce la apoptosis en el grupo DRF + T respecto del grupo DRF, al igual que la medida de estrés oxidativo por TBARS.

C, fotografías representativas de tejido cardiaco de animales SRAIP DRF y DRF+T con la marcación de TUNEL para núcleos apoptóticos (puntos rojos marcados con flechas), DAPI para núcleos y la mezcla de ambas fotografías, junto con sus respectivos gráficos de barras con los promedios \pm SEM. **D**, medida de las ROS por la técnica TBARS en animales SRAIP DC, DRF y DRF+T. Estos datos muestran que no hay cambios en los animales SRAIP, tanto en el grupo DRF como DRF+T, mientras si se produce un aumento de estrés oxidativo medido por TBARS en el grupo DRF que se evita en el grupo DRF + T. **WT**: wild type o cepa salvaje, **TBARS**: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, **SRAIP**: animales transgénicos que poseen inhibida la fosforilación por CaMKII en el RS, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa, **DRF + T**: dieta rica en fructosa con Tempol. * $p < 0.05$ respecto de DC, $n = 3 - 6$ animales por grupo.

7.3.3. La pérdida de calcio se encuentra aumentada debido a la actividad de CaMKII

Para evaluar si las pérdidas de Ca^{2+} son dependientes de CaMKII se realizó la **sección 4.2.2** en cardiomiocitos aislados. En una primera instancia se utilizaron los animales SRAIP, y como se observa en la **Tabla 7.1**, no se observaron diferencias significativas entre los SCARE (eventos espontáneos de liberación de Ca^{2+}) producidas en cardiomiocitos aislados de ratones tratados con DRF respecto de los DC.

| | DC | DRF |
|--|--------------------|--------------------|
| Número de animales | 14 | 10 |
| Frecuencia de Sparks (SCaRE/100μm x seg) | 0,1039 \pm 0.06 | 0,0166 \pm 0.009 |
| Frecuencia de Ondas (SCaRE/100μm x seg) | 0,04 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,007 |
| Frecuencia de CE (SCaRE/100μm x seg) | 0,0146 \pm 0,009 | 0,0285 \pm 0,02 |

Tabla 7.1. Liberaciones espontáneas de calcio en ratones SRAIP.

Ninguno de los SCARE (sparks, ondas y CE) fueron diferente entre los cardiomiocitos aislados de ratones tratados con DRF respecto de DC. **SCaRE**: liberaciones espontáneas de Ca^{2+} desde el RS, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, $n=10-14$ cardiomiocitos de 3 ratones por grupo.

Para corroborar estos resultados también se realizó la medida de SCaRE en cardiomiocitos aislados de ratones AC3I, que tienen un péptido inhibidor de CaMKII expresado a nivel del miocardio, utilizando como controles cardiomiocitos aislados de animales AC3C que expresan el péptido inhibidor inactivo. Como muestra la **Figura 7.3**, en los cardiomiocitos de animales AC3C tratados con DRF hay un aumento de SCaRE respecto de los AC3C tratados con DC, mientras en los AC3I tratados con DRF se evita la producción de SCaRE, por lo que las pérdidas de Ca^{2+} desde el RS son dependientes de CaMKII.

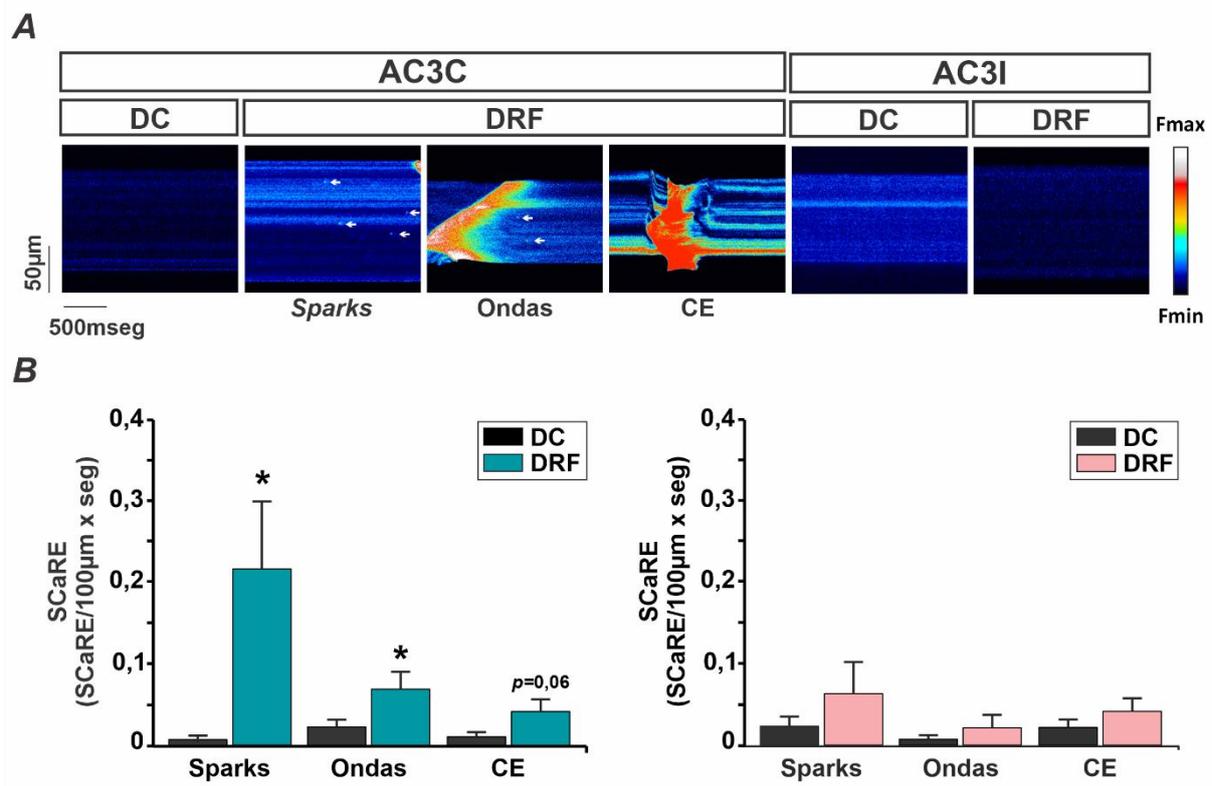


Figura 7.3. Los cardiomiocitos de ratones prediabéticos AC3I no presentan liberaciones espontáneas de Ca^{2+} .

A, Imágenes representativas de microscopía confocal en escaneo lineal de cardiomiocitos de ratones AC3C y AC3I, DC y DRF, donde se observan ejemplos de sparks señalizados con flechas blancas, ondas y contracciones espontáneas (CE). **B**, Frecuencia promedio de SCaRE cada 100µm x seg en cardiomiocitos de ratones AC3C, DC y DRF (izquierda) y AC3I DC y DRF (derecha). Como muestran los datos promedios, los animales AC3C DRF presentaron un aumento en los sparks y ondas de Ca^{2+} , junto con cambios no significativos en las CE, respecto de los AC3C DC, mientras que en los animales AC3I DRF no hay aumento de SCaRE respecto de los DC. Promedio \pm SEM, * $p < 0,05$, $n=10-13$ cardiomiocitos de 3 ratones por grupo. **SCaRE**: eventos espontáneos de liberación de Ca^{2+} por el RS, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa.

7.3.4. CaMKII es responsable de la mayor actividad de los RyR2 debido a la fosforilación en el sitio Ser²⁸¹⁴.

En las arritmias dependientes de CaMKII producidas en los corazones prediabéticos de rata, se describió la participación del RyR2 (Sommese et al., 2016). Para corroborar este aspecto en este trabajo, buscamos el mecanismo de activación de los RyR2. Para ello se midió la fosforilación del RyR2 en el modelo *in vitro* mediante **Western blot**, en los sitios de fosforilación de CaMKII y PKA. Como se observa en la **Figura 7.4.a**, en células HEK293 cultivadas en un medio de GA se presentó un aumento en la fosforilación del RyR2 en el sitio Ser²⁸¹⁴, el sitio consenso para CaMKII, mientras no hubo cambios en la fosforilación del RyR2 en el sitio Ser²⁸⁰⁸, el sitio en el que el RyR2 es fosforilado por PKA. A su vez, se observó una disminución de la fosforilación al utilizar el inhibidor de CaMKII, KN-93, mientras que no hubo cambios cuando se utilizó su análogo inactivo, KN-92.

Al realizar el ensayo de unión de [³H]Ry para medir la actividad máxima del canal (ver **Ensayos de unión de rianodina tritiada**), encontramos que en estas muestras se produjo un aumento de actividad máxima del RyR2 al utilizar GA en el medio de cultivo, que se previno cuando se expuso a las células junto con KN-93, sin cambios al usar KN-92 (**Figura 7.4.b**).

En el modelo *in vivo*, se utilizaron animales AC3I que, como se mencionó previamente, poseen un péptido inhibidor de CaMKII en todo el miocardio. Al evaluar la actividad del RyR2, los cambios no fueron significativos entre los corazones de animales DRF respecto los DC, confirmando el rol de CaMKII en la activación de RyR2 y en la cascada apoptótica que se produce en la prediabetes (**Figura 7.4.c**).

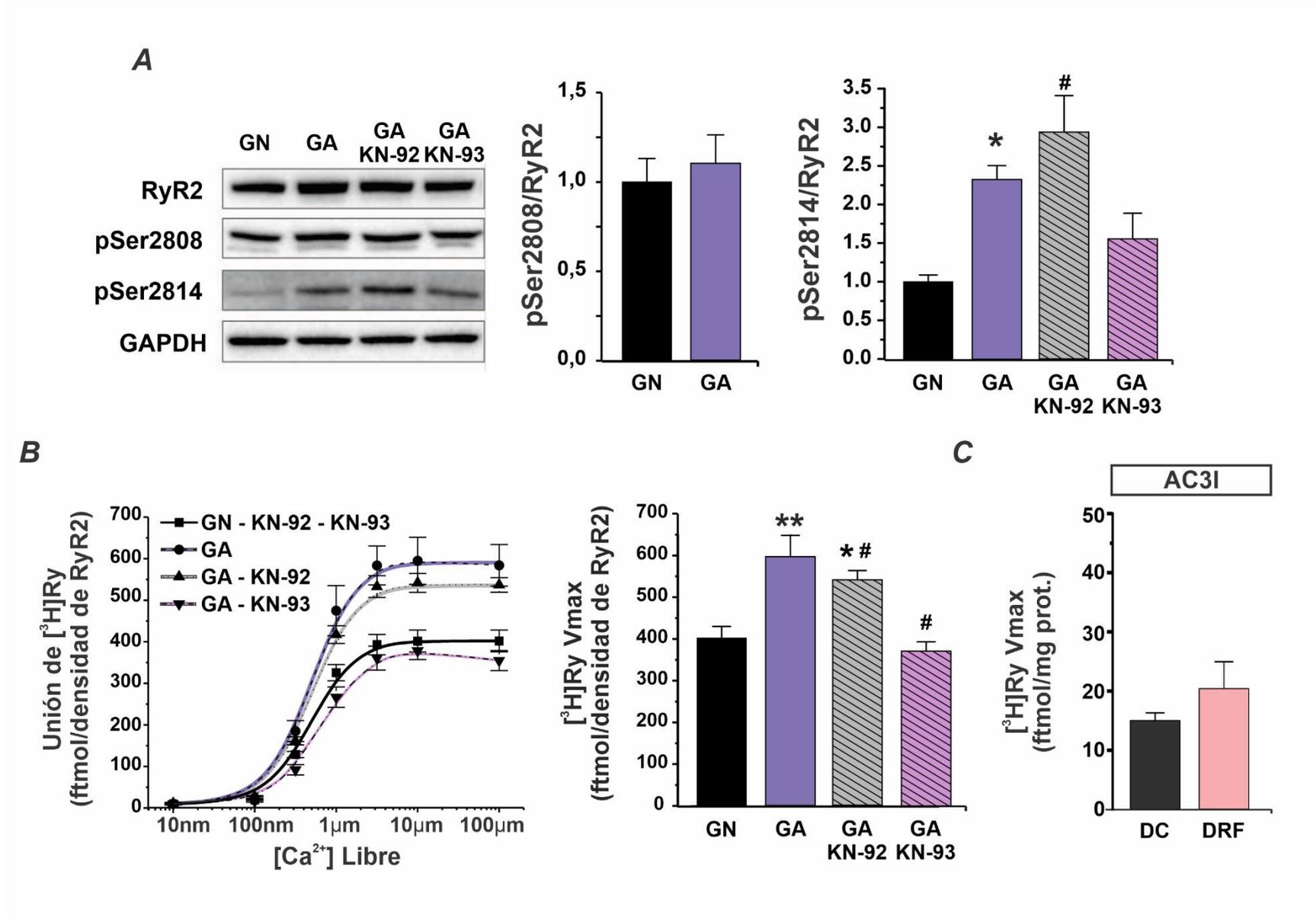


Figura 7.4. Aumento de la actividad máxima del RyR2 debido a la fosforilación en el sitio Ser2814 por CaMKII.

A, Inmunoblots representativos la expresión de RyR2 recombinante en células HEK293, y de sus sitios de fosforilación, Ser²⁸⁰⁸ (pSer2808, sitio consenso para PKA) y Ser²⁸¹⁴ (pSer2814, sitio consenso para CaMKII), y GAPDH como marcador de carga, en muestras representativas en las diferentes condiciones de cultivo de glucosa normal, glucosa alta, GA + KN-92 y GA + KN-93 (inhibidor de CaMKII). En los gráficos de barras se observan los resultados promedio de estos experimentos. La exposición a GA no cambia el estado de fosforilación del sitio Ser²⁸⁰⁸, pero aumenta la fosforilación del RyR2 en el sitio Ser²⁸¹⁴, la cual se evita con KN-93. **B**, Unión de [³H]Ry normalizada por la densidad de RyR2 en células HEK293 que expresan RyR2 recombinantes, expuestas a las condiciones mencionadas en A. Como en presencia de GN no se presentaron diferencias en la unión de [³H]Ry con respecto a GN + KN-93 o KN-92 los grupos de GN fueron agrupados (línea negra entera). La GA aumenta significativamente la unión de [³H]Ry, así como GA + KN-92. Sin embargo, GA + KN-93 previene por completo el aumento en la unión de [³H]Ry. En los gráficos de barras se observan los resultados promedio de la actividad máxima o Vmax. **C**, gráfico de Vmax promedio obtenido a partir de las curvas de unión a [³H]Ry realizadas con homogenatos de corazones de ratones AC3I, DC y DRF. No se observaron diferencias significativas en la Vmax con la DRF respecto de DC. **KN-93**: inhibidor farmacológico de CaMKII, **KN-92**: análogo inactivo de KN-93, **GA**: glucosa alta, **GN**: glucosa normal, [³H]Ry: rianodina tritiada. Promedio ± SEM, * p < 0,05, n = 5 por grupo.

7.3.5. CaMKII se encuentra involucrada en el ordenamiento del tejido cardiaco

Para evaluar si el desordenamiento tisular producido en la prediabetes que se observó por MET se prevenía en ausencia de la actividad de CaMKII, se realizaron experimentos de MET (para más información ver sección **Microscopia electrónica de transmisión**) en corazones fijados de animales AC3I, DC y DRF.

Las micrografías obtenidas demostraron que el tejido de corazones de ratones AC3I tratados con DRF parecen estar, al menos, parcialmente protegidos de esta interrupción. El desordenamiento ultraestructural que produce la DRF en los ratones AC3I, no es de la magnitud que se presentó en los ratones WT, ya que por ejemplo no se observaron los *clusters* de mitocondrias interrumpiendo las miofibrillas. Por otro lado, el número de vacuolas en los ratones AC3I DRF fue similar al observado en tejido de corazones de animales AC3I DC. Aunque no se exploró en profundidad el mecanismo por el cual ocurren estos disturbios, nuestros resultados sugieren que estos cambios son al menos en parte a causa de la actividad de CaMKII (**Figura 7.5**).

Error! Reference source not found.

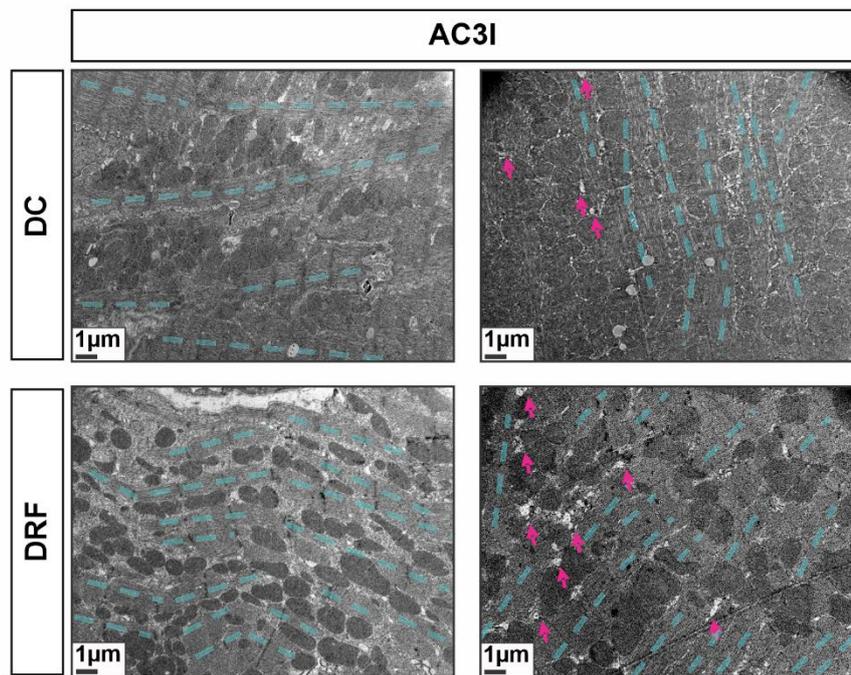


Figura 7.5. El desordenamiento producido por la prediabetes es prevenido en parte al inhibir a la enzima CaMKII.

Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (MET) de muestras de tejido cardíaco de animales AC3I, DC y DRF, en magnificación de 12000x. Las líneas punteadas celestes muestran la disposición de las miofibrillas rodeadas por las mitocondrias. Las flechas fucsias marcan las vacuolas en el tejido. La disposición de las miofibrillas está alineada con las mitocondrias en los tejidos de AC3I DC, y en los DRF si bien hay una leve desorganización, no se ven clusters o cúmulos mitocondriales. El número de vacuolas pareciera no mostrar diferencias claras en las muestras de AC3I DRF respecto de AC3I DC. $n = 3$. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa.

7.3.6. La disminución de distancia entre RS-mitocondria es dependiente de la actividad de CaMKII

Debido a que en los animales WT prediabéticos se generó una disminución en la distancia entre las organelas RS y mitocondrias, se evaluó este parámetro en corazones de ratones AC3I DC y DRF (para más información de cómo se realizó la medida de distancia entre organelas ver: **Microscopía electrónica de transmisión**). Al analizar las fotografías de los corazones de animales AC3I tratados con la DC y la DRF, encontramos que la distancia entre ambas organelas no difiere con la dieta, como se observa tanto en la fotografía representativa como en los valores promedios obtenidos (**Figura 7.6**).

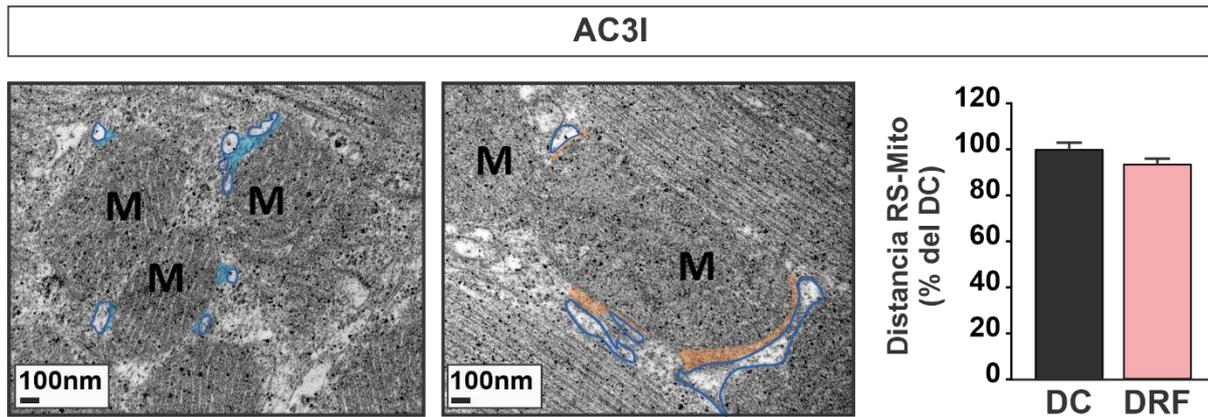


Figura 7.6. La inhibición de CaMKII previene la disminución de la distancia RS-mitocondria.

Fotografías representativas de MET de corazones de ratones AC3I DC y DRF. Estos animales no presentaron cambios en la distancia que separa el RS de la mitocondria (RS-Mito) con la dieta. Para una mejor apreciación, las mitocondrias fueron señalizadas con la letra "M", la membrana del RS fue esquelotonizada con una línea azul y la distancia RS-Mito se indicó en color celeste para AC3I DC y en rosa para AC3I DRF. **RS:** retículo sarcoplasmático, **DC:** dieta control, **DRF:** dieta rica en fructosa. Promedio \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, 166-170 medidas de 3 corazones por grupo.

7.3.7. CaMKII modula la expresión de proteínas que comunican el RS con las mitocondrias

Como se mencionó previamente, ciertas proteínas se ocupan, entre otras funciones, de mantener en contacto estrecho el RS/RE con la mitocondria para conservar una comunicación entre ambas organelas y mantener la homeostasis en el cardiomiocito (Csordás et al., 2018). Esta comunicación se encuentra mediada por distintas proteínas, entre ellas Grp75, Mfn2, y VDAC, las cuales se vieron incrementadas en ratones WT tratados con la DRF. Siguiendo la analogía de estudio hasta el momento, se investigó el rol de CaMKII sobre estas proteínas. Para esto se midió la expresión de las proteínas en homogenatos de corazón de ratones AC3I tratados con DC y DRF. En contraste con los resultados obtenidos en los ratones WT, los corazones de ratones AC3I tratados con DRF mostraron similar expresión a los corazones de ratones AC3I tratados con DC (**Figura 7.7**).

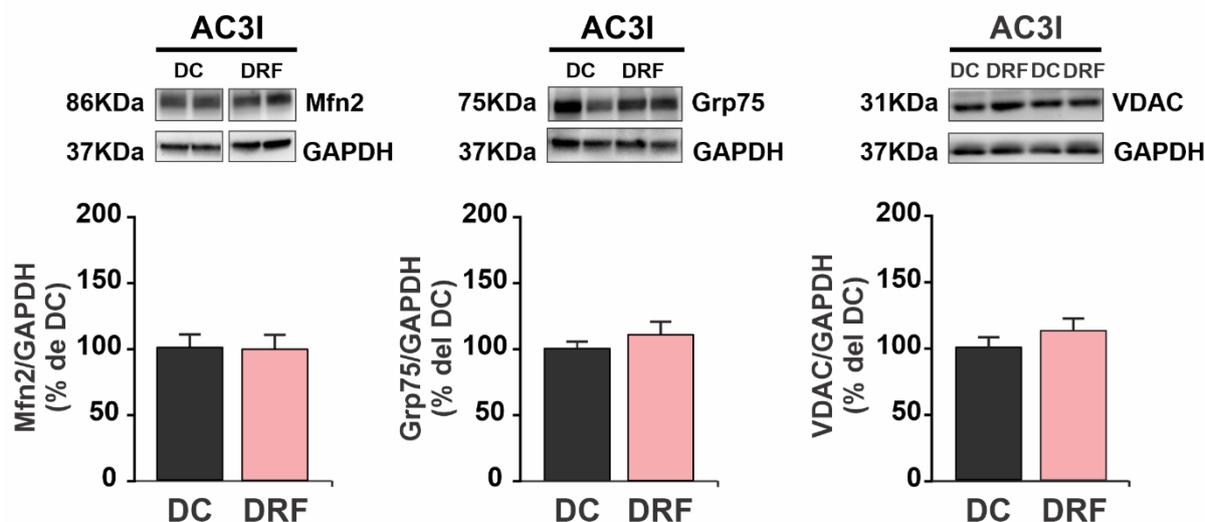


Figura 7.7. CaMKII afecta la expresión de proteínas que comunican el retículo sarcoplasmático con la mitocondria.

Immunoblots representativos y resultados promedio de la expresión de *Mfn2*, *Grp75*, y *VDAC* en corazones de ratones AC3I tratados con DC y DRF. No se encontraron cambios en la expresión de ninguna de las proteínas estudiadas entre los grupos. *Mfn2*: mitofusina 2, *Grp75*: proteína regulada por glucosa 75, *VDAC*: canal aniónico dependiente de voltaje, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, $n = 4 - 6$ por grupo.

7.3.8. CaMKII es responsable de las alteraciones mitocondriales producidas en el corazón prediabético

En ratones WT tratados con DRF, el Ca^{2+} que se pierde desde el RS se dirige a la mitocondria sobrecargándola y alterando su función y estructura. Para evaluar si CaMKII tiene un rol en estas alteraciones se examinaron mitocondrias aisladas de ratones AC3I (que poseen el péptido inhibidor de CaMKII en todo el miocardio) y S2814A (que poseen mutado el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 a alanina, lo que impide la fosforilación del RyR2 por CaMKII) tratados con DC y DRF. En las mitocondrias de estos ratones se midió el *swelling* mitocondrial y la CRC como se indica en **Determinación de swelling mitocondrial** y **Determinación de la capacidad de retención de calcio** en el **Capítulo 6**.

Como se muestra en la **Figura 7.8** en animales S2814A (**a**) y AC3I (**b**) los datos promedio no presentaron diferencias significativas en el *swelling* mitocondrial y la CRC, respectivamente, entre las mitocondrias de ratones tratados con la DRF respecto de DC. Estos resultados indican que la inhibición de la fosforilación del sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 por CaMKII, previene la sobrecarga de Ca^{2+} en las mitocondrias aisladas inducida por la DRF.

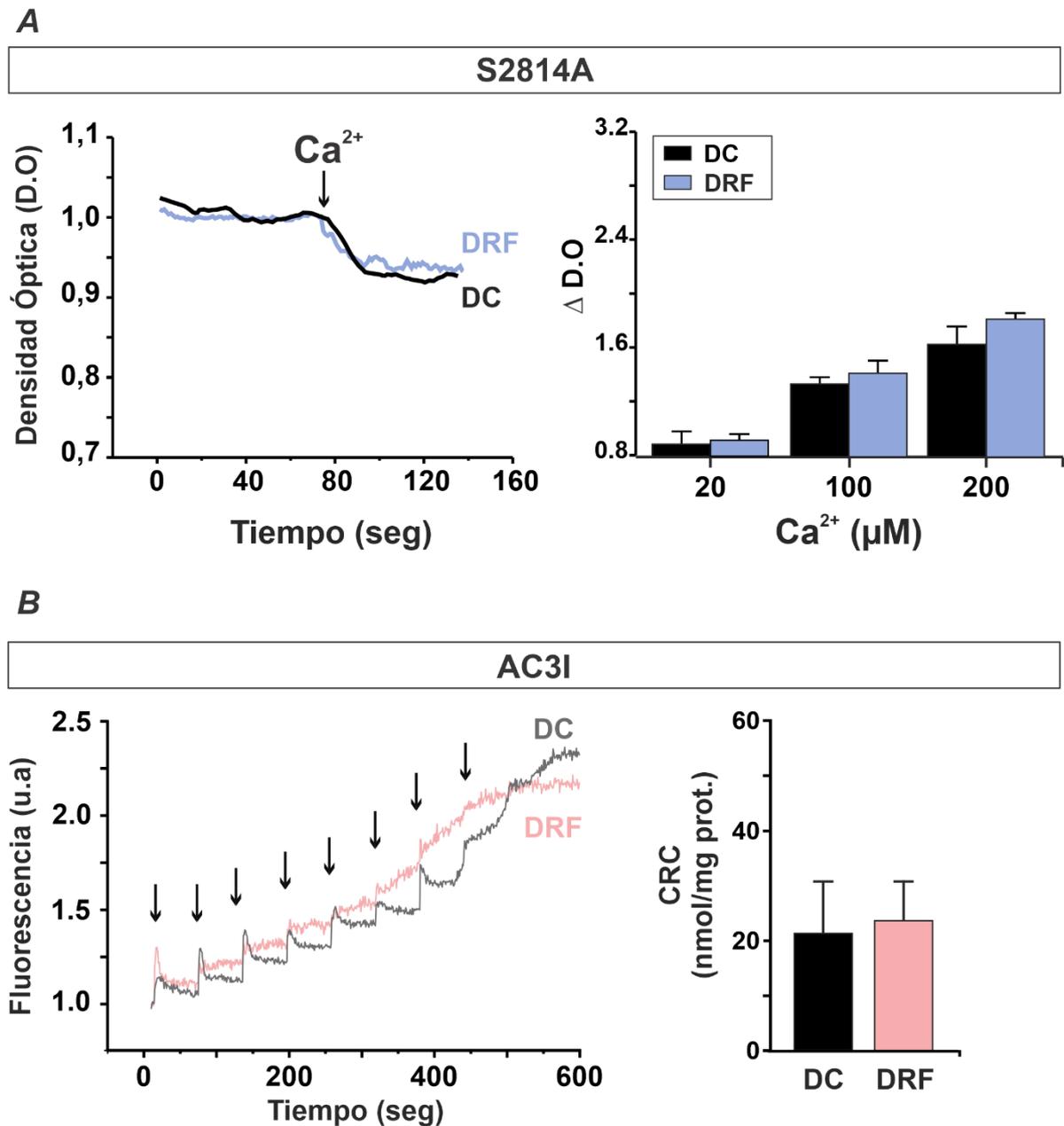


Figura 7.8. La prediabetes no afecta a las mitocondrias cuando se inhibe a la enzima CaMKII.

A, a la izquierda se observa experimento típico de la medida de swelling mitocondrial mediante la determinación de la densidad óptica (D.O) previo y posterior a un agregado de Ca^{2+} (20, 100 y 200 μ M) en ratones S2814A, que poseen el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2 mutado a alanina, por lo cual no puede ser fosforilado por CaMKII. Tanto las mitocondrias de ratones tratados con DRF como con DC mostraron igual variación de la dispersión de la luz a los distintos agregados de Ca^{2+} , como se grafica en las barras promedio. **B**, a la izquierda se observan experimentos representativos y a la derecha valores promedio de la capacidad de retención de Ca^{2+} en mitocondrias aisladas de corazones de ratones AC3I DC y DRF. No se observaron diferencias en la capacidad de retención de Ca^{2+} entre las mitocondrias de los corazones de ratones DRF respecto DC, indicando que la inhibición de CaMKII se previene la disminución en la capacidad de retención de Ca^{2+} inducida por la DRF. **CRC**: capacidad de retención de

Ca^{2+} , **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa, $\Delta D.O$: diferencia de densidad óptica previo y posterior al agregado de Ca^{2+} . * $p < 0,05$, $n=3-6$ por grupo.

El análisis de las fotografías de MET demostró que las mitocondrias de corazones prediabéticos de animales AC3I DRF no presentaron un aumento en la cantidad de espacios o *holes*, correspondiente con el *swelling* mitocondrial, ni la disrupción de su estructura y de las crestas mitocondriales que se encontraron y describieron en los animales WT DRF (**Figura 7.9**). La ausencia de estas alteraciones en las mitocondrias de animales AC3I tratados con DRF sugiere un rol deletéreo de la enzima CaMKII y la vía activada en estos corazones prediabéticos.

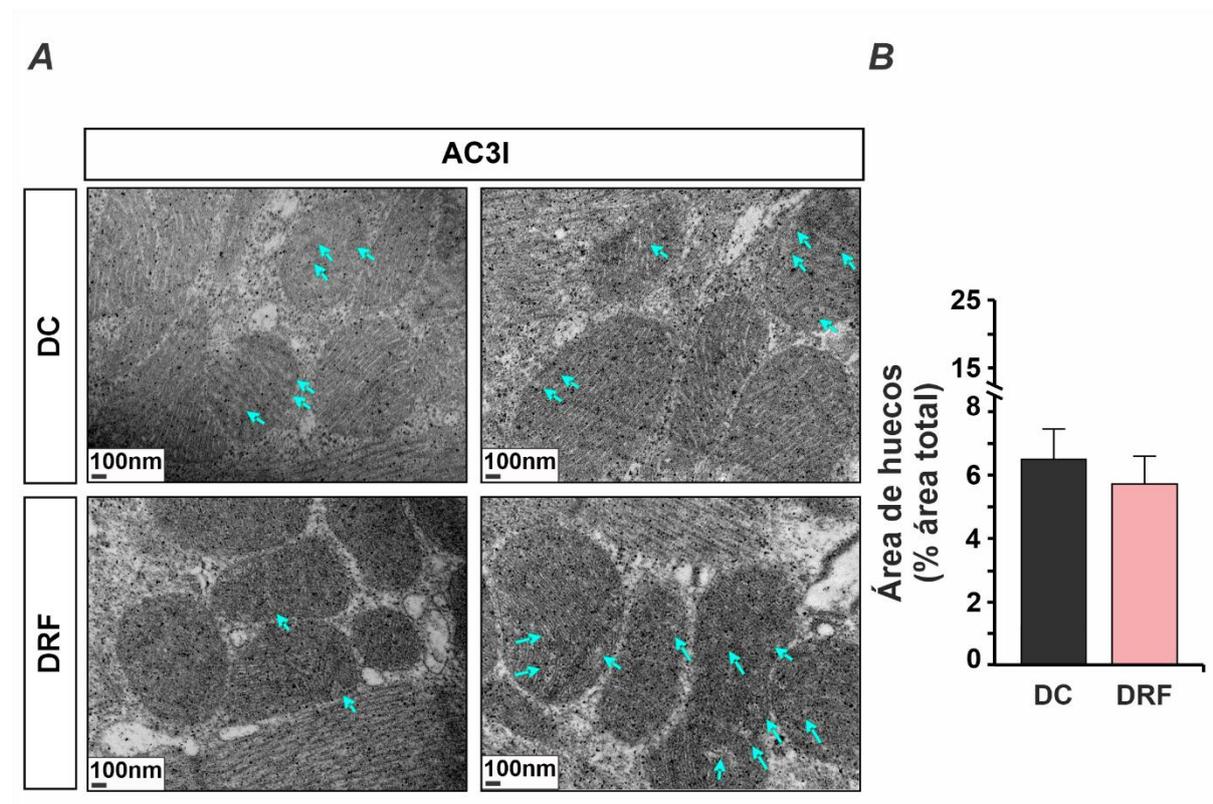


Figura 7.9. Los cambios en la disposición de las crestas mitocondriales y espacios en las mitocondrias generados por la prediabetes se previenen al inhibir CaMKII.

Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (MET) de muestras de tejido cardíaco de ratones AC3I DC y DRF, en magnificación de 80000x. Los hallazgos que se observaron en ratones WT DRF de holes mitocondriales no fueron diferentes en corazones de ratones AC3I DRF respecto de AC3I DC. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. $n = 3$ corazones.

Por otro lado, en los cardiomiocitos aislados de ratones WT DRF se observaron cambios en el metabolismo mitocondrial. Para ver como afectaba a estos parámetros la acción de CaMKII se midió el $\Delta\Psi$ con el indicador JC-1 (*ver sección 6.2.5.*) en cardiomiocitos aislados de ratones S2814A. Como se observa en la imagen representativa de la **Figura 7.10**, los cardiomiocitos

aislados de ratones S2814A DRF presentaron un aumento en la emisión de fluorescencia a $\lambda = 590$ nm (rojo, el indicador emite en esta longitud de onda cuando el $\Delta\Psi$ es cercano a -180 mV), y disminución de la intensidad de fluorescencia a $\lambda = 530$ nm (verde, el indicador emite en esta longitud de onda cuando el $\Delta\Psi$ se aleja de -180 mV) respecto de los cardiomiocitos de ratones WT DRF, similar a los cardiomiocitos de ratones WT DC. A su vez, al calcular la relación de emisión a 590 nm y 530 nm, se encontró que esta es mayor en los cardiomiocitos de ratones S2814A DRF respecto de los cardiomiocitos de ratones WT DRF, obteniéndose valores similares al de cardiomiocitos WT DC. Todos estos resultados en conjunto indican que en los cardiomiocitos de ratones S2814A tratados con la DRF se previno el cambio en el $\Delta\Psi$ como se aprecia en la **Figura 7.10.b**. Consecuentemente, los cambios observados en el $\Delta\Psi$ en cardiomiocitos de ratones WT DRF se deben a la fosforilación en el sitio Ser²⁸¹⁴ del RyR2.

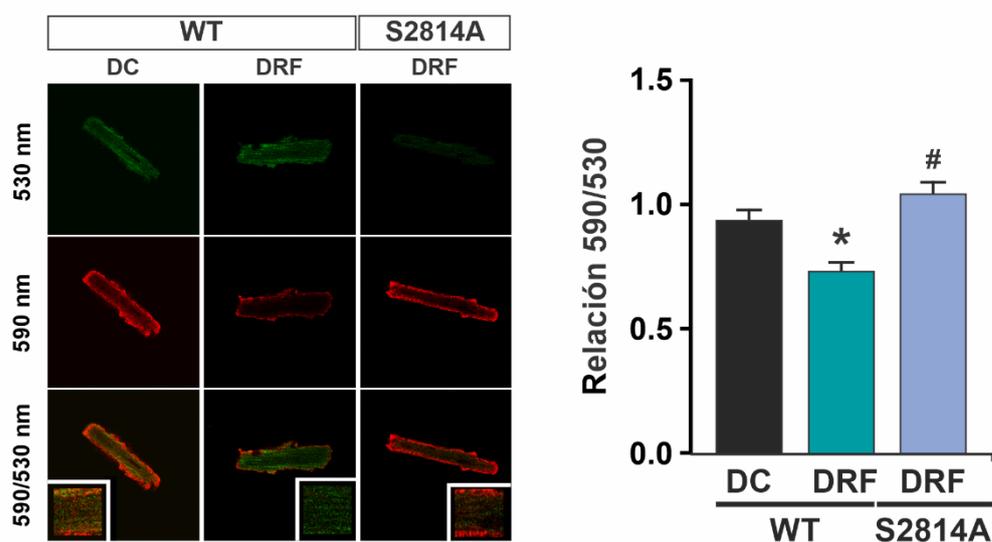


Figura 7.10. Al inhibir CaMKII se previenen los cambios de potencial de membrana mitocondrial.

Fotografías representativas de cardiomiocitos aislados de ratones WT DC y DRF, y en S2814A DRF, cargados con el indicador de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), JC-1. El indicador emite a $\lambda = 530$ nm (verde) y $\lambda = 590$ nm (rojo). La relación de intensidad de emisión de fluorescencia a 590 nm y 530 nm expresa que tan despolarizadas se encuentran las mitocondrias de los cardiomiocitos. En los resultados promedios, que se muestran en los gráficos de barra, se observa que la despolarización mitocondrial de ratones WT DRF es mayor que en los animales WT DC y S2814A DRF, ya que presentan una disminución en la relación 590/530 nm. **DC:** dieta control, **DRF:** dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, 16-27 cardiomiocitos de 3-5 animales por grupo.

Para evaluar la fisiología mitocondrial se determinó el consumo de O_2 , la producción de ATP, y H_2O_2 en mitocondrias aisladas de corazones de ratones AC3I DC y DRF (para conocer los protocolos utilizados ver: *Aislamiento de mitocondrias*, *Determinación del consumo de oxígeno mitocondrial*, *Determinación de la producción de ATP*, y *Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno*). Como se observa en la *Figura 7.11.a* y *b* en mitocondrias aisladas de corazones de ratones AC3I tratados con DRF no se presentaron diferencias en ninguno de los parámetros metabólicos mitocondriales medidos respecto de las mitocondrias aisladas de corazones de ratones AC3I tratados con DC.

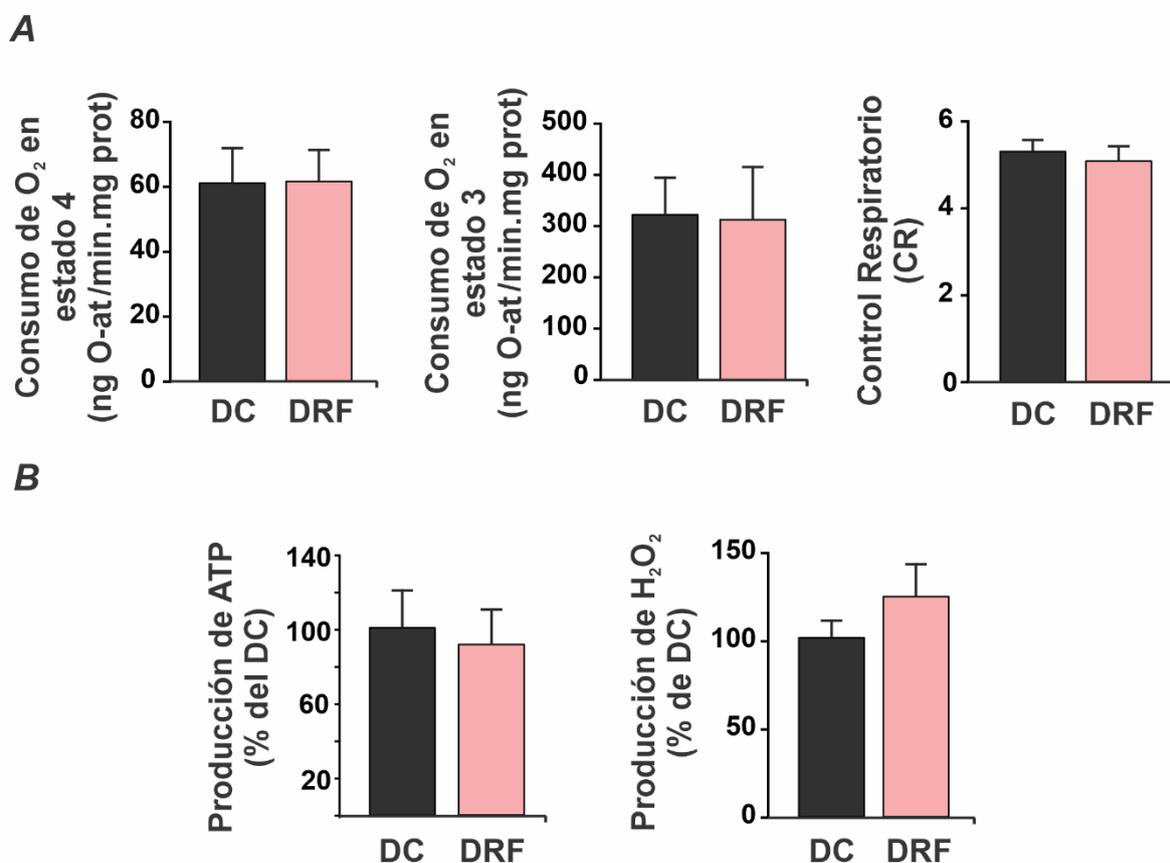


Figura 7.11. Los corazones prediabéticos de animales AC3I no mostraron cambios en el metabolismo mitocondrial.

Mitocondrias aisladas de corazones de ratones AC3I DC y DRF. **A**, promedio de la velocidad de consumo de O_2 en estado 4 (sin ADP extra), en estado 3 (con la adición de ADP), y la relación de control respiratorio (CR). El CR fue calculado como la velocidad de consumo de O_2 en estado 3/estado 4. **B**, promedio de las velocidades de producción de ATP y de H_2O_2 , expresadas en % del grupo DC. No se observaron diferencias en ninguno de los parámetros medidos en las mitocondrias de corazones AC3I DRF respecto del grupo DC. **CR**: control respiratorio, **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$, $n = 5$ corazones por grupo.

7.3.9. La inhibición de CaMKII previene los cambios morfológicos mitocondriales y los procesos de fisión

La prediabetes generó cambios a nivel morfológico en las mitocondrias de corazones de ratones WT, por lo que mediante MET se estudió también qué ocurría en las mitocondrias de corazones de ratones AC3I DC y DRF, donde la enzima CaMKII está genéticamente inhibida a nivel cardiaco. Ninguno de estos cambios fue observado en las mitocondrias aisladas de los corazones de animales AC3I DRF respecto de las mitocondrias aisladas de corazones de ratones AC3I DC (*Figura 7.12*). En conjunto estos resultados muestran una dependencia de los cambios morfológicos con la activación de CaMKII y, probablemente, de los cambios provocados por CaMKII sobre el Ca²⁺.

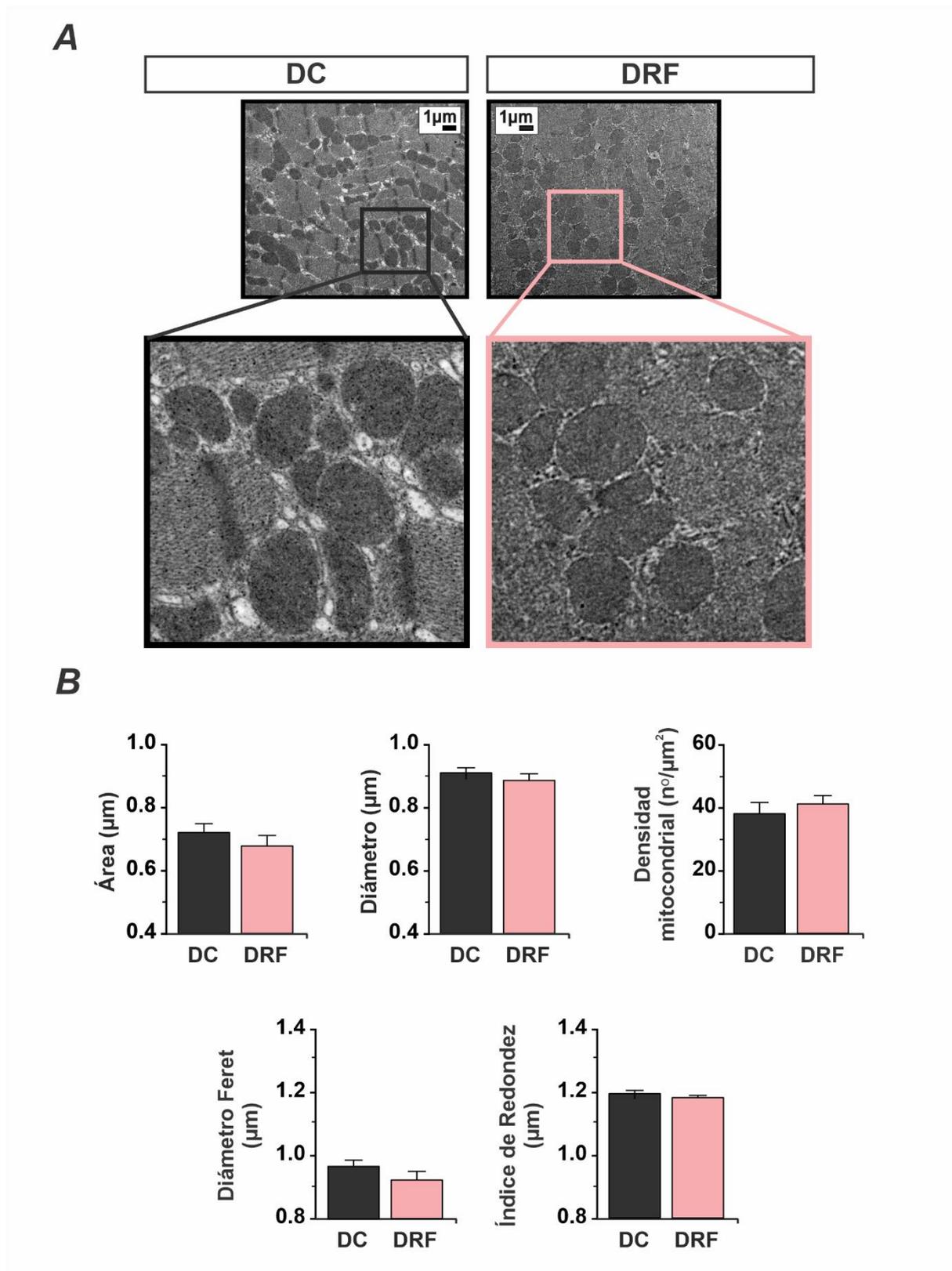


Figura 7.12. Las mitocondrias de corazones de animales AC3I prediabéticos no presentan modificaciones en la morfología y densidad mitocondrial.

A, Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) de tejido cardíaco AC3I DC y DRF, donde los recuadros, negro para DC y rosa para DRF, muestran una ampliación

realizada en la zona del tejido para apreciar mejor la morfología mitocondrial. **B**, datos promedio \pm SEM en los gráficos de barras, de parámetros de morfología mitocondrial (Índice de Redondez, Diámetro Feret, Área, y Diámetro) y densidad mitocondrial (número de mitocondrias/unidad de área). Los corazones de animales AC3I DRF presentaron parámetros morfológicos y de tamaño similares, además de no mostrar cambios en la densidad respecto de los animales AC3I DC. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. * $p < 0,05$. Número de mitocondrias analizadas 147 – 287 de 3 corazones por cada tratamiento.

También se analizaron las proteínas de fisión y fusión mencionadas previamente para evaluar si alguno de estos procesos se encontraba favorecido en los corazones de ratones AC3I DC y DRF, como fue el proceso de fisión en los ratones WT DRF. Como se observa en la **Figura 7.13**, no se encontraron cambios en la expresión de Drp1 y Opa1 en los corazones DRF respecto de DC, lo que indica que ambos procesos se encuentran en equilibrio en estos animales.

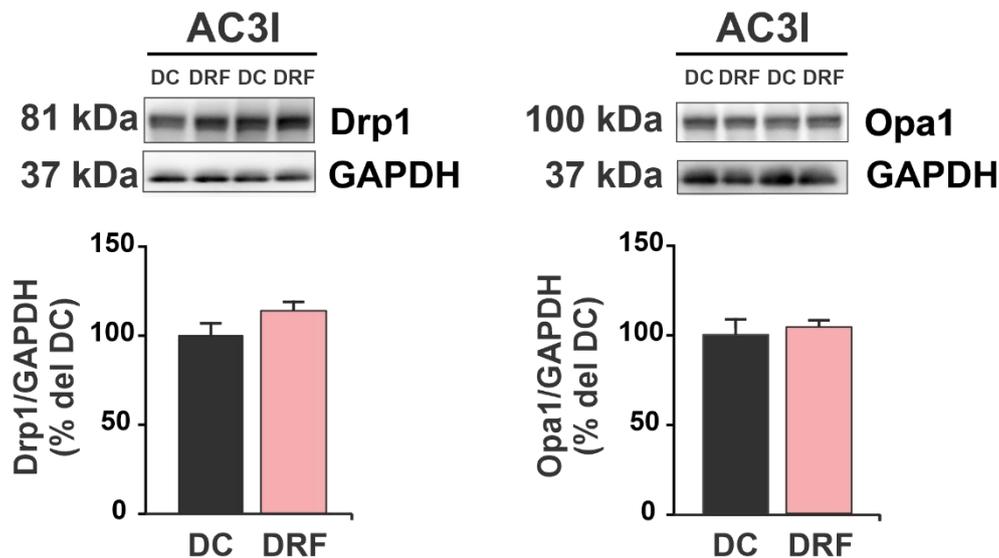


Figura 7.13. El aumento en la expresión de proteínas de fisión mitocondrial inducido por la prediabetes se previene en los ratones AC3I.

Inmunoblots representativos de la expresión Drp1 y Opa1, proteínas de fisión y fusión, respectivamente, y valores promedio en los gráficos de barras. Los homogenatos de corazones de ratones AC3I DRF no mostraron diferencias en la expresión de Drp1 y Opa1 con respecto a homogenatos de corazón de ratones AC3I DC. **DC**: dieta control, **DRF**: dieta rica en fructosa. Promedio \pm SEM, * $p < 0,05$, $n = 6$ corazones por grupo.

7.4. Conclusión y discusión

La enzima CaMKII fue estudiada debido a que se encuentra involucrada en diversas patologías cardíacas que tienen alteraciones en el manejo de Ca^{2+} (Greenstein et al., 2014; McCauley & Wehrens, 2011; Willeford et al., 2018; W.-Z. Zhu et al., 2003). Además, y específicamente, en el modelo usado en este trabajo, se encontró que la DRF inducía arritmias dependientes de la actividad de CaMKII (Sommese et al., 2016).

De los resultados obtenidos se desprende que al inhibir la acción de CaMKII, tanto farmacológica como genéticamente, se previene la muerte celular y las pérdidas de Ca^{2+} desde el RS. Por otro lado, al utilizar Tempol en el agua de bebida, se previene el aumento de peroxidación lipídica y estrés oxidativo, lo que también previene la apoptosis. Para evaluar cual era el primer eslabón de la cascada apoptótica se realizaron experimentos utilizando la inhibición genética de CaMKII junto con el tratamiento de Tempol y se observó que al inhibir CaMKII si bien se produjo un aumento de estrés oxidativo, no hubo aumento de los núcleos apoptóticos. Esto indica que en primer lugar ocurre el aumento de estrés oxidativo que es el encargado de activar a CaMKII, y posteriormente se producen los eventos que conllevan a la apoptosis.

Una vez que CaMKII se encuentra activa, puede autofosforilarse para mantener de forma autónoma su actividad, y este hecho también se observó en un modelo de ratas prediabéticas como demostró Sommese *et. al* (Sommese et al., 2016). Los resultados de unión de [^3H]Ry demostraron que los RyR2 se encontraron hiperactivos, por fosforilación en el sitio Ser^{2814} , ya que al inhibir a CaMKII, con KN-93 en las células HEK293 o utilizando los animales transgénicos AC3I, se previno el aumento en la activación del RyR2.

Se ha demostrado que las pérdidas de Ca^{2+} desde el RS pueden producirse por un aumento en el contenido de Ca^{2+} en el RS, por un aumento en la actividad de los RyR2, o por ambos fenómenos (Bers, 2014). Como se discutió en el **Capítulo 4**, los cardiomiocitos de ratones prediabéticos no presentaron cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS estimada a través del pulso de cafeína. Es decir que las pérdidas de Ca^{2+} del RS son debidas a la hiperactividad del RyR2, que a su vez depende de la acción de CaMKII. Esto se confirma al analizar el resultado de las SCaRE o pérdidas espontáneas de Ca^{2+} medidas en los ratones AC3I prediabéticos, en donde no se encontró aumentado el número de *sparks*, ondas o CE como si ocurrió en los ratones WT prediabéticos.

Las pérdidas de Ca^{2+} del RS pueden generar distintos eventos, entre los cuales se encuentran las arritmias y cambios en la actividad de distintos transportadores como el NCX (Hove-Madsen Leif et al., 2004; Sipido, 2006), pero también se ha visto que este Ca^{2+} puede dirigirse a las mitocondrias (Andrienko et al., 2009; Yan et al., 2008). La mitocondria necesita del Ca^{2+} para mantener el funcionamiento del ciclo de TCA y cierto transporte (~1%) del Ca^{2+} sistólico es retomado por la organela, contribuyendo con la relajación y al retorno a niveles diastólicos de Ca^{2+} . En nuestros resultados se observa que al inhibir las pérdidas de Ca^{2+} , inhibiendo la acción de CaMKII en los ratones transgénicos, se evita el daño mitocondrial observado en los ratones WT prediabéticos. Esto a su vez se corresponde con la prevención en el acercamiento entre el RS y mitocondria que podría favorecer y colaborar con el tráfico de Ca^{2+} entre organelas.

Debido a que los cambios metabólicos se ven asociados a cambios en la morfología mitocondrial en los ratones WT prediabéticos, se buscaron estos cambios en las mitocondrias de los ratones AC3I prediabéticos, no observándose diferencias respecto de los AC3I tratados con la DC. Es decir que al no sobrecargarse de Ca^{2+} , las mitocondrias pueden mantener una morfología y metabolismo normal.

Estos experimentos en conjunto demuestran que la enzima es uno de los principales factores que desencadenan los efectos deletéreos en el corazón prediabético que conllevan a la apoptosis cardíaca.

Capítulo 8. DISCUSIÓN INTEGRAL

8.1. Relevancia de la DM y prediabetes en Argentina

La prevalencia de la DMT2 en la Argentina y el mundo entero ha ido incrementando con los años (American Diabetes Association, 2019; Saeedi et al., 2019). Según la OMS la prevalencia de DMT2 en 2016 en Argentina fue de 10.2%, mientras que no se conoce la prevalencia de prediabetes debido a que no hay un diagnóstico específico para esta condición (Organización Mundial de la Salud, 2016). La DMT2 es una enfermedad multiorgánica, muchas veces silenciosa por varios años, y es precedida por un estadio en donde se presenta GAA (glucemia en ayunas alterada) o una TGA (tolerancia a la glucosa alterada o prediabetes), que puede ir acompañada o no por otros factores de riesgo cardiaco. A su vez, la prediabetes también puede establecerse de forma silenciosa, incluso en personas jóvenes. En estos estadios tempranos de diabetes, los pacientes pueden presentar alteraciones en el organismo, sin conocer de su condición. La falta de diagnóstico, seguimiento y comportamiento médico establecido en nuestro país agrava la situación y las posibilidades de desarrollo de DMT2.

Por otro lado, el desarrollo de la DMT2 presenta un impacto socioeconómico en el país. Hay evidencias que demuestran que, los costos de atención de las personas con DM aumentan con el desarrollo de la enfermedad y la progresión de sus complicaciones crónicas. Las enfermedades cardiovasculares son la causa más importante de hospitalización en estos pacientes, siendo esta última el principal componente del alto costo. Además, la DM afecta en gran medida al sector etario productivo de la población, lo que también produce un impacto socioeconómico en nuestro país.

En este contexto, es fundamental conocer los disturbios y alteraciones que la prediabetes produce en el organismo para poder abordar mejor un correcto tratamiento, ya sea con dieta y

ejercicio, o con abordajes farmacológicos de ser necesario, para evitar la progresión a DMT2, que coexiste con un estado de resistencia a la insulina, y un mayor riesgo de morbilidad cardiovascular y mortalidad.

Aunque las alteraciones fisiopatológicas cardíacas están relativamente bien caracterizadas en la DM manifiesta, respecto a la CMD, la información en la prediabetes es limitada. La disfunción cardíaca en la CMD se ha atribuido a numerosas causas y diferentes vías de señalización, como por ejemplo; aumento del estrés oxidativo o activación de la muerte celular por apoptosis (Cai & Kang, 2003; Z. V. Varga et al., 2015), función mitocondrial alterada (Chong et al., 2017), autofagia (Z. V. Varga et al., 2015), y desbalance de la homeostasis del Ca^{2+} (Sorrentino et al., 2016). Aunque se ha observado que el estado prediabético induce una disfunción diastólica leve, las consecuencias cardíacas de la prediabetes y sus mecanismos moleculares no han sido completamente estudiados aún. En este trabajo se demostró que el estrés oxidativo que se produce en la DMT2 tiene su comienzo mucho antes de que el corazón presente una insuficiencia cardíaca irreversible, en estadios tempranos, donde aún puede corregirse.

Por otro lado, los efectos de la CMD en cuanto a los sustratos metabólicos impactan directamente sobre la función mitocondrial. En nuestro modelo, encontramos alteraciones mitocondriales que todavía presentan características leves, mayormente dependientes de las alteraciones en el manejo del Ca^{2+} , que pueden utilizarse como blanco terapéutico. Particularmente, los efectos producidos por la prediabetes en el corazón son inicialmente dados por un aumento en el estrés oxidativo que activa a CaMKII, y estos componentes podrían inhibirse para mejorar la función cardíaca como ocurre en los animales transgénicos.

Finalmente, en conjunto se demostró en este trabajo que durante los estadios tempranos o previos a la DM se desarrollan ciertas alteraciones a nivel cardiovascular, por lo que sería muy útil realizar una prueba de *screening* o mapeo del estadio de prediabetes en personas asintomáticas, pero con alteraciones cardíacas, o pruebas de función cardíaca en los individuos diagnosticados con prediabetes, para considerar correctamente el riesgo de estos pacientes y mejorar el abordaje médico en ambas situaciones.

8.2. La dieta rica en fructosa como modelo de prediabetes

El modelo de prediabetes que fue utilizado en el presente estudio, ya ha sido validado por trabajos previos en el laboratorio (Sommese et al., 2016) y por otros grupos de investigadores

(Felice et al., 2014; Francini et al., 2010). Si bien el período de tratamiento para lograr este modelo es extremadamente corto (21 días), los resultados presentados parecen ocurrir muy temprano en el desarrollo de la enfermedad. Estos hechos implican que las vías que se desencadenan en la CMD comienzan de forma insidiosa con el manejo alterado de la glucosa, enfatizando la emergencia en la necesidad de pruebas rutinarias de prediabetes en la población. Como se discutió en el **Capítulo 2**, existen diferentes modelos para el estudio de la DM; tanto dietéticos, como las dietas ricas en grasas (Fang et al., 2018; X.-X. Guo et al., 2018); farmacológicos como la STZ (Deshwal et al., 2018) para inducir DMT1; o transgénicos que reproducen una mutación de algún gen en particular que desarrolla DMT2, como el de la leptina (*ob/ob*, *db/db*) (Dubuc, 1976; Hummel et al., 1966; Ingalls et al., 1950b). Para elegir el modelo de estudio hay que tener muy presente los objetivos planteados para comprobar la hipótesis. Los modelos transgénicos tienen la ventaja de ser rápidos y contar con efectos marcados dependiendo de la mutación que se genere, pero cargan con la desventaja de ser más costosos, y se alejan de la fisiología que presentan los controles no transgénicos. En el caso de las dietas utilizadas, tienen la ventaja de ser menos costosas y con efectos cercanos a la fisiopatología humana, pero toman más tiempo y usualmente presentan mayor variabilidad. En nuestro caso, la investigación está basada en estudiar las alteraciones previas al desarrollo de DMT2, por lo que la destrucción de las células β del páncreas con STZ como modelo fue descartado, ya que es representativo de un modelo de DMT1, al igual que los transgénicos *ob/ob* y *db/db*, que desarrollan rápidamente la CMD que coexiste con otras comorbilidades que podrían influir en la interpretación de los resultados, como obesidad e hipertensión y la falta de leptina a nivel cardíaco. Los modelos más acordes fueron los que implicaban un cambio de dieta, y si bien el modelo de HFD es sumamente interesante, y podría ser muy útil para continuar los estudios realizados, en este modelo también se presenta la CMD con obesidad y otras comorbilidades, por lo que no se adecua a buscar específicamente las alteraciones producidas por la TGA. Los resultados en nuestro modelo de DRF se ajusta con el perfil de prediabetes, definido por un estado de TGA observado en el humano, y presentó alteraciones silenciosas, con activación de vías moleculares que afectan al corazón y su función, que deben ser detenidas a tiempo para evitar la progresión a una etapa más avanzada de la enfermedad. Por otro lado, es importante resaltar, que en este trabajo en particular se estudió el efecto del desorden glucémico de la prediabetes sobre el corazón. No obstante, sería sumamente interesante investigar si, así como el corazón es vulnerable tan tempranamente en el desarrollo de la enfermedad, otros tejidos

blanco de la DM como la retina, el riñón y la circulación periférica, presentan cambios silentes en este estadio.

8.3. Apoptosis en el corazón prediabético

En este trabajo de tesis se demostró que se produce muerte celular en el corazón prediabético, por un aumento de la apoptosis celular. La apoptosis cardiaca es una de las alteraciones que se producen en la CMD principalmente debida al estrés generado en el corazón, que conllevará a falla cardiaca.

La apoptosis en el corazón ha sido estudiada en modelos de DMT1 (con una dosis de STZ) (Shirpoor et al., 2009), en estadios tempranos de DMT1 (utilizando una baja dosis de STZ por corto tiempo) (Ghosh et al., 2005), y en pacientes diabéticos (Frustaci Andrea et al., 2000). En estos estudios se describen parte de las posibles cascadas apoptóticas que se encuentran asociadas a la mayor producción de ROS. Sin embargo, no hay estudios en el corazón que establezcan la cascada apoptótica en estadios previos al desarrollo de DM. Los experimentos llevados a cabo durante este trabajo de tesis demostraron la presencia de apoptosis en un modelo de prediabetes de ratones tratados con la DRF. La muerte celular por apoptosis se asoció con un aumento en la producción de ROS que activa CaMKII, con el subsiguiente daño mitocondrial y celular (*Ilustración 8.1 pasos 1 y 2*).

La apoptosis de los cardiomiocitos precede al aumento de colágeno que se acumula en el miocardio en la CMD, es decir que la apoptosis forma parte del comienzo de la fibrosis que se observa en la patogénesis de la DM. Este hecho fue confirmado en este trabajo, ya que la presencia de apoptosis se observó sin fibrosis, indicando que, en el modelo de prediabetes, el miocardio se encuentra aun en un momento reversible de la enfermedad.

Tradicionalmente se ha definido a la apoptosis como la muerte celular programada, y a la necrosis como la muerte celular no programada. Esto se debía a que en la muerte por necrosis se produce la pérdida de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al espacio extracelular generando una respuesta inflamatoria, mientras en la apoptosis con la formación de los cuerpos apoptóticos, la inflamación se evitaba (Nikoletopoulou et al., 2013). Posteriormente se describió un tipo de muerte celular “intermedio”, llamado necroptosis, definida como la muerte por necrosis programada, que es activada por receptores de muerte o por patrones de reconocimiento de patógenos (Nikoletopoulou et al., 2013). En corazones humanos de pacientes diabéticos se ha demostrado un aumento tanto en la apoptosis como en

la necrosis, siendo esta última asociada a procesos inflamatorios (Frustaci Andrea et al., 2000; Guerra Sabrina et al., 1999). En nuestro modelo de prediabetes, no se ha estudiado específicamente el componente inflamatorio en el miocardio y no se buscaron marcadores de muerte por necrosis, por lo que no puede ser descartada. Una de las futuras investigaciones de este trabajo podría ser continuar con el estudio de las cascadas de necrosis e inflamación.

La autofagia, se define como un proceso de reciclaje de componentes intracelulares, pero si se activa de forma excesiva también puede llevar a la muerte celular (C. He & Klionsky, 2009; Nikolettou et al., 2013). Tanto la apoptosis como la autofagia se activan en respuesta al estrés metabólico, y se ha descrito que el conector entre ambas vías es la proteína Beclin-1. Bcl-2 puede unirse a Beclin-1 inhibiendo su acción en la cadena de autofagia y favoreciendo el desarrollo de apoptosis (Pattingre et al., 2005). Estudiar la autofagia escapa a los objetivos planteados en este trabajo, ya que el propósito fue describir y evaluar la producción de muerte por apoptosis. Sin embargo, debido a los cambios observados en las mitocondrias por la microscopia electrónica, y los procesos de fisión descritos, sería interesante evaluar la proteína Beclin-1 y los demás pasos de la autofagia para evidenciar si ocurre en el corazón prediabético.

8.4. Manejo de calcio en el corazón prediabético, un mediador de muerte celular

El manejo inadecuado del Ca^{2+} es responsable de varias enfermedades que tienen lugar a diferente nivel en los tejidos a lo largo del cuerpo. En el corazón es particularmente indispensable porque es necesario en cada latido para producir la contracción muscular.

Al investigar el manejo de Ca^{2+} citosólico en el modelo de prediabetes, se encontraron alteraciones que indican una mayor recaptación de Ca^{2+} , tanto en el transitorio generado por el estímulo eléctrico como en la liberación de Ca^{2+} total estimulado por un pulso de cafeína. Esto demuestra una mayor actividad de SERCA2a. Este aumento de la actividad de la SERCA2a es contradictorio con la disfunción diastólica descrita en estadios tempranos de la CMD. Sin embargo, la disfunción diastólica de la CMD se ha visto asociada a disminución de la expresión de la SERCA2a y a un aumento de la fosforilación de PLN (H. W. Kim et al., 2001). En un trabajo previo del laboratorio (Sommese et al., 2016), en el modelo de prediabetes se estudiaron estas proteínas y no se encontraron cambios en la expresión de ninguna de ellas, aunque no se

evaluó la fosforilación de PLN. Este aumento en la actividad de la SERCA2a, sin alteración en su expresión, pueden ser previos a la disfunción diastólica descripta para la CMD. Estudios en el tiempo son necesarios para confirmar esta especulación.

Como se demostró en los resultados, los cardiomiocitos presentaron un mayor acortamiento celular, que puede deberse a cambios en la sensibilidad al Ca^{2+} . El aumento en la retoma de Ca^{2+} , sumado al aumento en el FR (fracción de liberación de Ca^{2+} respecto al contenido total del RS), aumenta el ciclado de Ca^{2+} , pudiendo influenciar a las proteínas contráctiles. Cabe recordar, que la mediante ecocardiografía el corazón se vio hipertrofiado y con función disminuida, por lo que uno esperaría encontrarse con una disminución en el acortamiento celular. Sin embargo, esto no fue así, lo que se correlaciona con la posibilidad de que la pérdida de función cardíaca entero se deba a la pérdida de cardiomiocitos por apoptosis.

Cuando se incrementa la retoma de Ca^{2+} hacia el RS, es esperable que aumente el contenido del RS, sin embargo, esto no sucedió. Un aumento en la retoma sin cambios en el contenido introduce la posibilidad de que se produzcan pérdidas de Ca^{2+} del RS. Efectivamente se observó que los RyR2 se encontraban hiperactivos, perdiendo Ca^{2+} como *sparks* y ondas, en un proceso dependiente de CaMKII (ver **Ilustración 8.1 pasos 3 y 4**). Debido a que las pérdidas de Ca^{2+} se han relacionado con el desarrollo de arritmias, se buscó el mecanismo por el cual pudieran estar colaborando con la producción de apoptosis cardíaca. Como en la apoptosis se encuentra involucrada la mitocondria, investigamos la relación entre el RS y la mitocondria, la función mitocondrial y el desarrollo en la apoptosis, como se discutirá en breve.

Por otro lado, el Ca^{2+} puede activar diversas enzimas en los cardiomiocitos; entre las más importantes se encuentran CaMKII, PKA y Calcineurina. Estas enzimas tienen varios blancos proteicos en el corazón que pueden activar diferentes cascadas de señalización generando efectos deletéreos. CaMKII ya ha sido relacionada con el aumento de la muerte celular en un modelo de isquemia y reperfusión (Di Carlo et al., 2014). En este trabajo se demostró que se encuentra activa por un aumento en los ROS, formando ambos, parte de la cascada de señalización apoptótica, ya que cuando se utilizaron estrategias para inhibir a la enzima (como los ratones transgénicos) o inhibir el aumento de ROS (con Tempol), la apoptosis se previno. PKA ha sido relacionada con eventos deletéreos en el corazón como en falla cardíaca (X. H. T. Wehrens et al., 2006), o en presencia de cardiomiopatía dilatada (Antos et al., 2001), entre otras. Si bien no se ha estudiado en detalle en este trabajo la activación de esta enzima y sus posibles efectos, no se encontró un aumento en la fosforilación del RyR2 en el sitio blanco de

PKA, por lo que no pudimos relacionar su rol con los fenómenos producidos en los cardiomiocitos prediabéticos. Calcineurina es una proteína que, como CaMKII y PKA, puede fosforilar variadas proteínas en el corazón al ser activada por Ca^{2+} , entre las que se encuentra Drp1. Cuando Drp1 es fosforilada por Calcineurina puede translocarse a la mitocondria produciendo fisión mitocondrial (Ciocci Pardo et al., 2019). En este trabajo no se llegó a estudiar la fosforilación de Drp1 y la actividad de Calcineurina, sin embargo, sería interesante evaluar, si este es el motivo del aumento en la fisión mitocondrial encontrada.

Estos resultados dejan en claro que el Ca^{2+} y la actividad del RyR2 se ven alteradas en el corazón prediabético, favoreciendo el mal funcionamiento de otras organelas fundamentales como las mitocondrias, siendo esto el primer paso hacia la muerte celular.

8.5. Relación RS-mitocondrias y el rol mitocondrial en la patogénesis del corazón prediabético

Como se describió en el *Capítulo 6*, el Ca^{2+} liberado espontáneamente desde el RS parece dirigirse hacia las mitocondrias, afectando el funcionamiento mitocondrial. En estudios realizados para evaluar la comunicación entre estas organelas se encontró que es necesaria para el funcionamiento fisiológico de las mismas y protege ante la patogénesis producida en ciertas enfermedades, por ejemplo, por evitar la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial (Paillard et al., 2013; Seidlmayer et al., 2019). Sin embargo, se ha descrito que en la DM se produce un aumento en la distancia entre RS-mitocondria, lo cual es tomado como un evento desfavorable para las mitocondrias que necesitan Ca^{2+} para su normal funcionamiento (Dia et al., 2020). Es posible que, en el comienzo de la enfermedad, como en la prediabetes, ocurra un acercamiento entre organelas, que permita una mayor comunicación, y que esto genere efectos nocivos para las mitocondrias, que eventualmente promueve una separación posterior durante estadios tardíos de la enfermedad.

La comunicación RS-mitocondria está mediada por diferentes proteínas como Mfn1 y 2, Grp75, VDAC, entre otras, que se han descrito localizadas en los microdominios o MAMs, formando complejos proteicos que relacionan ambas organelas (Csordás et al., 2018; de Brito & Scorrano, 2008). El acoplamiento entre proteínas como RyR2 y VDAC son de vital importancia para el transporte de Ca^{2+} desde el RS a la mitocondria (Min et al., 2012). En estos microdominios puede acumularse Ca^{2+} , favoreciendo la entrada del Ca^{2+} a la matriz mitocondrial por la apertura de canales como el complejo MCU (Csordás et al., 2006). Estudios

realizados en donde utilizaron ratones *knock out* para el gen de Mfn2 (Mfn2KO), demostraron que, en ausencia de esta proteína, hay una separación del RE de la mitocondria con una menor velocidad de captación de Ca^{2+} (de Brito & Scorrano, 2008; Naon et al., 2016). Sumado a esto se demostró que cuando la unión física mediante Mfn2 se rompe al utilizar los ratones Mfn2KO, el metabolismo mitocondrial y la producción ATP se ven comprometidos (Seidlmayer et al., 2015). También se ha observado que la hiperglicemia favorece la formación de MAMs en la CMD (S. Wu et al., 2019). En el modelo de prediabetes, estas proteínas se encontraron sobre expresadas (**Ilustración 8.1 paso 5**), sin embargo, para adjudicarles la causalidad de la menor distancia RS-mitocondrias es necesario hacer un estudio más preciso, evaluando su ubicación en las MAMs. Esto resulta una limitación del trabajo ya que no realizamos ensayos de proximidad, co-inmunoprecipitación o algún experimento que demostrara en anclaje entre ambas organelas mediante estas proteínas. Además, si bien este fenómeno observado es en parte debido a la hiperactivación de CaMKII, ya que en los transgénicos AC3I, donde CaMKII está inhibida, se previene el acercamiento entre RS-mitocondrias, no estudiamos en detalle la vía de translocación de estas proteínas que produce la disminución de distancia.

El rol no canónico de Mfn2 en las MAMs ha sido muy estudiado (de Brito & Scorrano, 2008; Seidlmayer et al., 2019), pero esta proteína tiene un rol canónico necesario para el desarrollo, que es el de participar en la fusión mitocondrial, junto con Opa1 (Chen et al., 2003). En nuestro trabajo encontramos un aumento en la expresión de Mfn2, y podría pensarse que Mfn2 está sobre expresada realizando su rol canónico como proteína de fusión. Sin embargo, debido a que Opa1 (indispensable para los procesos de fusión mitocondrial) no se encontró sobre expresada en los corazones prediabéticos, concluimos que en este modelo la Mfn2 se encuentra favoreciendo la comunicación entre organelas, predominando su rol no canónico. Por otro lado, Drp1 se encontró sobre expresada, y si bien en este trabajo no medimos otras proteínas relacionadas con la fisión mitocondrial (como son Fis-1, MiD49, MiD50, etc), este aumento se encuentra respaldado por las alteraciones estructurales de las mitocondrias analizadas en las fotografías de MET y funcionales observadas en los estudios de *swelling*, CRC y del metabolismo mitocondrial.

El cambio en la comunicación de las organelas facilita la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria y la sobrecarga mitocondrial (**Ilustración 8.1 paso 6**). Como mencionamos anteriormente, el manejo inadecuado del Ca^{2+} es responsable de varias enfermedades cardiacas. En estados fisiológicos, no sólo es responsable de la contracción cardiaca debido a su función al unirse a

la troponina y producir la liberación de la tropomiosina, sino que también es importante para la producción de energía como cofactor de varias deshidrogenasas del ciclo de TCA. Es así, que el manejo del Ca^{2+} es precisamente regulado, y sus alteraciones, aun confinadas a microdominios subcelulares que se forman entre la mitocondria y el RS, pueden gatillar un remodelamiento cardiaco el cual puede conducir a la evolución hacia la insuficiencia cardiaca. Por otro lado, el aumento de Ca^{2+} dentro de la mitocondria puede favorecer el aumento en la producción de ROS y la apertura del mPTP, que posteriormente, con la liberación de distintos solutos, puede desencadenar *swelling* mitocondrial y muerte celular (Baumgartner et al., 2009; Brookes et al., 2004). Los resultados de este trabajo muestran como la captación y retención de Ca^{2+} por la mitocondria se ve afectada en el corazón prediabético debido una posible sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial. La medida específica del Ca^{2+} mitocondrial es un desafío actualmente para muchos investigadores, ya que se han desarrollado diversas tecnologías, pero al utilizarlas deben tenerse ciertas consideraciones que muchas veces imposibilitan el desarrollo del experimento de la forma esperada. Algunas medidas involucran compuestos fluoróforos genéticos dirigidos específicamente a la mitocondria (CEPIAmt, Mitocam, Pericam) (Lu Xiyuan et al., 2013; Suarez et al., 2018; Wüst et al., 2017), y otros fluoróforos químicos como el Rhod-2-AM, que se compartimentaliza mayormente dentro de la mitocondria por sus cargas negativas (Chen Yun et al., 2012). Al utilizar este último indicador normalmente se aplica alguna estrategia para extraer el Rhod-2 remanente en el citosol, permeabilizando las células (Fernandez-Sanz et al., 2014), dializándolas (Maack Christoph et al., 2006) o agregando un quelante de Ca^{2+} como MnCl_2 (Abdallah et al., 2011). En nuestro modelo, si bien pudimos hacer aproximaciones mediante el uso de Rhod-2-AM, no obtuvimos datos confiables en cardiomiocitos aislados de ratón, ya que la señal obtenida resultó similar al Ca^{2+} citosólico. La diálisis o quelación del Ca^{2+} citosólico no nos pareció una buena estrategia ya que podíamos alterar el Ca^{2+} del microdominio RS-mitocondria, generando una situación que no es la que proponemos que se produce en el cardiomiocito intacto. Por otro lado, tuvimos la oportunidad de comenzar las medidas con CEPIAmt, sin embargo, los experimentos no pudieron finalizarse. Es así como, la medida de Ca^{2+} mitocondrial es una de las limitaciones de este trabajo, y uno de los objetivos futuros para continuar estudiando el modelo de prediabetes.

8.6. Alteraciones mitocondriales en el corazón prediabético

Los presentes resultados revelan que la prediabetes altera tanto la función como la morfología mitocondrial. Las mitocondrias de corazones de ratones prediabéticos presentaron un aumento en la fisión mitocondrial, por aumento en la expresión de Drp1, respecto de la fusión mitocondrial. De hecho, la disminución significativa en el tamaño, el aumento en la redondez y densidad de las mitocondrias observados en los corazones de ratones prediabéticos apoyan esta afirmación. Los resultados son consistentes con evidencia *in vitro* que sugiere que la hiperglucemia induce la fragmentación mitocondrial y la acumulación de ROS mitocondrial en las células H9c2, un proceso que se sugirió dependiente de Drp1 y que conduciría a la muerte celular por apoptosis (Yu et al., 2006). La fisión de las mitocondrias se encuentra estrechamente relacionada con una actividad alterada de ETC y F₁-F₀-ATP sintasa. Se ha demostrado que la dinámica de las mitocondrias es relevante para diferentes procesos fisiológicos y patológicos, como la insuficiencia cardiaca, y la DMT2. De hecho, las mitocondrias son la fuente principal de ATP pero también de producción de ROS, que a su vez pueden desencadenar estrés oxidativo, determinando así el destino de la célula (Pellegrini & Scorrano, 2007). La velocidad de consumo de O₂ y electrones por la ETC son dependiente de Ca²⁺, que a su vez activa el ciclo de TCA (Denton, 2009), para generar NADH y activar la producción de ATP (Griffiths & Rutter, 2009), y la producción de ROS (Nickel et al., 2014). El mayor consumo de O₂ y la disminución del CR en ratones prediabéticos indican que la ETC está demandado y acelerando su consumo de NADH. Este proceso puede tener al menos dos posibles consecuencias: 1) mayor consumo de O₂ y extrusión de H⁺ con un aumento en la velocidad de producción de ATP, si la ETC está acoplada o, 2) mayor consumo de O₂ y extrusión de H⁺ sin producción de ATP asociada y aumento de O₂⁻ y generación de H₂O₂, si la ETC no está acoplada (Kohlhaas et al., 2017; Nickel et al., 2014). Nuestros resultados sugieren que el segundo es el caso de los corazones prediabéticos: el aumento de la pérdida de Ca²⁺ por el RS y la mayor proximidad RS-mitocondria, son responsables de la disminución de la CRC y *swelling* mitocondrial observados, junto con disipación del $\Delta\Psi$, que a su vez desencadenan el aumento de producción de H₂O₂ descrito, generando un desequilibrio entre la producción y eliminación de ROS (**Ilustración 8.1 paso 7 y 8**). En este sentido, sería necesario poder medir los sistemas antioxidantes para evaluar si efectivamente con el aumento de la producción de H₂O₂ genera un estrés oxidativo en los cardiomiocitos de ratones prediabéticos. No hay que perder de vista

que los experimentos de peroxidación lipídica muestran que es muy posible que haya un aumento de estrés oxidativo y desbalance entre las especies oxidantes y reductoras.

Tanto el Ca^{2+} mitocondrial como los ROS son fuertes estimulantes del mPTP, que es partícipe de la vía intrínseca de la apoptosis (Kathleen W. Kinnally et al., 2011; Seidlmayer et al., 2015). Por lo que estos cambios en el metabolismo mitocondrial pueden favorecer la apoptosis observada en los corazones prediabéticos (**Ilustración 8.1 paso 9**). Con los resultados de *swelling* y CRC se puede especular que el mPTP se encuentra más sensible, formando parte del primer paso hacia la apoptosis celular.

8.7. Efectos deletéreos de CaMKII en la prediabetes

Como se mencionó en el **Capítulo 7** el aumento de la producción de ROS activaría a CaMKII siendo el principio de la vía apoptótica en el corazón prediabético. CaMKII es una enzima importante en la regulación del funcionamiento del ECC, que puede fosforilar una gran variedad de proteínas, entre ellas PLN, RyR2 y varias proteínas mitocondriales (Mattiuzzi et al., 2015). CaMKII es una enzima central de varios estímulos apoptóticos que activaba las vías de muerte celular en el músculo cardíaco (W. Zhu et al., 2007). En la CMD, varias alteraciones cardíacas han sido atribuidas a la activación de CaMKII (M. Luo et al., 2013). Luo et al. describió que la ox-CaMKII aumentó significativamente en los tejidos marcapaso de pacientes diabéticos en comparación con pacientes no diabéticos después de un infarto de miocardio, y esto a su vez, empeoraba la condición de los pacientes diabéticos (M. Luo et al., 2013). En trabajos previos del grupo de investigación se observaron alteraciones en el manejo de Ca^{2+} que desencadenaron arritmias dependientes de CaMKII en ratas prediabéticas (Sommese et al., 2016), lo que nos llevó a evaluar la actividad de esta enzima en los ratones prediabéticos y la apoptosis.

En este trabajo se demostró que CaMKII se encuentra fosforilando al RyR2, quién aumenta su actividad, y produce liberaciones espontáneas de Ca^{2+} , generando un aumento en el ciclado de Ca^{2+} y efectos deletéreos en las mitocondrias y el corazón (**Ilustración 8.1**). Según los resultados en los ratones AC3I y S2814A prediabéticos, CaMKII también participa en la conexión de la pérdida de Ca^{2+} por el RS, la sobrecarga de Ca^{2+} de las mitocondrias y el mal funcionamiento de estas organelas.

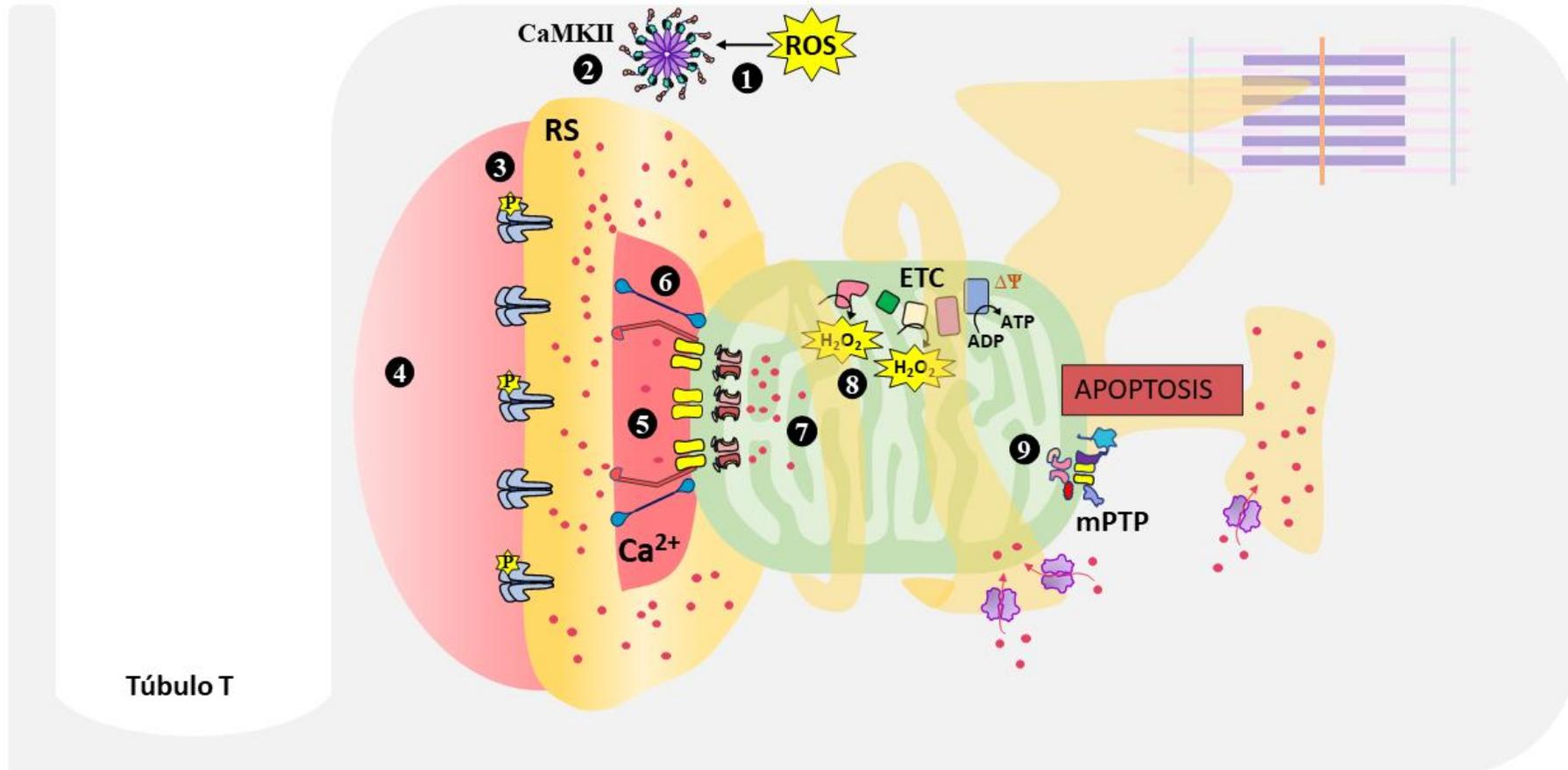


Ilustración 8.1. Esquema de eventos producidos en el corazón prediabético.

1, el aumento de ROS activa a la enzima CaMKII. 2, CaMKII se puede autofosforilar y activarse independientemente de los niveles de Ca^{2+} . 3, CaMKII fosforila al RyR2 aumentando su actividad. 4, la hiperactividad del RyR2 genera pérdidas espontáneas de Ca^{2+} . 5, se produce un aumento del Ca^{2+} en los microdominios cercanos a las mitocondrias. 6, la distancia más estrecha entre RS-mitocondria debido a Mfn2, VDAC y Grp75 favorece la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. 7, el Ca^{2+} ingresa a la mitocondria sobrecargándola. 8, se produce un aumento en la producción de ROS en la ETC, sin cambios en la producción de ATP, y un potencial de membrana mitocondrial alterado, con cambios en la morfología mitocondrial (no se ve en la imagen). 9, se genera la apertura del mPTP en la mitocondria, desencadenando la muerte por apoptosis.

Relevancia clínica y limitaciones

La DMT2 es una patología insidiosa de afección multiorgánica, en donde el tratamiento está dirigido a disminuir la glucemia y tratar específicamente los problemas de órgano blanco que van surgiendo en cada paciente. La prevención del desarrollo de la DMT2 y sus complicaciones es uno de los puntos en donde hacer foco, ya que si se previene el desarrollo de la DMT2 manifiesta, se prevendrá el deterioro de los órganos más afectados. El comienzo insidioso de la DMT2 incluye una fase subclínica prolongada, la prediabetes. Reconocer esta etapa, diagnosticarla y buscar un posible tratamiento, es uno de los retos importantes para la prevención. En este modelo animal de prediabetes, mostramos eventos nocivos para los cardiomiocitos que llevan a la muerte celular, un paso previo a la fibrosis y necrosis que se ha observado en pacientes diabéticos (Frustaci Andrea et al., 2000). Los hallazgos de que CaMKII está hiperactiva en pacientes diabéticos y el conocimiento de aumento en la muerte celular en los corazones de estos pacientes (Frustaci Andrea et al., 2000; M. Luo et al., 2013) abogan por la relevancia clínica de nuestro trabajo.

Una posible limitación de nuestro modelo es que el consumo de calorías en la DRF es mayor en comparación con el consumo de los ratones tratados con DC. Este aumento en la ingesta puede estar afectando el tejido adiposo, influyendo en el estrés oxidativo e inflamatorio en el organismo en general (Francini et al., 2010), y esto estar a su vez afectando el desempeño de corazón. Si este aumento de la ingesta calórica, el aumento en el tejido adiposo blanco y las consecuencias generadas, tienen un papel modulador sobre la cascada apoptótica encontrada en el corazón prediabético, no puede determinarse a partir de los resultados actuales y merece una mayor investigación. Por otro lado, el estudio presenta las limitaciones de cualquier modelo animal para imitar la prediabetes en los seres humanos y por lo tanto la extrapolación de nuestros resultados a la práctica clínica debe ser muy cautelosa ya que no deja de ser un modelo animal. Tal es así que son necesarios estudios experimentales y de traslación a pacientes para evaluar la posibilidad de que las pérdidas de Ca^{2+} del RS dependientes de CaMKII, junto con un mal funcionamiento mitocondrial y apertura del mPTP también puedan constituir un mecanismo central para el desarrollo y progresión de la muerte celular por apoptosis en pacientes prediabéticos.

APÉNDICE I: Materiales y Métodos

Generales

Aislamiento de cardiomiocitos

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, seguida de toracotomía. Una vez que se visualizó el corazón, se insertó una cánula en la arteria aorta y se extrajo el corazón para realizar una perfusión retrograda. Para tal fin, la cánula fue conectada a un aparato de Langendorff (*Figura 0.1*) y se realizó la perfusión con una solución buffer HEPES (composición: 146.2 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.35 mM NaH₂PO₄, 1.05 mM MgSO₄, 11mM Glucosa, pH = 7.4) junto con el agregado de 1 mM CaCl₂, a 37 °C manteniendo un flujo constante de 12 – 14 ml/min y en presencia de un burbujeo constante con 100 % O₂. Una vez corroborado que el corazón latía correctamente y se limpió la sangre de las arterias coronarias se comenzó a perfundir con la misma solución buffer HEPES con el agregado de 10 mM EGTA por 3 - 4 minutos. Posteriormente, se continuó con la perfusión con una solución de HEPES más el agregado de colagenasa tipo II (75 U/ml), 1 % de BSA y 50 µM CaCl₂ por 14 - 15 minutos o hasta que los corazones se presentaron flácidos. Transcurrido este tiempo, se retiró el corazón del aparato de Langendorff y se separaron las aurículas. El tejido ventricular fue desgarrado con pinzas en buffer HEPES con enzima, y el tejido disgregado fue lavado varias veces con soluciones de buffer HEPES a las que se les agregó 1% BSA y distintas concentraciones crecientes de CaCl₂ (0.1 mM a 1mM). Las células finalmente aisladas se resuspendieron en buffer HEPES 2 mM para su posterior uso (*Figura 0.2*).



Figura 0.1. Equipo de perfusión Langendorff.
En la fotografía se muestra el equipo de Langendorff utilizado en el laboratorio para perfusión retrógrada. En la imagen se muestra un corazón de ratón percudiéndose con la solución enzimática.



Figura 0.2. Microscopia óptica de campo claro de cardiomiocitos aislados.
En la figura se muestra una foto del rendimiento de un aislamiento de cardiomiocitos de ratón.

Western blot

Preparación de homogenato.

Para los ensayos de *western blot*, los corazones extraídos de los animales fueron pesados, congelados en nitrógeno líquido, y reservados a -80°C hasta el momento de preparar la muestra. Para obtener el homogenato, el corazón fue embebido en un volumen de buffer de lisis (20 mM glicerolfosfato de sodio, 20 mM NaF, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0,2 mM Na_2VO_4 , 2 mM ditiotreitól, 10 mM benzamida, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 μM pepstatina, 1 %v/v Igepal, 0,01 %v/v de Triton y 0,048 mg/ml leupeptina) equivalente a 4 veces el peso de corazón, y se realizaron 3 ciclos de 30 segundos de homogenización y 30 segundos de pausa con el homogeneizador *Bio-gen Pro200* (Bio-Gen Handheld homogeneizer). Todo el proceso

se realizó sobre hielo. Los homogenatos obtenidos se dejaron 15 minutos sobre hielo y luego se realizó una centrifugación a 1000g por 10 minutos para eliminar los restos celulares. La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de *Bradford* descrito en la sección *Método de Bradford*.

Preparación de las muestras.

Para preparar las muestras se tomó el volumen necesario para obtener 100 µg de proteínas y se le agregó el buffer de muestra (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), Thermo Scientific) y 0,1 mM DTT (Ditiotreitol). El buffer de muestra se utiliza normalmente para preparar muestras para electroforesis con geles Bis-Tris y Tris-Glicina, contiene dodecilsulfato de litio (LDS) como agente reductor y desnaturalizante a pH = 8.4, aportándole carga negativa para que durante la corrida electroforética las proteínas se muevan sólo por tamaño. Además, posee *Coomassie G250* y Rojo fenol para seguir el frente de corrida y se le agrega DTT como agente reductor de los enlaces disulfuros.

Electroforesis.

De 60 - 90 µg de proteína total en la muestra fueron separados en geles de poliacrilamida al 10 % o 6% con SDS (dodecilsulfato de sodio), posteriormente se transfirieron las proteínas a membranas de difluoruro polivinilideno (PVDF). Dichas membranas se bloquearon con una solución de Leche 5 % p/v por 1 hora en agitación y luego incubaron durante una noche con los distintos anticuerpos primarios utilizados, enumerados en la **Tabla 0.1**. Pasada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces con buffer TBS-T (0,5 M Tris Buffer, 1,5M NaCl, 0,1% v/v *Tween* 20) y se incubaron por 40 - 60 min con anticuerpo secundario unidos a HRP, HRP-Anti-mouse o HRP-Anti-rabbit según fue necesario. La detección de la señal se visualizó mediante un kit de detección de quimioluminiscencia a base de HRP (Millipore, Billerica, MA, USA), utilizando un sistema de imagen *ChemiDoc* (BioRad). La intensidad de señal de las bandas en las inmunotransferencias se cuantificó por densitometría, utilizando el *software Image J*.

| Anticuerpo 1° Anti- | Dilución | Marca/Empresa |
|------------------------|----------|--|
| Bax | 1:2000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| Bcl-2 | 1:2000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| RyR | 1:5000 | ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |

| | | |
|--|----------|--|
| pS2808-RyR | 1:5000 | Badrilla, Leeds, UK |
| pS2814-RyR | 1:5000 | Badrilla, Leeds, UK |
| COX1 | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| Mfn2 | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| Grp75 | 1:500 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| VDAC | 1:1000 | SIGMA-Aldrich |
| Drp1 | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| Opa1 | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| Anticuerpos utilizados como control de carga | | |
| GAPDH | 1:1000 | Millipore, Billerica, MA, USA |
| Na ⁺ /K ⁺ ATPasa | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| Anticuerpo 2 ^o | Dilución | Marca/Empresa |
| Goat anti-mouse | 1:1000 | ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Goat anti-rabbit | 1:2000 | ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Goat anti-mouse | 1:15000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |
| Goat anti-rabbit | 1:15000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz CA, USA |

Tabla 0.1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Determinación de proteínas

Método de Lowry

El método colorimétrico de Lowry se basa en que ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan con el reactivo de Folin (ácido fosfotungsténico y ácido molibídico, color amarillo) en un medio alcalino para dar un complejo incoloro. Este se puede reducir con fenol para dar un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría entre 600 y 900 nm. La detección se realizó en un lector de placas espectrofotómetro (Varioskan® LUX, Thermo Scientific, MA, USA) a 630nm. Para calcular la concentración de proteínas se realizó una curva de calibración utilizando BSA como estándar.

Método de Bradford

El método colorimétrico de Bradford (Reactivo de Bradford, BIORAD) se basa en el cambio de color del colorante *Coomassie brilliant blue G-250* de marrón (absorción máxima a $\lambda = 465$

nm) a azul (absorción máxima a $\lambda = 610$ nm) en respuesta a la reacción con ciertos aminoácidos como arginina, lisina e histidina (*Bio-Rad Protein Assay | Investigación Científica | Bio-Rad*, n.d.). La absorción se registró en un espectrofotómetro a $\lambda = 595$ nm, donde se detecta la diferencia máxima entre ambas formas. Para calcular la concentración de proteínas se realizó una curva de calibración utilizando BSA como estándar.

Estadística

El análisis estadístico fue realizado con el programa *GraphPad Prism 8.0.1* (*Prism - GraphPad*, n.d.). Para evaluar si las poblaciones se comportaban como poblaciones normales se examinaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En caso donde el resultado de la prueba Shapiro-Wilk arrojó una $p > 0.05$ la población se consideró normal y posteriormente se utilizó un test de Student para comparar entre los experimentos realizados en animales tratados con la DC y DRF. Cuando la prueba de Shapiro-Wilk arrojó una $p < 0,05$, los resultados fueron analizados con la prueba de *Mann Whitney* para poblaciones no normales. En el caso de comparar más de una población se realizó ANOVA de una vía comparando las muestras respecto de su respectivo control.

Referencias

- Abdallah, Y., Kasseckert, S. A., Iraqi, W., Said, M., Shahzad, T., Erdogan, A., Neuhof, C., Gündüz, D., Schlüter, K.-D., Tillmanns, H., Piper, H. M., Reusch, H. P., & Ladilov, Y. (2011). Interplay between Ca²⁺ cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(11), 2478–2485. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01249.x>
- Adachi, T., Weisbrod, R. M., Pimentel, D. R., Ying, J., Sharov, V. S., Schöneich, C., & Cohen, R. A. (2004). S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nature Medicine*, *10*(11), 1200–1207. <https://doi.org/10.1038/nm1119>
- Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*, *15*(7), 539–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
- Alzamendi, A., Giovambattista, A., Raschia, A., Madrid, V., Gaillard, R. C., Rebolledo, O., Gagliardino, J. J., & Spinedi, E. (2009). Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine*, *35*(2), 227–232.
- American Diabetes Association. (2019). Standards of Medical Care in Diabetes—2019 Abridged for Primary Care Providers. *Clinical Diabetes: A Publication of the American Diabetes Association*, *37*(1), 11–34. <https://doi.org/10.2337/cd18-0105>
- American Diabetes Association. (2020). <https://www.diabetes.org/diabetes-risk/prediabetes>. <https://www.diabetes.org/diabetes-risk/prediabetes>.
- American Heart Association. (2016). *About Metabolic Syndrome*. [Www.Heart.Org](https://www.heart.org/en/health-topics/metabolic-syndrome/about-metabolic-syndrome). <https://www.heart.org/en/health-topics/metabolic-syndrome/about-metabolic-syndrome>
- An, H. S., Lee, J. Y., Choi, E. B., Jeong, E. A., Shin, H. J., Kim, K. E., Park, K.-A., Jin, Z., Lee, J. E., Koh, J. S., Kwak, W., Kim, W.-H., & Roh, G. S. (2020). Caloric restriction reverses left ventricular hypertrophy through the regulation of cardiac iron homeostasis in impaired leptin signaling mice. *Scientific Reports*, *10*(1), 7176. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64201-2>
- Anderson, E. J., Kypson, A. P., Rodriguez, E., Anderson, C. A., Lehr, E. J., & Neuffer, P. D. (2009). Substrate-Specific Derangements in Mitochondrial Metabolism and Redox Balance in the Atrium of the Type 2 Diabetic Human Heart. *Journal of the American College of Cardiology*, *54*(20), 1891–1898. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.07.031>
- Anderson, E. J., Rodriguez, E., Anderson, C. A., Thayne, K., Chitwood, W. R., & Kypson, A. P. (2011). Increased propensity for cell death in diabetic human heart is mediated by mitochondrial-dependent pathways. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *300*(1), H118–H124. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00932.2010>
- Andrienko, T. N., Picht, E., & Bers, D. M. (2009). Mitochondrial free calcium regulation during sarcoplasmic reticulum calcium release in rat cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *46*(6), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.015>

- Antos, C. L., Frey, N., Marx, S. O., Reiken, S., Gaburjakova, M., Richardson, J. A., Marks, A. R., & Olson, E. N. (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. *Circulation Research*, 89(11), 997–1004.
- Arany, Z., He, H., Lin, J., Hoyer, K., Handschin, C., Toka, O., Ahmad, F., Matsui, T., Chin, S., Wu, P.-H., Rybkin, I. I., Shelton, J. M., Manieri, M., Cinti, S., Schoen, F. J., Bassel-Duby, R., Rosenzweig, A., Ingwall, J. S., & Spiegelman, B. M. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metabolism*, 1(4), 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.03.002>
- Arvanitis, D. A., Vafiadaki, E., Fan, G.-C., Mitton, B. A., Gregory, K. N., Del Monte, F., Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Sanoudou, D., & Kranias, E. G. (2007). Histidine-rich Ca-binding protein interacts with sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(3), H1581-1589. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00278.2007>
- Asbun Juan & Villarreal Francisco J. (2006). The Pathogenesis of Myocardial Fibrosis in the Setting of Diabetic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(4), 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.050>
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281(5381), 1305–1308.
- Backs, J., Backs, T., Neef, S., Kreusser, M. M., Lehmann, L. H., Patrick, D. M., Grueter, C. E., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J. A., Katus, H. A., Bassel-Duby, R., Maier, L. S., & Olson, E. N. (2009). The δ isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2342–2347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813013106>
- Balderas-Villalobos, J., Molina-Muñoz, T., Mailloux-Salinas, P., Bravo, G., Carvajal, K., & Gómez-Viquez, N. L. (2013). Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 305(9), H1344-1353. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00211.2013>
- Bansal, N. (2015). Prediabetes diagnosis and treatment: A review. *World Journal of Diabetes*, 6(2), 296. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i2.296>
- Battiprolu, P. K., Gillette, T. G., Wang, Z. V., Lavandero, S., & Hill, J. A. (2010). Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 7(2), e135–e143. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2010.08.001>
- Baumgartner, H. K., Gerasimenko, J. V., Thorne, C., Ferdek, P., Pozzan, T., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., Sutton, R., Watson, A. J. M., & Gerasimenko, O. V. (2009). Calcium Elevation in Mitochondria Is the Main Ca²⁺ Requirement for Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Opening. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20796–20803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025353>
- Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., Valdelamar, L., Rodríguez, M., Seyfi, H., Amell, A., Carrillo, M., Silva, C., Acosta, A., Añez, J., Andara, C., Angulo, V., & Martins, G. (n.d.). *Biología molecular de los transportadores*. 12.
- Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabó, I., & Zoratti, M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 2934–2939.
- Bernardi, Paolo. (1999). Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological Reviews*, 79(4), 1127–1155.

- Bers, D. M. (2001). Excitation-Contraction Coupling. In D. M. Bers (Ed.), *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* (pp. 203–244). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0658-3_8
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>
- Bers, D. M. (2014). Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak: Basis and Roles in Cardiac Dysfunction. *Annual Review of Physiology*, *76*(1), 107–127. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153308>
- Bertero, E., & Maack, C. (2018). Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circulation Research*, *122*(10), 1460–1478. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.310082>
- Beutner, G., Rück, A., Riede, B., & Brdiczka, D. (1997). Complexes between hexokinase, mitochondrial porin and adenylate translocator in brain: Regulation of hexokinase, oxidative phosphorylation and permeability transition pore. *Biochemical Society Transactions*, *25*(1), 151–157. <https://doi.org/10.1042/bst0250151>
- Beutner, Gisela, Sharma, V. K., Lin, L., Ryu, S.-Y., Dirksen, R. T., & Sheu, S.-S. (2005). Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation–metabolism coupling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1717*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.016>
- Bibel, M., & Barde, Y.-A. (2000). Neurotrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development*, *14*(23), 2919–2937.
- Bidasee, K. R., Zhang, Y., Shao, C. H., Wang, M., Patel, K. P., Dincer, U. D., & Besch, H. R. (2004). Diabetes Increases Formation of Advanced Glycation End Products on Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *Diabetes*, *53*(2), 463–473. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2.463>
- Bigelow, D. J., & Squier, T. C. (2005). Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1703*(2), 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.012>
- Bio-Rad Protein Assay | Investigación Científica | Bio-Rad. (n.d.). Retrieved January 22, 2021, from <https://www.bio-rad.com/es-ar/product/bio-rad-protein-assay?ID=d4d4169a-12e8-4819-8b3e-ccab019c6e13>
- Bombicino, S. S., Iglesias, D. E., Rukavina-Mikusic, I. A., Buchholz, B., Gelpi, R. J., Boveris, A., & Valdez, L. B. (2017). Hydrogen peroxide, nitric oxide and ATP are molecules involved in cardiac mitochondrial biogenesis in Diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, *112*, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.027>
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2017). *Fisiología médica*. Elsevier Health Sciences.
- Braun, A. P., & Schulman, H. (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: From form to function. *Annual Review of Physiology*, *57*(1), 417–445.
- Braun, J. L., Hamstra, S. I., Messner, H. N., & Fajardo, V. A. (2019). SERCA2a tyrosine nitration coincides with impairments in maximal SERCA activity in left ventricles from tafazzin-deficient mice. *Physiological Reports*, *7*(16), e14215. <https://doi.org/10.14814/phy2.14215>
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *287*(4), C817–C833. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>
- Bround, M. J., Bers, D. M., & Molkentin, J. D. (2020). A 20/20 view of ANT function in mitochondrial biology and necrotic cell death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *144*, A3–A13. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.012>

- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., & Stoppani, A. O. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *180*(2), 248–257.
- Cai, L., & Kang, Y. J. (2003). Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Toxicology*, *3*(3), 219–228. <https://doi.org/10.1385/CT:3:3:219>
- Caiani, E. G., Corsi, C., Sugeng, L., MacEneaney, P., Weinert, L., Mor-Avi, V., & Lang, R. M. (2006). Improved quantification of left ventricular mass based on endocardial and epicardial surface detection with real time three dimensional echocardiography. *Heart*, *92*(2), 213–219. <https://doi.org/10.1136/hrt.2005.060889>
- Camors, E., & Valdivia, H. H. (2014). CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Frontiers in Pharmacology*, *5*, 101. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00101>
- Capes, Em., Loaiza, R., & Valdivia, H. H. (2011). Ryanodine receptors. *Skeletal Muscle*, *1*(1), 1–13.
- Carley, A. N., & Severson, D. L. (2005). Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1734*(2), 112–126.
- Carraro, M., Carrer, A., Urbani, A., & Bernardi, P. (2020). Molecular nature and regulation of the mitochondrial permeability transition pore(s), drug target(s) in cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *144*, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.014>
- Carter, S., Colyer, J., & Sitsapesan, R. (2006). Maximum phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine-2809 by protein kinase a produces unique modifications to channel gating and conductance not observed at lower levels of phosphorylation. *Circulation Research*, *98*(12), 1506–1513.
- CellSens | Software de procesamiento de imágenes | Soluciones Olympus Life Science. (n.d.). Retrieved December 22, 2020, from <https://www.olympus-lifescience.com/es/software/cellsens/>
- Cely-Ortiz, A., Felice, J. I., Díaz-Zegarra, L. A., Valverde, C. A., Federico, M., Palomeque, J., Wehrens, X. H. T., Kranias, E. G., Aiello, E. A., Lascano, E. C., Negroni, J. A., & Mattiazzi, A. (2020). Determinants of Ca²⁺ release restitution: Insights from genetically altered animals and mathematical modeling. *Journal of General Physiology*, *152*(e201912512). <https://doi.org/10.1085/jgp.201912512>
- Chaanine, A. H. (2019). Morphological Stages of Mitochondrial Vacuolar Degeneration in Phenylephrine-Stressed Cardiac Myocytes and in Animal Models and Human Heart Failure. *Medicina*, *55*(6), 239. <https://doi.org/10.3390/medicina55060239>
- Challice, C. E., & Virágh, S. (2013). *Ultrastructure of the Mammalian Heart*. Elsevier.
- Chattou, S., Diacono, J., & Feuvray, D. (1999). Decrease in sodium-calcium exchange and calcium currents in diabetic rat ventricular myocytes. *Acta Physiologica Scandinavica*, *166*(2), 137–144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.1999.00547.x>
- Chelu, M. G., Sarma, S., Sood, S., Wang, S., Van Oort, R. J., Skapura, D. G., Li, N., Santonastasi, M., Müller, F. U., & Schmitz, W. (2009). Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(7), 1940–1951.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *Journal of Cell Biology*, *160*(2), 189–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>

- Chen Yun, Csordás György, Jowdy Casey, Schneider Timothy G., Csordás Norbert, Wang Wei, Liu Yingqiu, Kohlhaas Michael, Meiser Maxie, Bergem Stefanie, Nerbonne Jeanne M., Dorn Gerald W., & Maack Christoph. (2012). Mitofusin 2-Containing Mitochondrial-Reticular Microdomains Direct Rapid Cardiomyocyte Bioenergetic Responses Via Interorganelle Ca²⁺ Crosstalk. *Circulation Research*, *111*(7), 863–875. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.266585>
- Chong, C.-R., Clarke, K., & Levelt, E. (2017). Metabolic remodelling in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, *113*(4), 422–430. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx018>
- Christoffersen, C., Bollano, E., Lindegaard, M. L. S., Bartels, E. D., Goetze, J. P., Andersen, C. B., & Nielsen, L. B. (2003). Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology*, *144*(8), 3483–3490. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0242>
- Cingolani, H. E. (2006). *Fisiología humana de Houssay*. El Ateneo Buenos Aires, Argentina.
- Ciucci Pardo, A., González Arbeláez, L. F., Fantinelli, J. C., Aiello, E. A., & Mosca, S. M. (2019). Calcineurin/P38MAPK/HSP27-dependent pathways are involved in the attenuation of postischemic mitochondrial injury afforded by sodium bicarbonate co-transporter (NBCe1) inhibition. *Biochemical Pharmacology*, *161*, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.002>
- Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(45), 15927–15932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>
- Cohen, R. A., & Adachi, T. (2006). Nitric-oxide-induced vasodilatation: Regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *16*(4), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2006.02.001>
- Csordás, G., Golenár, T., Seifert, E. L., Kamer, K. J., Sancak, Y., Perocchi, F., Moffat, C., Weaver, D., Perez, S. de la F., Bogorad, R., Koteliensky, V., Adijanto, J., Mootha, V. K., & Hajnóczky, G. (2013). MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Metabolism*, *17*(6), 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.020>
- Csordás, G., & Hajnóczky, G. (2009). SR/ER–mitochondrial local communication: Calcium and ROS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1787*(11), 1352–1362. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.06.004>
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A., & Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *Journal of Cell Biology*, *174*(7), 915–921. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604016>
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Sheu, S.-S., & Hajnóczky, G. (2012). Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: Molecular mechanisms and pharmacology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *353*(1), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.011>
- Csordás, G., Weaver, D., & Hajnóczky, G. (2018). Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends in Cell Biology*, *28*(7), 523–540. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.009>
- Dabkowski, E. R., Baseler, W. A., Williamson, C. L., Powell, M., Razunguzwa, T. T., Frisbee, J. C., & Hollander, J. M. (2010). Mitochondrial dysfunction in the type 2 diabetic heart is associated with alterations in spatially distinct mitochondrial proteomes. *American*

- Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 299(2), H529–H540. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00267.2010>
- DAPI 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride. (n.d.). 28718-90-3. Retrieved December 22, 2020, from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/10236276001>
- Davis, B. A., Schwartz, A., Samaha, F. J., & Kranias, E. G. (1983). Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(22), 13587–13591.
- de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222), 605–610. <https://doi.org/10.1038/nature07534>
- de Moissac, D., Gurevich, R. M., Zheng, H., Singal, P. K., & Kirshenbaum, L. A. (2000). Caspase activation and mitochondrial cytochrome C release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(1), 53–63.
- Del Re, D. P., Amgalan, D., Linkermann, A., Liu, Q., & Kitsis, R. N. (2019). Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiological Reviews*, 99(4), 1765–1817. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2018>
- Denton, R. M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(11), 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>
- Deshwal, S., Forkink, M., Hu, C.-H., Buonincontri, G., Antonucci, S., Di Sante, M., Murphy, M. P., Paolocci, N., Mochly-Rosen, D., Krieg, T., Di Lisa, F., & Kaludercic, N. (2018). Monoamine oxidase-dependent endoplasmic reticulum-mitochondria dysfunction and mast cell degranulation lead to adverse cardiac remodeling in diabetes. *Cell Death & Differentiation*, 25(9), 1671–1685. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0071-1>
- Di Carlo, M. N., Said, M., Ling, H., Valverde, C. A., De Giusti, V. C., Sommese, L., Palomeque, J., Aiello, E. A., Skapura, D. G., Rinaldi, G., Respress, J. L., Brown, J. H., Wehrens, X. H. T., Salas, M. A., & Mattiazzi, A. (2014). CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 74, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.06.004>
- Dia, M., Gomez, L., Thibault, H., Tessier, N., Leon, C., Chouabe, C., Ducreux, S., Gallo-Bona, N., Tubbs, E., Bendridi, N., Chanon, S., Leray, A., Belmudes, L., Couté, Y., Kurdi, M., Ovize, M., Rieusset, J., & Paillard, M. (2020). Reduced reticulum–mitochondria Ca²⁺ transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*, 115(6), 74. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-00835-7>
- Diaz, M., Graham, H., O'Neill, S., Trafford, A., & Eisner, D. (2005). The control of sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac muscle. *Cell Calcium*, 38(3–4), 391–396.
- Díaz-Flores, M., Baiza-Gutman, L. A., Ibáñez-Hernández, M. Á., Pascoe-Lira, D., Guzmán-Greenfel, A. M., & Kumate-Rodríguez, J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *140*(4), 13.
- Dimroth, P., von Ballmoos, C., & Meier, T. (2006). Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. *EMBO Reports*, 7(3), 276–282. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400646>
- Doi, M., Yano, M., Kobayashi, S., Kohno, M., Tokuhiwa, T., Okuda, S., Suetsugu, M., Hisamatsu, Y., Ohkusa, T., & Kohno, M. (2002). Propranolol prevents the development of heart failure by restoring FKBP12.6-mediated stabilization of ryanodine receptor. *Circulation*, 105(11), 1374–1379.

- Dommermuth, R., & Ewing, K. (2018). Metabolic Syndrome: Systems Thinking in Heart Disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 45(1), 109–129. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.10.003>
- Dong, F., Zhang, X., Yang, X., Esberg, L. B., Yang, H., Zhang, Z., Culver, B., & Ren, J. (2006). Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *Journal of Endocrinology*, 188(1), 25–36. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06241>
- Dubuc, P. U. (1976). The development of obesity, hyperinsulinemia, and hyperglycemia in ob/ob mice. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 25(12), 1567–1574. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(76\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0026-0495(76)90109-8)
- Duncan, J. G., Fong, J. L., Medeiros, D. M., Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2007). Insulin-Resistant Heart Exhibits a Mitochondrial Biogenic Response Driven by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α /PGC-1 α Gene Regulatory Pathway. *Circulation*, 115(7), 909–917. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.662296>
- Durgan, D. J., Smith, J. K., Hotze, M. A., Egbejimi, O., Cuthbert, K. D., Zaha, V. G., Dyck, J. R. B., Abel, E. D., & Young, M. E. (2006). Distinct transcriptional regulation of long-chain acyl-CoA synthetase isoforms and cytosolic thioesterase 1 in the rodent heart by fatty acids and insulin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(6), H2480–H2497. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01344.2005>
- Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 663–669. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>
- Edman, C. F., & Schulman, H. (1994). Identification and characterization of δ B-CaM kinase and δ C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1221(1), 89–101.
- Eisner D. A., Choi H. S., Díaz M. E., O’Neill S. C., & Trafford A. W. (2000). Integrative Analysis of Calcium Cycling in Cardiac Muscle. *Circulation Research*, 87(12), 1087–1094. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.12.1087>
- Ellis, H. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817–829. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8)
- Erickson, J. R., He, B. J., Grumbach, I. M., & Anderson, M. E. (2011). CaMKII in the Cardiovascular System: Sensing Redox States. *Physiological Reviews*, 91(3), 889–915. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2010>
- Erickson, J. R., Joiner, M. A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., Bartlett, R. K., Lowe, J. S., O’Donnell, S. E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M. C., Zimmerman, K., Ham, A.-J. L., Weiss, R. M., Spitz, D. R., Shea, M. A., Colbran, R. J., Mohler, P. J., & Anderson, M. E. (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, 133(3), 462–474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.048>
- Erickson, J. R., Nichols, C. B., Uchinoumi, H., Stein, M. L., Bossuyt, J., & Bers, D. M. (2015). S-Nitrosylation Induces Both Autonomous Activation and Inhibition of Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II δ . *The Journal of Biological Chemistry*, 290(42), 25646–25656. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.650234>
- Erickson, J. R., Patel, R., Ferguson, A., Bossuyt, J., & Bers, D. M. (2011). Fluorescence resonance energy transfer-based sensor Camui provides new insight into mechanisms of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation in intact cardiomyocytes. *Circulation Research*, 109(7), 729–738.

- Erickson, J. R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R. J., Despa, F., Hart, G. W., Ripplinger, C. M., & Bers, D. M. (2013). Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, *502*(7471), 372–376. <https://doi.org/10.1038/nature12537>
- Fang, W., Wang, C., He, Y., Zhou, Y., Peng, X., & Liu, S. (2018). Resveratrol alleviates diabetic cardiomyopathy in rats by improving mitochondrial function through PGC-1 α deacetylation. *Acta Pharmacologica Sinica*, *39*(1), 59–73. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.50>
- Farrell, E. F., Antaramian, A., Rueda, A., Gómez, A. M., & Valdivia, H. H. (2003). Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(36), 34660–34666.
- Federico, M., Valverde, C. A., Mattiazzi, A., & Palomeque, J. (2020). Unbalance Between Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ + Uptake and Release: A First Step Toward Ca²⁺ + Triggered Arrhythmias and Cardiac Damage. *Frontiers in Physiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01630>
- Felice, J. I., Gangoiti, M. V., Molinuevo, M. S., McCarthy, A. D., & Cortizo, A. M. (2014). Effects of a metabolic syndrome induced by a fructose-rich diet on bone metabolism in rats. *Metabolism*, *63*(2), 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.11.002>
- Fernandez-Sanz, C., Ruiz-Meana, M., Miro-Casas, E., Nuñez, E., Castellano, J., Loureiro, M., Barba, I., Poncelas, M., Rodriguez-Sinovas, A., Vázquez, J., & Garcia-Dorado, D. (2014). Defective sarcoplasmic reticulum–mitochondria calcium exchange in aged mouse myocardium. *Cell Death & Disease*, *5*(12), e1573–e1573. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.526>
- Ferrero, P., Said, M., Sánchez, G., Vittone, L., Valverde, C., Donoso, P., Mattiazzi, A., & Mundiña-Weilenmann, C. (2007). Ca²⁺/calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release kinetics during β -adrenergic stimulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *43*(3), 281–291.
- Fieni, F., Johnson, D. E., Hudmon, A., & Kirichok, Y. (2014). Mitochondrial Ca²⁺ uniporter and CaMKII in heart. *Nature*, *513*(7519), E1-2. <https://doi.org/10.1038/nature13626>
- Fieni, F., Lee, S. B., Jan, Y. N., & Kirichok, Y. (2012). Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues. *Nature Communications*, *3*, 1317. <https://doi.org/10.1038/ncomms2325>
- Fill, M., & Copello, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological Reviews*, *82*(4), 893–922.
- Fillmore, N., Mori, J., & Lopaschuk, G. D. (2014). Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *British Journal of Pharmacology*, *171*(8), 2080–2090. <https://doi.org/10.1111/bph.12475>
- Finck, B. N., Han, X., Courtois, M., Aimond, F., Nerbonne, J. M., Kovacs, A., Gross, R. W., & Kelly, D. P. (2003). A critical role for PPAR α -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(3), 1226–1231.
- Fischer, T. H., Eiringhaus, J., Dybkova, N., Saadatmand, A., Pabel, S., Weber, S., Wang, Y., Köhn, M., Tirilomis, T., & Ljubojevic, S. (2018). Activation of protein phosphatase 1 by a selective phosphatase disrupting peptide reduces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human heart failure. *European Journal of Heart Failure*, *20*(12), 1673–1685.
- Fischer, T. H., Herting, J., Tirilomis, T., Renner, A., Neef, S., Toischer, K., Ellenberger, D., Förster, A., Schmitto, J. D., Gummert, J., Schöndube, F. A., Hasenfuss, G., Maier, L. S., & Sossalla, S. (2013). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein

- kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology. *Circulation*, 128(9), 970–981. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001746>
- Fournier, N., Ducet, G., & Crevat, A. (1987). Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 19(3), 297–303. <https://doi.org/10.1007/BF00762419>
- Francini, F., Castro, M. C., Schinella, G., García, M. E., Maiztegui, B., Raschia, M. A., Gagliardino, J. J., & Massa, M. L. (2010). Changes induced by a fructose-rich diet on hepatic metabolism and the antioxidant system. *Life Sciences*, 86(25), 965–971. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.05.005>
- Franzini-Armstrong, C. (1973). THE STRUCTURE OF A SIMPLE Z LINE. *Journal of Cell Biology*, 58(3), 630–642. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.3.630>
- Fredersdorf, S., Thumann, C., Ulucan, C., Griese, D. P., Luchner, A., Riegger, G. A. J., Kromer, E. P., & Weil, J. (2004). Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovascular Pathology*, 13(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/S1054-8807\(03\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S1054-8807(03)00109-1)
- Froehlich, J. P., Mahaney, J. E., Keceli, G., Pavlos, C. M., Goldstein, R., Redwood, A. J., Sumbilla, C., Lee, D. I., Tocchetti, C. G., Kass, D. A., Paolocci, N., & Toscano, J. P. (2008). Phospholamban thiols play a central role in activation of the cardiac muscle sarcoplasmic reticulum calcium pump by nitroxyl. *Biochemistry*, 47(50), 13150–13152. <https://doi.org/10.1021/bi801925p>
- Frustaci Andrea, Kajstura Jan, Chimenti Cristina, Jakoniuk Igor, Leri Annarosa, Maseri Attilio, Nadal-Ginard Bernardo, & Anversa Piero. (2000). Myocardial Cell Death in Human Diabetes. *Circulation Research*, 87(12), 1123–1132. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.12.1123>
- Gaertner, T., Kolodziej, S., Wang, D., Kobayashi, R., Koomen, J., Stoops, J., & Waxham, N. (2004). Comparative Analyses of the Three-dimensional Structures and Enzymatic Properties of , , and Isoforms of Ca²⁺-Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 12484–12494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313597200>
- Gagliardino, J. J., de Sereday, M., González, C., Domínguez, J. M., & Mazza, C. S. (2007). *Conclusiones de la reunión de consenso sobre criterio diagnóstico de la glucemia de ayunas alterada, de la Sociedad Argentina de Diabetes*. 41, 12.
- Galloway, C. A., & Yoon, Y. (2015). Mitochondrial Dynamics in Diabetic Cardiomyopathy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(17), 1545–1562. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6293>
- Gao, L., Blair, L. A. C., & Marshall, J. (2006). CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: Reversible inhibition of L-type calcium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(4), 1606–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.066>
- García-Pérez, C., Schneider, T. G., Hajnóczky, G., & Csordás, G. (2011). Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), H1907–H1915. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00397.2011>
- Genuth, S., Alberti, K. G. M. M., Bennett, P., Buse, J., Defronzo, R., Kahn, R., Kitzmiller, J., Knowler, W. C., Lebovitz, H., Lernmark, A., Nathan, D., Palmer, J., Rizza, R., Saudek, C., Shaw, J., Steffes, M., Stern, M., Tuomilehto, J., Zimmet, P., & Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003). Follow-up report on

- the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26(11), 3160–3167. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.11.3160>
- Gerstein, H. C., Santaguida, P., Raina, P., Morrison, K. M., Balion, C., Hunt, D., Yazdi, H., & Booker, L. (2007). Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: A systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 78(3), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.05.004>
- Ghosh, S., Pulinilkunnil, T., Yuen, G., Kewalramani, G., An, D., Qi, D., Abrahani, A., & Rodrigues, B. (2005). Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(2), H768–H776. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00038.2005>
- Gincel, D., Zaid, H., & Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: A possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochemical Journal*, 358(1), 147–155.
- Goto, Y., Suzuki, K., Ono, T., Sasaki, M., & Toyota, T. (1988). Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 246, 29–31. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5616-5_4
- Gray, C. B. B., & Heller Brown, J. (2014). CaMKII δ subtypes: Localization and function. *Frontiers in Pharmacology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00015>
- Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell*, 121(5), 671–674.
- Greenstein, J. L., Foteinou, P. T., Hashambhoy-Ramsay, Y. L., & Winslow, R. L. (2014). Modeling CaMKII-mediated regulation of L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in the heart. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 60.
- Griffiths, E. J., & Rutter, G. A. (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(11), 1324–1333. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.019>
- Grimm, M., Ling, H., Willeford, A., Pereira, L., Gray, C. B. B., Erickson, J. R., Sarma, S., Respress, J. L., Wehrens, X. H. T., Bers, D. M., & Brown, J. H. (2015). CaMKII δ mediates β -adrenergic effects on RyR2 phosphorylation and SR Ca²⁺ leak and the pathophysiological response to chronic β -adrenergic stimulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 85, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.06.007>
- Griswold, C. K. (2011). A model of the physiological basis of a multivariate phenotype that is mediated by Ca²⁺ signaling and controlled by ryanodine receptor composition. *Journal of Theoretical Biology*, 282(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.05.003>
- Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004). Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*, 109(3), 433–438. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6>
- Gryniewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450.
- Guerra Sabrina, Leri Annarosa, Wang Xiaowei, Finato Nicoletta, Di Loreto Carla, Beltrami Carlo Alberto, Kajstura Jan, & Anversa Piero. (1999). Myocyte Death in the Failing Human Heart Is Gender Dependent. *Circulation Research*, 85(9), 856–866. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.9.856>

- Gulati, A., Jabbour, A., Ismail, T. F., Guha, K., Khwaja, J., Raza, S., Morarji, K., Brown, T. D. H., Ismail, N. A., Dweck, M. R., Di Pietro, E., Roughton, M., Wage, R., Daryani, Y., O'Hanlon, R., Sheppard, M. N., Alpendurada, F., Lyon, A. R., Cook, S. A., ... Prasad, S. K. (2013). Association of Fibrosis With Mortality and Sudden Cardiac Death in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *JAMA*, *309*(9), 896–908. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.1363>
- Gunter, K. K., Zuscik, M. J., & Gunter, T. E. (1991). The Na(+)-independent Ca²⁺ efflux mechanism of liver mitochondria is not a passive Ca²⁺/2H⁺ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(32), 21640–21648.
- Guo, T., Zhang, T., Mestril, R., & Bers, D. M. (2006). Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circulation Research*, *99*(4), 398–406. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000236756.06252.13>
- Guo, X.-X., Wang, Y., Wang, K., Ji, B.-P., & Zhou, F. (2018). Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *19*(7), 559–569. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700254>
- Gutierrez, D. A., Fernandez-Tenorio, M., Ogrodnik, J., & Niggli, E. (2013). NO-dependent CaMKII activation during β -adrenergic stimulation of cardiac muscle. *Cardiovascular Research*, *100*(3), 392–401. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt201>
- Györke, I., Hester, N., Jones, L. R., & Györke, S. (2004). The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophysical Journal*, *86*(4), 2121–2128.
- Györke, S., & Terentyev, D. (2008). Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovascular Research*, *77*(2), 245–255.
- Haghighi, K., Pritchard, T. J., Liu, G.-S., Singh, V. P., Bidwell, P., Lam, C. K., Vafiadaki, E., Das, P., Ma, J., Kunduri, S., Sanoudou, D., Florea, S., Vanderbilt, E., Wang, H.-S., Rubinstein, J., Hajjar, R. J., & Kranias, E. G. (2015). Human G109E-inhibitor-1 impairs cardiac function and promotes arrhythmias. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *89*(Pt B), 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.10.004>
- Hajer, G. R., Van Haeften, T. W., & Visseren, F. L. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, *29*(24), 2959–2971.
- Halestrap, A. P., & Davidson, A. M. (1990). Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochemical Journal*, *268*(1), 153–160. <https://doi.org/10.1042/bj2680153>
- Hall, A. R., Burke, N., Dongworth, R. K., & Hausenloy, D. J. (2014). Mitochondrial fusion and fission proteins: Novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. *British Journal of Pharmacology*, *171*(8), 1890–1906. <https://doi.org/10.1111/bph.12516>
- Hall, M. E., Maready, M. W., Hall, J. E., & Stec, D. E. (2014). Rescue of cardiac leptin receptors in db/db mice prevents myocardial triglyceride accumulation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *307*(3), E316–325. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00005.2014>
- Han, X., Tao, Y., Deng, Y., Yu, J., Sun, Y., & Jiang, G. (2017). Metformin accelerates wound healing in type 2 diabetic db/db mice. *Molecular Medicine Reports*, *16*(6), 8691–8698. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7707>

- Hanson, P. I., Kapiloff, M. S., Lou, L. L., Rosenfeld, M. G., & Schulman, H. (1989). Expression of a multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation. *Neuron*, 3(1), 59–70. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90115-3)
- Hart, G. W., Housley, M. P., & Slawson, C. (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, 446(7139), 1017–1022. <https://doi.org/10.1038/nature05815>
- He, B. J., Joiner, M.-L. A., Singh, M. V., Luczak, E. D., Swaminathan, P. D., Koval, O. M., Kutschke, W., Allamargot, C., Yang, J., Guan, X., Zimmerman, K., Grumbach, I. M., Weiss, R. M., Spitz, D. R., Sigmund, C. D., Blankesteyn, W. M., Heymans, S., Mohler, P. J., & Anderson, M. E. (2011). Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone. *Nature Medicine*, 17(12), 1610–1618. <https://doi.org/10.1038/nm.2506>
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43.
- He, Y., Zhou, L., Fan, Z., Liu, S., & Fang, W. (2018). Palmitic acid, but not high-glucose, induced myocardial apoptosis is alleviated by N -acetylcysteine due to attenuated mitochondrial-derived ROS accumulation-induced endoplasmic reticulum stress. *Cell Death & Disease*, 9(5), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0593-y>
- Hegyí, B., Bers, D. M., & Bossuyt, J. (2019). CaMKII signaling in heart diseases: Emerging role in diabetic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 127, 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.01.001>
- Helms Adam S., Alvarado Francisco J., Yob Jaime, Tang Vi T., Pagani Francis, Russell Mark W., Valdivia Héctor H., & Day Sharlene M. (2016). Genotype-Dependent and -Independent Calcium Signaling Dysregulation in Human Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*, 134(22), 1738–1748. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020086>
- Herskovits, J., Burgess, C., Obar, R., & Vallee, R. (1993). Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 122(3), 565–578. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.3.565>
- Hirst, J. (2009). Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochemical Journal*, 425(2), 327–339. <https://doi.org/10.1042/BJ20091382>
- Hove-Madsen Leif, Llach Anna, Bayes-Genís Antoni, Roura Santiago, Font Enrique Rodríguez, Arís Alejandro, & Cinca Juan. (2004). Atrial Fibrillation Is Associated With Increased Spontaneous Calcium Release From the Sarcoplasmic Reticulum in Human Atrial Myocytes. *Circulation*, 110(11), 1358–1363. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87>
- How, O.-J., Aasum, E., Severson, D. L., Chan, W. Y. A., Essop, M. F., & Larsen, T. S. (2006). Increased Myocardial Oxygen Consumption Reduces Cardiac Efficiency in Diabetic Mice. *Diabetes*, 55(2), 466–473. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1164>
- Hudmon, A., Schulman, H., Kim, J., Maltez, J. M., Tsien, R. W., & Pitt, G. S. (2005). CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *The Journal of Cell Biology*, 171(3), 537–547.
- Huke, S., & Bers, D. M. (2008). Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.084>
- Hummel, K. P., Dickie, M. M., & Coleman, D. L. (1966). Diabetes, a New Mutation in the Mouse. *Science*, 153(3740), 1127–1128. <https://doi.org/10.1126/science.153.3740.1127>

- Hunter, D. R., Haworth, R. A., & Southard, J. H. (1976). Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *251*(16), 5069–5077.
- Hunter, Douglas R., & Haworth, R. A. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *195*(2), 453–459. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90371-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90371-0)
- Hurst, S., Hoek, J., & Sheu, S.-S. (2017). Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *49*(1), 27–47. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9672-x>
- In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red 12156792910*. (n.d.). Sigma-Aldrich. Retrieved December 22, 2020, from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/12156792910>
- Ingalls, A. M., Dickie, M. M., & Snell, G. D. (1950a). OBESSE, A NEW MUTATION IN THE HOUSE MOUSE. *Journal of Heredity*, *41*(12), 317–318. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106073>
- Ingalls, A. M., Dickie, M. M., & Snell, G. D. (1950b). OBESSE, A NEW MUTATION IN THE HOUSE MOUSE*. *Journal of Heredity*, *41*(12), 317–318. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106073>
- Irie, T., Sips, P. Y., Kai, S., Kida, K., Ikeda, K., Hirai, S., Moazzami, K., Jiramongkolchai, P., Bloch, D. B., Doulias, P.-T., Armoundas, A. A., Kaneki, M., Ischiropoulos, H., Kranias, E., Bloch, K. D., Stamler, J. S., & Ichinose, F. (2015). S-Nitrosylation of Calcium-Handling Proteins in Cardiac Adrenergic Signaling and Hypertrophy. *Circulation Research*, *117*(9), 793–803. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307157>
- Ishida, A., Kameshita, I., Okuno, S., Kitani, T., & Fujisawa, H. (1995). A Novel Highly Specific and Potent Inhibitor of Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *212*(3), 806–812. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2040>
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S. O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., Taguchi, N., Morinaga, H., Maeda, M., Takayanagi, R., Yokota, S., & Mihara, K. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nature Cell Biology*, *11*(8), 958–966. <https://doi.org/10.1038/ncb1907>
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., & Jap, B. K. (1998). Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex. *Science*, *281*(5373), 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.64>
- Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., Eisenbarth, S. C., Florquin, S., Flavell, R. A., & Leemans, J. C. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(48), 20388–20393.
- Jaswal, J., & Ussher, J. (2009). Myocardial fatty acid utilization as a determinant of cardiac efficiency and function. *Clin. Lipidol.*, *12*.
- Jay, D., Hitomi, H., & Griendling, K. K. (2006). Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology and Medicine*, *40*(2), 183–192.
- Jensen, P. K. (1966). Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles II. Steroid effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, *122*(2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/0926-6593\(66\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0926-6593(66)90058-0)

- Jett, M.-F., Schworer, C. M., Bass, M., & Soderling, T. R. (1987). Identification of membrane-bound calcium, calmodulin-dependent protein kinase II in canine heart. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 255(2), 354–360.
- Ji, Y., Li, B., Reed, T. D., Lorenz, J. N., Kaetzel, M. A., & Dedman, J. R. (2003). Targeted inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac longitudinal sarcoplasmic reticulum results in decreased phospholamban phosphorylation at threonine 17. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 25063–25071.
- Joiner, M. A., Koval, O. M., Li, J., He, B. J., Allamargot, C., Gao, Z., Luczak, E. D., Hall, D. D., Fink, B. D., Chen, B., Yang, J., Moore, S. A., Scholz, T. D., Strack, S., Mohler, P. J., Sivitz, W. I., Song, L.-S., & Anderson, M. E. (2012). CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature*, 491(7423), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature11444>
- Jourdon, P., & Feuvray, D. (1993). Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *The Journal of Physiology*, 470, 411–429. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019866>
- Kane, L. A., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial fission and fusion and their roles in the heart. *Journal of Molecular Medicine*, 88(10), 971–979. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0674-6>
- Kankaanpää, M., Lehto, H.-R., Pärkkä, J. P., Komu, M., Viljanen, A., Ferrannini, E., Knuuti, J., Nuutila, P., Parkkola, R., & Iozzo, P. (2006). Myocardial Triglyceride Content and Epicardial Fat Mass in Human Obesity: Relationship to Left Ventricular Function and Serum Free Fatty Acid Levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(11), 4689–4695. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0584>
- Kaplan, P., Babusikova, E., Lehotsky, J., & Dobrota, D. (2003). Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 248(1–2), 41–47. <https://doi.org/10.1023/a:1024145212616>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kettlewell, S., Most, P., Currie, S., Koch, W. J., & Smith, G. L. (2005). S100A1 increases the gain of excitation-contraction coupling in isolated rabbit ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39(6), 900–910. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.06.018>
- Kiewitz, R., Acklin, C., Schäfer, B. W., Maco, B., Uhrík, B., Wuytack, F., Erne, P., & Heizmann, C. W. (2003). Ca²⁺-dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase2a and phospholamban in the human heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(2), 550–557.
- Kim, H. W., Cho, Y. S., Lee, H. R., Park, S. Y., & Kim, Y.-H. (2001). Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression. *Life Sciences*, 70(4), 367–379. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01483-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01483-7)
- Kim, S., Song, J., Ernst, P., Latimer, M. N., Ha, C.-M., Goh, K. Y., Ma, W., Rajasekaran, N.-S., Zhang, J., & Liu, X. (2020). MitoQ regulates redox-related noncoding RNAs to preserve mitochondrial network integrity in pressure-overload heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 318(3), H682–H695.
- Kinnally, K. W., Zorov, D. B., Antonenko, Y. N., Snyder, S. H., McEnery, M. W., & Tedeschi, H. (1993). Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1374–1378. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1374>

- Kinnally, Kathleen W., Peixoto, P. M., Ryu, S.-Y., & Dejean, L. M. (2011). Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(4), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.013>
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., & Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972), 360–364. <https://doi.org/10.1038/nature02246>
- Kohlhaas, M., Nickel, A. G., & Maack, C. (2017). Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart: Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *The Journal of Physiology*, 595(12), 3753–3763. <https://doi.org/10.1113/JP273609>
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R., & Wallace, D. C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 427(6973), 461–465. <https://doi.org/10.1038/nature02229>
- Kong, H., Jones, P. P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H. J., & Chen, S. R. W. (2008). Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *The Biochemical Journal*, 414(3), 441–452. <https://doi.org/10.1042/BJ20080489>
- König, T., Tröder, S. E., Bakka, K., Korwitz, A., Richter-Dennerlein, R., Lampe, P. A., Patron, M., Mühlmeister, M., Guerrero-Castillo, S., & Brandt, U. (2016). The m-AAA protease associated with neurodegeneration limits MCU activity in mitochondria. *Molecular Cell*, 64(1), 148–162.
- Kranias Evangelia G. & Hajjar Roger J. (2012). Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome. *Circulation Research*, 110(12), 1646–1660. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.259754>
- Kubalova, Z., Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Nishijima, Y., Györke, I., Terentyeva, R., Cuñha, D. N. Q. da, Sridhar, A., Feldman, D. S., Hamlin, R. L., Carnes, C. A., & Györke, S. (2005). Abnormal intrastore calcium signaling in chronic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 14104–14109. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504298102>
- Kumar, S., Prasad, S., & Sitasawad, S. L. (2013). Multiple Antioxidants Improve Cardiac Complications and Inhibit Cardiac Cell Death in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *PLOS ONE*, 8(7), e67009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067009>
- Lacombe, V. A., Viatchenko-Karpinski, S., Terentyev, D., Sridhar, A., Emani, S., Bonagura, J. D., Feldman, D. S., Györke, S., & Carnes, C. A. (2007). Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(5), R1787–R1797. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00059.2007>
- Lai, Y., Nairn, A. C., Gorelick, F., & Greengard, P. (1987). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation of Ca²⁺/calmodulin-independence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), 5710–5714.
- Lang, R. M., Bierig, M., Devereux, R. B., Flachskampf, F. A., Foster, E., Pellikka, P. A., Picard, M. H., Roman, M. J., Seward, J., Shanewise, J. S., Solomon, S. D., Spencer, K. T., Sutton, M. S. J., & Stewart, W. J. (2005). Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography’s Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the

- European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 18(12), 1440–1463. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2005.10.005>
- Leach, F. R., & Webster, J. J. (1986). [6] Commercially available firefly luciferase reagents. In *Methods in Enzymology* (Vol. 133, pp. 51–70). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)33055-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)33055-6)
- Lebeche, D., Davidoff, A. J., & Hajjar, R. J. (2008). Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5(11), 715–724. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio1347>
- Lee, V. K., Hosking, B. M., Holeniewska, J., Kubala, E. C., Lundh von Leithner, P., Gardner, P. J., Foxton, R. H., & Shima, D. T. (2018). BTBR ob/ob mouse model of type 2 diabetes exhibits early loss of retinal function and retinal inflammation followed by late vascular changes. *Diabetologia*, 61(11), 2422–2432. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4696-x>
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H., Reiken, S., Warrier, S., Belevych, A. E., Harvey, R. D., Richter, W., Jin, S.-L. C., Conti, M., & Marks, A. R. (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*, 123(1), 25–35.
- Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2000). Structural model of F1-ATPase and the implications for rotary catalysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1396), 465–471.
- Li, J., Wu, H., Liu, Y., & Yang, L. (2020). High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Experimental Animals*, *advpub*. <https://doi.org/10.1538/expanim.19-0148>
- Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95–99.
- Li, W., Shariat-Madar, Z., Powers, M., Sun, X., Lane, R. D., & Garlid, K. D. (1992). Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 267(25), 17983–17989.
- Lindemann, J. P., Jones, L. R., Hathaway, D. R., Henry, B. G., & Watanabe, A. M. (1983). Beta-Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca²⁺-ATPase activity in guinea pig ventricles. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(1), 464–471.
- Lindemann, J. P., & Watanabe, A. M. (1985). Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 260(7), 4516–4525.
- Little, G. H., Saw, A., Bai, Y., Dow, J., Marjoram, P., Simkhovich, B., Leeka, J., Kedes, L., Kloner, R. A., & Poizat, C. (2009). Critical Role of Nuclear Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase IIδB in Cardiomyocyte Survival in Cardiomyopathy *. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 24857–24868. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003186>
- Lokuta, A. J., Rogers, T. B., Lederer, W. J., & Valdivia, H. H. (1995). Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *The Journal of Physiology*, 487 (Pt 3), 609–622. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020904>
- Lu, S., Liao, Z., Lu, X., Katschinski, D. M., Mercola, M., Chen, J., Heller Brown, J., Molkentin, J. D., Bossuyt, J., & Bers, D. M. (2020). Hyperglycemia Acutely Increases Cytosolic Reactive Oxygen Species via O-linked GlcNAcylation and CaMKII Activation in

- Mouse Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, 126(10), e80–e96. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316288>
- Lu Xiyuan, Ginsburg Kenneth S., Kettlewell Sarah, Bossuyt Julie, Smith Godfrey L., & Bers Donald M. (2013). Measuring Local Gradients of Intramitochondrial [Ca²⁺] in Cardiac Myocytes During Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release. *Circulation Research*, 112(3), 424–431. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300501>
- Lu, Y.-M., Shioda, N., Yamamoto, Y., Han, F., & Fukunaga, K. (2010). Transcriptional upregulation of calcineurin A β by endothelin-1 is partially mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ 3 in rat cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(5), 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.02.004>
- Luo, B., Li, B., Wang, W., Liu, X., Liu, X., Xia, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Zhang, M., & An, F. (2014). Rosuvastatin alleviates diabetic cardiomyopathy by inhibiting NLRP3 inflammasome and MAPK pathways in a type 2 diabetes rat model. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 28(1), 33–43.
- Luo, B., Li, B., Wang, W., Liu, X., Xia, Y., Zhang, C., Zhang, M., Zhang, Y., & An, F. (2014). NLRP3 Gene Silencing Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy in a Type 2 Diabetes Rat Model. *PLOS ONE*, 9(8), e104771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104771>
- Luo, M., Guan, X., Luczak, E. D., Lang, D., Kutschke, W., Gao, Z., Yang, J., Glynn, P., Sossalla, S., Swaminathan, P. D., Weiss, R. M., Yang, B., Rokita, A. G., Maier, L. S., Efimov, I. R., Hund, T. J., & Anderson, M. E. (2013). Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 1262–1274. <https://doi.org/10.1172/JCI65268>
- Maack Christoph, Cortassa Sonia, Aon Miguel A., Ganesan Anand N., Liu Ting, & O'Rourke Brian. (2006). Elevated Cytosolic Na⁺ Decreases Mitochondrial Ca²⁺ Uptake During Excitation-Contraction Coupling and Impairs Energetic Adaptation in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 99(2), 172–182. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000232546.92777.05>
- MacLennan, D. H., & Kranias, E. G. (2003). Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(7), 566–577. <https://doi.org/10.1038/nrm1151>
- Magaña, M. G. (2014). *Causas de mortalidad en la diabetes mellitus tipo 2. 05(Supl Extr 5):1-48.*, 4.
- Maier, L. S., & Bers, D. M. (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: Heartbeat to heartbeat and beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(8), 919–939. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2038>
- Maier, L. S., & Bers, D. M. (2007). Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovascular Research*, 73(4), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.11.005>
- Marengo, J. J., Hidalgo, C., & Bull, R. (1998). Sulfhydryl Oxidation Modifies the Calcium Dependence of Ryanodine-Sensitive Calcium Channels of Excitable Cells. *Biophysical Journal*, 74(3), 1263–1277. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77840-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77840-3)
- Marks, A. R. (2002). Ryanodine receptors, FKBP12, and heart failure. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7, d970-7.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Rémy, R., Xie, Z.-H., Reed, J. C., & Kroemer, G. (1998). The Permeability Transition Pore Complex: A Target for Apoptosis Regulation by Caspases and Bcl-2–related Proteins. *Journal of Experimental Medicine*, 187(8), 1261–1271. <https://doi.org/10.1084/jem.187.8.1261>

- Mattiazzi, A., Bassani, R. A., Escobar, A. L., Palomeque, J., Valverde, C. A., Vila Petroff, M., & Bers, D. M. (2015). Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 308(10), H1177–H1191.
- Mazzocchi, G., Sommese, L., Palomeque, J., Felice, J. I., Di Carlo, M. N., Fainstein, D., Gonzalez, P., Contreras, P., Skapura, D., & McCauley, M. (2016). Phospholamban ablation rescues the enhanced propensity to arrhythmias of mice with CaMKII-constitutive phosphorylation of RyR2 at site S2814. *The Journal of Physiology*, 594(11), 3005–3030.
- McCauley, M. D., & Wehrens, X. H. (2011). Ryanodine receptor phosphorylation, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, and life-threatening ventricular arrhythmias. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 21(2), 48–51.
- McNeill, J. H. (2018). *Experimental models of diabetes*. Routledge.
- Meissner, G. (2004). Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium*, 35(6), 621–628.
- Meyer, T., Hanson, P. I., Stryer, L., & Schulman, H. (1992). Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*, 256(5060), 1199–1202.
- Min, C. K., Yeom, D. R., Lee, K.-E., Kwon, H.-K., Kang, M., Kim, Y.-S., Park, Z. Y., Jeon, H., & Kim, D. H. (2012). Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca²⁺ transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart. *Biochemical Journal*, 447(3), 371–379.
- Mitchell, P. (2011). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(12), 1507–1538. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.09.018>
- Mnatsakanyan, N., & Jonas, E. A. (2020). ATP synthase c-subunit ring as the channel of mitochondrial permeability transition: Regulator of metabolism in development and degeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 144, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.013>
- Montaigne, D., Marechal, X., Coisne, A., Debry, N., Modine, T., Fayad, G., Potelle, C., El Arid, J.-M., Mouton, S., Sebti, Y., Duez, H., Preau, S., Remy-Jouet, I., Zerimech, F., Koussa, M., Richard, V., Nevriere, R., Edme, J.-L., Lefebvre, P., & Staels, B. (2014). Myocardial Contractile Dysfunction Is Associated With Impaired Mitochondrial Function and Dynamics in Type 2 Diabetic but Not in Obese Patients. *Circulation*, 130(7), 554–564. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008476>
- Montes, G. S. (1996). Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International*, 20(1), 15–27. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0004>
- Morciano, G., Giorgi, C., Bonora, M., Punzetti, S., Pavasini, R., Wieckowski, M. R., Campo, G., & Pinton, P. (2015). Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.08.015>
- Morris, T. E., & Sulakhe, P. V. (1997). Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(1–2), 37–47. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00238-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00238-9)
- Mundiña-Weilenmann, C., Vittone, L., Ortale, M., de Cingolani, G. C., & Mattiazzi, A. (1996). Immunodetection of Phosphorylation Sites Gives New Insights into the Mechanisms Underlying Phospholamban Phosphorylation in the Intact Heart. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33561–33567. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33561>

- Murayama, T., Ogawa, H., Kurebayashi, N., Ohno, S., Horie, M., & Sakurai, T. (2018). A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates Ca²⁺ sensitivity. *Communications Biology*, 1(1), 1–12.
- Murphy, M. P. (2008). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Namekawa, J., Takagi, Y., Wakabayashi, K., Nakamura, Y., Watanabe, A., Nagakubo, D., Shirai, M., & Asai, F. (2017). Effects of high-fat diet and fructose-rich diet on obesity, dyslipidemia and hyperglycemia in the WBN/Kob-Leprfa rat, a new model of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(6), 988–991. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0136>
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., Serafini, A., Semenzato, M., Herkenne, S., Hernández-Alvarez, M. I., Zorzano, A., De Stefani, D., Dorn, G. W., & Scorrano, L. (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum–mitochondria tether. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11249–11254. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606786113>
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., & Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14681–14686. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14681>
- Ni, R., Cao, T., Xiong, S., Ma, J., Fan, G.-C., Lacefield, J. C., Lu, Y., Tissier, S. L., & Peng, T. (2016). Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radical Biology and Medicine*, 90, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.013>
- Nickel, A., Kohlhaas, M., & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.03.011>
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448–3459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2013.06.001>
- Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J. A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Krajewski, S., Reed, J. C., & Anversa, P. (1997). Apoptosis in the Failing Human Heart. *New England Journal of Medicine*, 336(16), 1131–1141. <https://doi.org/10.1056/NEJM199704173361603>
- Olkowski, A. A., Wojnarowicz, C., & Laarveld, B. (2020). Pathophysiology and pathological remodelling associated with dilated cardiomyopathy in broiler chickens predisposed to heart pump failure. *Avian Pathology*, 1–12.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *OMS | Diabetes: Perfiles de los países 2016*. WHO; World Health Organization. <http://www.who.int/diabetes/country-profiles/es/>
- Pabst, W., & Gregorova, E. (2007). Characterization of particles and particle systems. *ICT Prague*, 122, 122.
- Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P.-A., Gomez, L., Fauconnier, J., Crola Da Silva, C., Teixeira, G., Mewton, N., Belaidi, E., & Durand, A. (2013). Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation*, 128(14), 1555–1565.
- Pallafacchina, G., Zanin, S., & Rizzuto, R. (2018). Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake. *F1000Research*, 7, 1858. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15723.1>

- Palomeque, J., Rueda, O. V., Sapia, L., Valverde, C. A., Salas, M., Petroff, M. V., & Mattiazzi, A. (2009). Angiotensin II–Induced Oxidative Stress Resets the Ca²⁺ Dependence of Ca²⁺–Calmodulin Protein Kinase II and Promotes a Death Pathway Conserved Across Different Species. *Circulation Research*, *105*(12), 1204–1212. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.204172>
- Pan, X.-R., Li, G., Hu, Y.-H., Wang, J.-X., Yang, W.-Y., An, Z.-X., Hu, Z.-X., Xiao, J.-Z., Cao, H.-B., & Liu, P.-A. (1997). Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care*, *20*(4), 537–544.
- Paolocci, N., Katori, T., Champion, H. C., St John, M. E., Miranda, K. M., Fukuto, J. M., Wink, D. A., & Kass, D. A. (2003). Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO- in failing hearts: Independence from beta-adrenergic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(9), 5537–5542. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937302100>
- Patergnani, S., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Rimessi, A., Duszynski, J., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2011). Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Communication and Signaling*, *9*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-19>
- Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., Vecellio Reane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabò, I., De Stefani, D., & Rizzuto, R. (2014). MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular Cell*, *53*(5), 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.013>
- Patron, M., Sprenger, H.-G., & Langer, T. (2018). M-AAA proteases, mitochondrial calcium homeostasis and neurodegeneration. *Cell Research*, *28*(3), 296–306.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, *122*(6), 927–939.
- Pellegrini, L., & Scorrano, L. (2007). A cut short to death: Parl and Opal in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *14*(7), 1275–1284. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402145>
- Peng, W., Zhang, Y., Zheng, M., Cheng, H., Zhu, W., Cao, C.-M., & Xiao, R.-P. (2010). Cardioprotection by CaMKII- δ B is mediated by phosphorylation of heat shock factor 1 and subsequent expression of inducible heat shock protein 70. *Circulation Research*, *106*(1), 102–110.
- Periasamy, M., & Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle & Nerve*, *35*(4), 430–442. <https://doi.org/10.1002/mus.20745>
- Perocchi, F., Gohil, V. M., Girgis, H. S., Bao, X. R., McCombs, J. E., Palmer, A. E., & Mootha, V. K. (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature*, *467*(7313), 291–296. <https://doi.org/10.1038/nature09358>
- Pezoa, J. (2012). El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) como blanco de estrategias cardioprotectoras en daño por isquemi-reperfusion miocárdica: Rol de los anestésicos inhalatorios. *Revista Chilena de Anestesia*, *41*, 128–134.
- Potenza, D. M., Janicek, R., Fernandez-Tenorio, M., Camors, E., Ramos-Mondragón, R., Valdivia, H. H., & Niggli, E. (2019). Phosphorylation of the ryanodine receptor 2 at serine 2030 is required for a complete β -adrenergic response. *The Journal of General Physiology*, *151*(2), 131–145. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812155>

- Prech, M., Marszałek, A., Schröder, J., Filas, V., Lesiak, M., Jemielity, M., Araszkiwicz, A., & Grajek, S. (2010). Apoptosis as a mechanism for the elimination of cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, *105*(9), 1240–1245.
- Primeau, J. O., Armanious, G. P., Fisher, M. E., & Young, H. S. (2018). The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. In J. R. Harris & E. J. Boekema (Eds.), *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (pp. 229–258). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_8
- Prism—GraphPad. (n.d.). Retrieved January 22, 2021, from <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>
- Qian, J., Vafiadaki, E., Florea, S. M., Singh, V. P., Song, W., Lam, C. K., Wang, Y., Yuan, Q., Pritchard, T. J., Cai, W., Haghghi, K., Rodriguez, P., Wang, H.-S., Sanoudou, D., Fan, G.-C., & Kranias, E. G. (2011). Small heat shock protein 20 interacts with protein phosphatase-1 and enhances sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *Circulation Research*, *108*(12), 1429–1438. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.237644>
- Querejeta Ramón, López Begoña, González Arantxa, Sánchez Eloy, Larman Mariano, Martínez Ubago José L., & Díez Javier. (2004). Increased Collagen Type I Synthesis in Patients With Heart Failure of Hypertensive Origin. *Circulation*, *110*(10), 1263–1268. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000140973.60992.9A>
- Raffaello, A., De Stefani, D., Sabbadin, D., Teardo, E., Merli, G., Picard, A., Checchetto, V., Moro, S., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2013). The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *The EMBO Journal*, *32*(17), 2362–2376. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.157>
- Ramirez, M. T., Zhao, X. L., Schulman, H., & Brown, J. H. (1997). The nuclear deltaB isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(49), 31203–31208. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.31203>
- Rellos, P., Pike, A. C. W., Niesen, F. H., Salah, E., Lee, W. H., von Delft, F., & Knapp, S. (2010). Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biology*, *8*(7), e1000426. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000426>
- Reyes, J. A. O., & Plancarte, A. A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, *27*(1), 9–18.
- Reynolds, E. S. (1963). THE USE OF LEAD CITRATE AT HIGH pH AS AN ELECTRON-OPAQUE STAIN IN ELECTRON MICROSCOPY. *The Journal of Cell Biology*, *17*(1), 208–212.
- Rimessi, A., Giorgi, C., Pinton, P., & Rizzuto, R. (2008). The versatility of mitochondrial calcium signals: From stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1777*(7), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.05.449>
- Rodriguez, J., & Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Development*, *13*(24), 3179–3184.
- Rodriguez, P., Bhogal, M. S., & Colyer, J. (2003). Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(40), 38593–38600.
- Ronti, T., Lupattelli, G., & Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: An update. *Clinical Endocrinology*, *64*(4), 355–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x>

- Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y. Z., Kumral, T., Branwood, A. W., & Grishman, A. (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *American Journal of Cardiology*, *30*(6), 595–602. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(72\)90595-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(72)90595-4)
- Rukavina-Mikusic, I. A., Rey, M., Martinefski, M., Tripodi, V., & Valdez, L. B. (2021). Temporal evolution of cardiac mitochondrial dysfunction in a type 1 diabetes model. Mitochondrial complex I impairment, and H₂O₂ and NO productions as early subcellular events. *Free Radical Biology and Medicine*, *162*, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.033>
- Russo, I., & Frangogiannis, N. G. (2016). Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *90*, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.12.011>
- Sacchetto, R., Turcato, F., Damiani, E., & Margreth, A. (1999). Interaction of triadin with histidine-rich Ca²⁺-binding protein at the triadic junction in skeletal muscle fibers. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, *20*(4), 403–415.
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *157*, 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
- Sahn, D. J., DeMaria, A., Kisslo, J., & Weyman, A. ft. (1978). Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*, *58*(6), 1072–1083.
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, *20*(2). <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Sancak, Y., Markhard, A. L., Kitami, T., Kovács-Bogdán, E., Kamer, K. J., Udeshi, N. D., Carr, S. A., Chaudhuri, D., Clapham, D. E., Li, A. A., Calvo, S. E., Goldberger, O., & Mootha, V. K. (2013). EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6164), 1379–1382. <https://doi.org/10.1126/science.1242993>
- Santo-Domingo, J., & Demaurex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(6), 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.005>
- Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P., & Rojo, M. (2010). Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *21*(6), 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.006>
- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., & Korsmeyer, S. J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: A control point for apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5616), 135–139. <https://doi.org/10.1126/science.1081208>
- Seidlmayer, L. K., Juettner, V. V., Kettlewell, S., Pavlov, E. V., Blatter, L. A., & Dedkova, E. N. (2015). Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia–reperfusion: Contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate. *Cardiovascular Research*, *106*(2), 237–248. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv097>
- Seidlmayer, L. K., Mages, C., Berbner, A., Eder-Negrin, P., Arias-Loza, P. A., Kaspar, M., Song, M., Dorn, G. W., Kohlhaas, M., Frantz, S., Maack, C., Gerull, B., & Dedkova, E. N. (2019). Mitofusin 2 Is Essential for IP₃-Mediated SR/Mitochondria Metabolic

- Feedback in Ventricular Myocytes. *Frontiers in Physiology*, 10, 733. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00733>
- Semeniuk, L. M., Kryski, A. J., & Severson, D. L. (2002). Echocardiographic assessment of cardiac function in diabeticdb/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(3), H976–H982. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00088.2002>
- Sharma, S., Adroque, J. V., Golfman, L., Uray, I., Lemm, J., Youker, K., Noon, G. P., Frazier, O. H., & Taegtmeier, H. (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *The FASEB Journal*, 18(14), 1692–1700. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2263com>
- Shen, E., Li, Y., Li, Y., Shan, L., Zhu, H., Feng, Q., Arnold, J. M. O., & Peng, T. (2009). Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia. *Diabetes*, 58(10), 2386–2395. <https://doi.org/10.2337/db08-0617>
- Shin, D. W., Ma, J., & Kim, D. H. (2000). The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca²⁺ and interacts with triadin. *FEBS Letters*, 486(2), 178–182. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02246-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02246-8)
- Shirpoor, A., Salami, S., Khadem-Ansari, M. H., Ilkhanizadeh, B., Pakdel, F. G., & Khademvatani, K. (2009). Cardioprotective effect of vitamin E: Rescues of diabetes-induced cardiac malfunction, oxidative stress, and apoptosis in rat. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 23(5), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2008.02.009>
- Simmerman, H. K., Collins, J. H., Theibert, J. L., Wegener, A. D., & Jones, L. R. (1986). Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(28), 13333–13341.
- Singh, M. V., Kapoun, A., Higgins, L., Kutschke, W., Thurman, J. M., Zhang, R., Singh, M., Yang, J., Guan, X., & Lowe, J. S. (2009). Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II triggers cell membrane injury by inducing complement factor B gene expression in the mouse heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(4), 986–996.
- Sipido, K. R. (2006). Calcium overload, spontaneous calcium release, and ventricular arrhythmias. *Heart Rhythm*, 3(8), 977–979. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2006.01.013>
- Sivakumaran, V., Stanley, B. A., Tocchetti, C. G., Ballin, J. D., Caceres, V., Zhou, L., Keceli, G., Rainer, P. P., Lee, D. I., Huke, S., Ziolo, M. T., Kranias, E. G., Toscano, J. P., Wilson, G. M., O'Rourke, B., Kass, D. A., Mahaney, J. E., & Paolocci, N. (2013). HNO enhances SERCA2a activity and cardiomyocyte function by promoting redox-dependent phospholamban oligomerization. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(11), 1185–1197. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5057>
- Sommese, L., Valverde, C. A., Blanco, P., Castro, M. C., Rueda, O. V., Kaetzel, M., Dedman, J., Anderson, M. E., Mattiazzi, A., & Palomeque, J. (2016). Ryanodine receptor phosphorylation by CaMKII promotes spontaneous Ca²⁺ release events in a rodent model of early stage diabetes: The arrhythmogenic substrate. *International Journal of Cardiology*, 202, 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.09.022>
- Sorrentino, A., Borghetti, G., Zhou, Y., Cannata, A., Meo, M., Signore, S., Anversa, P., Leri, A., Goichberg, P., Qanud, K., Jacobson, J. T., Hintze, T. H., & Rota, M. (2016). Hyperglycemia induces defective Ca²⁺ homeostasis in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 312(1), H150–H161. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00737.2016>
- Speiser, B., Riess, C. F., & Schaper, J. (1991). The extracellular matrix in human myocardium: Part I: Collagens I, III, IV, and VI. *Cardioscience*, 2(4), 225–232.

- Spurr, A. R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26(1–2), 31–43. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(69\)90033-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(69)90033-1)
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.-A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., & Shi, Y. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410(6824), 112–116.
- Stange, M., Xu, L., Balshaw, D., Yamaguchi, N., & Meissner, G. (2003). Characterization of recombinant skeletal muscle (Ser-2843) and cardiac muscle (Ser-2809) ryanodine receptor phosphorylation mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51693–51702.
- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological Reviews*, 85(3), 1093–1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>
- Steenart, N. A., Ganim, J. R., Di Salvo, J., & Kranias, E. G. (1992). The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 293(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90359-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90359-5)
- Strack, S., Barban, M. A., Wadzinski, B. E., & Colbran, R. J. (1997). Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *Journal of Neurochemistry*, 68(5), 2119–2128.
- Suarez, J., Cividini, F., Scott, B. T., Lehmann, K., Diaz-Juarez, J., Diemer, T., Dai, A., Suarez, J. A., Jain, M., & Dillmann, W. H. (2018). Restoring mitochondrial calcium uniporter expression in diabetic mouse heart improves mitochondrial calcium handling and cardiac function. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(21), 8182–8195. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002066>
- Sumi, M., Kiuchi, K., Ishikawa, T., Ishii, A., Hagiwara, M., Nagatsu, T., & Hidaka, H. (1991). The newly synthesized selective Ca²⁺ calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(3), 968–975.
- Sun, J., Yamaguchi, N., Xu, L., Eu, J. P., Stamler, J. S., & Meissner, G. (2008). Regulation of the Cardiac Muscle Ryanodine Receptor by O₂ Tension and S-Nitrosoglutathione. *Biochemistry*, 47(52), 13985–13990. <https://doi.org/10.1021/bi8012627>
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9), 1163–1167. <https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., & Loeffler, M. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441–446.
- Sutko, J. L., & Airey, J. A. (1996). Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels: Does diversity in form equal diversity in function? *Physiological Reviews*, 76(4), 1027–1071. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.4.1027>
- Suzuki, Y., Demoliere, C., Kitamura, D., Takeshita, H., Deuschle, U., & Watanabe, T. (1997). HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 158(6), 2736–2744.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T., & Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic

- reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *Journal of Cell Biology*, 175(6), 901–911. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608073>
- Szűcs, G., Sója, A., Péter, M., Sárközy, M., Bruszel, B., Siska, A., Földesi, I., Szabó, Z., Janáky, T., Vígh, L., Balogh, G., & Csont, T. (2019). Prediabetes Induced by Fructose-Enriched Diet Influences Cardiac Lipidome and Proteome and Leads to Deterioration of Cardiac Function prior to the Development of Excessive Oxidative Stress and Cell Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2019/3218275>
- Tada, M., Kirchberger, M. A., & Katz, A. M. (1975). Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 250(7), 2640–2647.
- Takehima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., & Hirose, T. (1989). Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, 339(6224), 439–445. <https://doi.org/10.1038/339439a0>
- Timerman, A. P., Onoue, H., Xin, H.-B., Barg, S., Copello, J., Wiederrecht, G., & Fleischer, S. (1996). Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20385–20391.
- Trumpower, B. L. (1990). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(20), 11409–11412.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., & Yoshikawa, S. (1996). The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(5265), 1136–1144. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136>
- Tuomilehto, J., Lindström, J., Eriksson, J. G., Valle, T. T., Hämäläinen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., & Rastas, M. (2001). Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *New England Journal of Medicine*, 344(18), 1343–1350.
- Vais, H., Mallilankaraman, K., Mak, D.-O. D., Hoff, H., Payne, R., Tanis, J. E., & Foskett, J. K. (2016). EMRE Is a Matrix Ca(2+) Sensor that Governs Gatekeeping of the Mitochondrial Ca(2+) Uniporter. *Cell Reports*, 14(3), 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.054>
- Valverde, C. A., Mazzocchi, G., Di Carlo, M. N., Ciocci Pardo, A., Salas, N., Ragone, M. I., Felice, J. I., Cely-Ortiz, A., Consolini, A. E., Portiansky, E., Mosca, S., Kranias, E. G., Wehrens, X. H. T., & Mattiazzi, A. (2019). Ablation of phospholamban rescues reperfusion arrhythmias but exacerbates myocardium infarction in hearts with Ca²⁺/calmodulin kinase II constitutive phosphorylation of ryanodine receptors. *Cardiovascular Research*, 115(3), 556–569. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy213>
- van Heerebeek, L., Hamdani, N., Handoko, M. L., Falcao-Pires, I., Musters, R. J., Kupreishvili, K., Ijsselmuiden, A. J. J., Schalkwijk, C. G., Bronzwaer, J. G. F., Diamant, M., Borbély, A., van der Velden, J., Stienen, G. J. M., Laarman, G. J., Niessen, H. W. M., & Paulus, W. J. (2008). Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: Importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*, 117(1), 43–51. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728550>
- Van Oort, R. J., McCauley, M. D., Dixit, S. S., Pereira, L., Yang, Y., Respress, J. L., Wang, Q., De Almeida, A. C., Skapura, D. G., & Anderson, M. E. (2010). Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-

- threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation*, 122(25), 2669–2679.
- Van Petegem, F. (2015). Ryanodine Receptors: Allosteric Ion Channel Giants. *Journal of Molecular Biology*, 427(1), 31–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.004>
- Varga, I., Galfiova, P., Gazova, A., Barczy, T., Polak, S., Danisovic, L., Hulman, M., & Kyselovic, J. (2018). The end-stage failing human myocardium—Where changes in ultrastructure of human cardiac muscle cells do not appear to dictate clinical outcomes. *Medical Hypotheses*, 110, 105–109.
- Varga, Z. V., Gircz, Z., Liaudet, L., Haskó, G., Ferdinandy, P., & Pacher, P. (2015). Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(2), 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.030>
- Varro, A., Negretti, N., Hester, S. B., & Eisner, D. A. (1993). An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. *Pflügers Archiv*, 423(1), 158–160. <https://doi.org/10.1007/BF00374975>
- Vasiliadis, I., Kolovou, G., Mavrogeni, S., Nair, D. R., & Mikhailidis, D. P. (2014). Sudden cardiac death and diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 28(4), 573–579. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.02.003>
- Velez Rueda, J. O., Palomeque, J., & Mattiazzi, A. (2012). Early apoptosis in different models of cardiac hypertrophy induced by high renin-angiotensin system activity involves CaMKII. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 112(12), 2110–2120. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01383.2011>
- Vila-Petroff, M., Salas, M. A., Said, M., Valverde, C. A., Sapia, L., Portiansky, E., Hajjar, R. J., Kranias, E. G., Mundiña-Weilenmann, C., & Mattiazzi, A. (2007). CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 73(4), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.12.003>
- Völkers, M., Loughrey, C. M., MacQuaide, N., Remppis, A., DeGeorge Jr, B. R., Wegner, F. v, Friedrich, O., Fink, R. H., Koch, W. J., & Smith, G. L. (2007). S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium*, 41(2), 135–143.
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C. L., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S. K. G., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J. H., Bers, D. M., & Maier, L. S. (2006). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3127–3138. <https://doi.org/10.1172/JCI26620>
- Walraven, H. S. V., Strotmann, H., Schwarz, O., & Rumberg, B. (1996). The H⁺/ATP coupling ratio of the ATP synthase from thiol-modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four. *FEBS Letters*, 379(3), 309–313. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01536-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01536-1)
- Wang, S. Y., Zhu, S., Wu, J., Zhang, M., Xu, Y., Xu, W., Cui, J., Yu, B., Cao, W., & Liu, J. (2020). Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *Journal of Molecular Medicine*, 98(2), 245–261. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01861-2>
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 15(22), 2922–2933.

- Wang, Xuejun, & Robbins, J. (2014). Proteasomal and Lysosomal Protein Degradation and Heart Disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 0, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.006>
- Weber, C. R., Piacentino III, V., Houser, S. R., & Bers, D. M. (2003). Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure. *Circulation*, 108(18), 2224–2229.
- Webmaster, I. S. C. (2020). Transient Analysis Features. *IonOptix*. <https://www.ionoptix.com/resource/transient-analysis-features/>
- Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2004). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation Research*, 94(6), e61–e70.
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S., Vest, J. A., Wronska, A., & Marks, A. R. (2006). Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: A critical mediator of heart failure progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 511–518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510113103>
- Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S. M., Shirani, J., Armstrong, R. C., & Kitsis, R. N. (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1497–1504. <https://doi.org/10.1172/JCI200317664>
- Whelan, R. S., Kaplinskiy, V., & Kitsis, R. N. (2010). Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 19–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163111>
- Willeford, A., Suetomi, T., Nickle, A., Hoffman, H. M., Miyamoto, S., & Brown, J. H. (2018). CaMKII δ -mediated inflammatory gene expression and inflammasome activation in cardiomyocytes initiate inflammation and induce fibrosis. *JCI Insight*, 3(12).
- Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., & Jones, L. R. (1991). Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 11144–11152.
- World Health Organization. (2020). *Diabetes*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Wu, S., Lu, Q., Ding, Y., Wu, Y., Qiu, Y., Wang, P., Mao, X., Huang, K., Xie, Z., & Zou, M.-H. (2019). Hyperglycemia-Driven Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase α 2 Induces Diabetic Cardiomyopathy by Promoting Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes In Vivo. *Circulation*, 139(16), 1913–1936. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033552>
- Wu, W., Liu, X., & Han, L. (2019). Apoptosis of cardiomyocytes in diabetic cardiomyopathy involves overexpression of glycogen synthase kinase-3 β . *Bioscience Reports*, 39(BSR20171307). <https://doi.org/10.1042/BSR20171307>
- Wüst, R. C., Helmes, M., Martin, J. L., van der Wardt, T. J., Musters, R. J., van der Velden, J., & Stienen, G. J. (2017). Rapid frequency-dependent changes in free mitochondrial calcium concentration in rat cardiac myocytes. *The Journal of Physiology*, 595(6), 2001–2019.
- Xiao, B., Jiang, M. T., Zhao, M., Yang, D., Sutherland, C., Lai, F. A., Walsh, M. P., Warltier, D. C., Cheng, H., & Chen, S. R. W. (2005). Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circulation Research*, 96(8), 847–855. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000163276.26083.e8>
- Xiao, B., Zhong, G., Obayashi, M., Yang, D., Chen, K., Walsh, M. P., Shimoni, Y., Cheng, H., Ter Keurs, H., & Chen, S. (2006). Ser-2030, but not Ser-2808, is the major

- phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon β -adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochemical Journal*, 396(1), 7–16.
- Xiao, J., Tian, X., Jones, P. P., Bolstad, J., Kong, H., Wang, R., Zhang, L., Duff, H. J., Gillis, A. M., & Fleischer, S. (2007). Removal of FKBP12.6 does not alter the conductance and activation of the cardiac ryanodine receptor or the susceptibility to stress-induced ventricular arrhythmias. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 34828–34838.
- Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G., & Stamler, J. S. (1998). Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation. *Science*, 279(5348), 234–237. <https://doi.org/10.1126/science.279.5348.234>
- Xu, S., Wang, P., Zhang, H., Gong, G., Gutierrez Cortes, N., Zhu, W., Yoon, Y., Tian, R., & Wang, W. (2016). CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic β -AR stimulation. *Nature Communications*, 7(1), 13189. <https://doi.org/10.1038/ncomms13189>
- Yan, Y., Liu, J., Wei, C., Li, K., Xie, W., Wang, Y., & Cheng, H. (2008). Bidirectional regulation of Ca^{2+} sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, 77(2), 432–441. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm047>
- Yanagiya, N., Usuda, N., Hayashi, K., & Nagata, T. (1994). Ultrastructural changes in myocardial and endothelial cells in the microvasculature of the rat heart after global ischemia. *Medical Electron Microscopy*, 27(2), 73–79.
- Yang, D., Zhu, W.-Z., Xiao, B., Brochet, D. X. P., Chen, S. R. W., Lakatta, E. G., Xiao, R.-P., & Cheng, H. (2007). Ca^{2+} /calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of ryanodine receptors suppresses Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves in cardiac myocytes. *Circulation Research*, 100(3), 399–407. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000258022.13090.55>
- Yankovskaya, V. (2003). Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science*, 299(5607), 700–704. <https://doi.org/10.1126/science.1079605>
- Yaras, N., Ugur, M., Ozdemir, S., Gurdal, H., Purali, N., Lacampagne, A., Vassort, G., & Turan, B. (2005). Effects of Diabetes on Ryanodine Receptor Ca^{2+} Release Channel (RyR2) and Ca^{2+} Homeostasis in Rat Heart. *Diabetes*, 54(11), 3082–3088. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3082>
- Yki-Järvinen, H. (2002). Ectopic fat accumulation: An important cause of insulin resistance in humans. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(Suppl 42), 39–45.
- Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J., & McNiven, M. A. (2003). The Mitochondrial Protein hFis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-Like Protein DLP1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(15), 5409–5420. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.15.5409-5420.2003>
- Yu, T., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2653–2658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511154103>
- Zeng, H., Vaka, V. R., He, X., Booz, G. W., & Chen, J.-X. (2015). High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction: Assessment of the role played by SIRT3 loss. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(8), 1847–1856. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12556>
- Zhang, J., Zhang, M., Yang, Z., Huang, S., Wu, X., Cao, L., Wang, X., Li, Q., Li, N., & Gao, F. (2020). PDCD4 deficiency ameliorates left ventricular remodeling and insulin

- resistance in a rat model of type 2 diabetic cardiomyopathy. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-001081>
- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M., & Jones, L. R. (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 272(37), 23389–23397.
- Zhang, R., Khoo, M. S. C., Wu, Y., Yang, Y., Grueter, C. E., Ni, G., Price, E. E., Thiel, W., Guatimosim, S., Song, L.-S., Madu, E. C., Shah, A. N., Vishnivetskaya, T. A., Atkinson, J. B., Gurevich, V. V., Salama, G., Lederer, W. J., Colbran, R. J., & Anderson, M. E. (2005). Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nature Medicine*, 11(4), 409–417. <https://doi.org/10.1038/nm1215>
- Zhao, T., Huang, X., Han, L., Wang, X., Cheng, H., Zhao, Y., Chen, Q., Chen, J., Cheng, H., Xiao, R., & Zheng, M. (2012). Central Role of Mitofusin 2 in Autophagosome-Lysosome Fusion in Cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23615–23625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.379164>
- Zhu, W., Woo, A. Y.-H., Yang, D., Cheng, H., Crow, M. T., & Xiao, R.-P. (2007). Activation of CaMKII_{δc} Is a Common Intermediate of Diverse Death Stimuli-induced Heart Muscle Cell Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10833–10839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611507200>
- Zhu, W.-Z., Wang, S.-Q., Chakir, K., Yang, D., Zhang, T., Brown, J. H., Devic, E., Kobilka, B. K., Cheng, H., & Xiao, R.-P. (2003). Linkage of β 1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 617–625.
- Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L.-O., Zweier, J. L., & Sollott, S. J. (2000). Reactive Oxygen Species (Ros-Induced) Ros Release A New Phenomenon Accompanying Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Myocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1001–1014. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1001>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. (1999). An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11549–11556.
- Zucchi, R., & Ronca-Testoni, S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: Modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacological Reviews*, 49(1), 1–52.
- Zucker, L. M. (1965). Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 131(1), 447–458. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb34810.x>