

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA DEL CARDIOMIOCITO POR
LIGANDOS FARMACOLOGICOS DEL RECEPTOR ACTIVADO POR
PROLIFERADORES PEROXISOMALES GAMA (PPAR γ)**

Tesis entregada a la Universidad de Chile para optar al grado de

Doctor en Farmacología

por

RODRIGO ANDRÉS VALENZUELA BASSI

Directores de Tesis

Dr. Miguel Bronfman Aguiló

Dr. Sergio Lavandero González

Santiago, Chile

2011

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCION.....	7
1.1. Tiazolidinedionas y riesgo cardiovascular	7
1.2. Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPAR)	8
1.3. Metabolismo cardiaco	12
1.4. Papel fisiopatológico de los PPARs en el corazón.....	13
1.5. El remodelado cardiaco y la muerte del cardiomiocito.....	14
1.6. Apoptosis en el cardiomiocito.....	16
1.6.1.Vía extrínseca o mediada a través de receptores de muerte.....	17
1.6.2.Vía intrínseca o mitocondrial	17
1.7. Autofagia.....	19
1.7.1.Tipos de autofagia.....	19
1.7.2.Formación del autofagosoma	20
1.7.3.Vías transduccionales que regulan la autofagia	22
1.7.4.Autofagia como muerte celular programada.....	24
1.8. Autofagia y patologías cardiovasculares	25
1.9. Autofagia y PPAR	27
2. HIPOTESIS.....	29
3. OBJETIVOS GENERALES	29
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1. Materiales	30
5.2. Modelo animal.....	31
5.3. Diseño experimentales.....	31

5.3.1. Modelo de autofagia.....	31
5.3.2. Modelo de estrés hiperosmótico.....	32
5.4. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de ratas.....	33
5.5. Preparación de extractos de proteínas totales.....	34
5.6. Electroforesis de geles de poliacrilamida.....	34
5.7. Electrotransferencia.....	35
5.8. Western blot.....	35
5.9. Transfección plasmidial y actividad luciferasa.....	36
5.10. Ensayos de viabilidad celular.....	37
5.11. Tratamiento adenoviral.....	37
5.12. Cuantificación de autofagia.....	37
5.13. Microscopia de fluorescencia e inmunofluorescencia.....	38
5.14. Evaluación de la apoptosis mediante citometría de flujo.....	39
5.15. Evaluación de la necrosis mediante citometría.....	40
5.16. Análisis del potencial mitocondrial.....	41
5.16.1. Determinación de la caída del potencial mitocondrial mediante citometría.....	41
5.16.2. Determinación de la caída del potencial mitocondrial mediante microscopía confocal.....	42
5.17. Determinación del contenido intracelular de ATP.....	43
5.18. Estrés nutricional.....	43
5.19. Representación de datos y análisis estadístico.....	44
6. RESULTADOS.....	47
6.1. Presencia de PPAR γ en el cardiomiocito.....	47
6.2. Actividad de PPAR γ en el cardiomiocito.....	48
6.3. Efecto de rosiglitazona y gemfibrozilo en la viabilidad del cardiomiocito..	48
6.4. Formación de vesículas autofágicas en cardiomiocitos estimulados con rosiglitazona.....	52
6.5. La formación de vesículas autofágicas inducida por rosiglitazona es un efecto rápido en el cardiomiocito.....	58
6.6. Degradación de LC3-GFP en cardiomiocitos estimulados con rosiglitazona.....	60

6.7.	Efecto de la inhibición de la autofagia en la viabilidad del cardiomiocito tratado con rosiglitazona.....	62
6.8.	Producción de ATP en cardiomiocitos estimulados con rosiglitazona.....	62
6.9.	Efecto de rosiglitazona en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés nutricional (privación de nutrientes).....	64
6.10.	Efecto de la privación de nutrientes sobre la actividad de PPAR γ	64
6.11.	Efecto de rosiglitazona en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.....	68
6.12.	Efecto del estrés hiperosmótico sobre la actividad de PPAR γ	70
6.13.	Efecto de rosiglitazona sobre la viabilidad del cardiomiocito sometido a isquemia y reperfusión	72
7.	DISCUSION.....	73
7.1.	Presencia y actividad de PPAR γ en el cardiomiocito	74
7.2.	Rosiglitazona y autofagia del cardiomiocito.....	75
7.3.	Rosiglitazona y las vías de transducción de la autofagia	77
7.4.	Rosiglitazona y viabilidad del cardiomiocito.....	79
7.5.	Efecto de rosiglitazona en la viabilidad, apoptosis y necrosis del cardiomiocito sometido a estrés hiperosmótico e isquemia/reperfusión simulada.....	80
8.	CONCLUSIONES	83
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	84
10.	ANEXO	97
10.1.	Efecto de rosiglitazona en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.....	97
10.2.	Efecto del pretratamiento con gemfibrozilo sobre la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico	97
10.3.	Rosiglitazona y Gemfibrozilo no protegen al cardiomiocito de la apoptosis inducida por sorbitol	100
10.4.	Efecto de Rosiglitazona en la necrosis del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico	104
10.5.	Efecto de la isquemia/reperfusión simulada en la viabilidad del cardiomiocito.....	105

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura y dominios funcionales de los PPARs.....	9
Figura 2: Mecanismo de acción de los PPAR.....	9
Figura 3: Ligandos farmacológicos de PPAR α (fibratos) y PPAR γ (tiazolidinedionas).....	11
Figura 4: Diferencias morfológicas y celulares entre apoptosis, necrosis y autofagia.....	16
Figura 5. Etapas del proceso de formación del autolisosoma.	22
Figura 6: Cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas como modelo experimental.	33
Figura 7. Esquema representativo del estado del estado del DNA en células sanas y apoptóticas.	39
Figura 8. Representación del comportamiento esperado del yoduro de propidio frente a células con diferentes grados de permeabilidad de membrana y su correspondiente gráfica proveniente de la citometría.....	41
Figura 9. Esquema representativo de la cuantificación de la caída del potencial mitocondrial mediante citometría de flujo.	42
Figura 10: Expresión de PPAR γ en el cardiomiocito.....	47
Figura 11. Actividad de PPAR γ y PPAR α en el cardiomiocito.....	49
Figura 12: Efecto de rosiglitazona sobre la viabilidad del cardiomiocito.	50
Figura 13: Efecto de gemfibrozilo sobre la viabilidad del cardiomiocito.	51
Figura 14: Inducción y formación de la vacuola autofágica durante la privación de nutrientes.....	54
Figura 15. Estandarización del método. Formación de vesículas autofágicas en cardiomiocitos transducidos con el adenovirus LC3-GFP y privados de suero. .	55
Figura 16: Rosiglitazona induce la formación de vesículas autofágicas en el cardiomiocito.	56
Figura 17: Procesamiento de LC3 endógeno por rosiglitazona en cardiomiocitos.....	57
Figura 18: Evaluación temporal de la inducción de autofagia en cardiomiocitos.....	59
Figura 19: Degradación de LC3-GFP en los cardiomiocitos.....	61
Figura 20: Efecto de 3-MA en la viabilidad del cardiomiocito.....	63
Figura 21: Producción de ATP en cardiomiocitos tratados con rosiglitazona o rapamicina.	63
Figura 22: Efecto del estrés nutricional por privación de suero, glucosa y aminoácidos en la viabilidad del cardiomiocito.	65

Figura 23: Efecto de rosiglitazona sobre el estrés nutricional por privación de suero, glucosa y aminoácidos en la viabilidad del cardiomiocito.	66
Figura 24: Efecto del estrés nutricional por privación de nutrientes en la actividad de PPAR γ en el cardiomiocito.	67
Figura 25: Efecto del pretratamiento con rosiglitazona sobre la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.	69
Figura 26: Actividad de PPAR γ en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico ...	70
Figura 27: Efecto de rosiglitazona sobre la viabilidad del cardiomiocito sometido a isquemia y reperfusión.	72

Figuras Anexo

Figura Anexo 1: Efecto del pretratamiento con rosiglitazona sobre la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.	98
Figura Anexo 2: Efecto del gemfibrozilo sobre la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.	99
Figura Anexo 3: El pretratamiento con rosiglitazona no previene la fragmentación del DNA inducida por sorbitol en cardiomiocitos.	101
Figura Anexo 4: Gemfibrozilo no previene la fragmentación del DNA inducida por sorbitol en el cardiomiocito.	102
Figura Anexo 5: Efecto de rosiglitazona sobre el decaimiento del potencial de membrana mitocondrial inducido por sorbitol.....	103
Figura Anexo 6: Efecto de rosiglitazona sobre la necrosis del cardiomiocito inducida por sorbitol.....	104
Figura Anexo 7: Efecto de la Isquemia y reperfusión simulada sobre la viabilidad de los cardiomiocitos.....	106

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos, dilución y condiciones de bloqueo utilizados en los western blots. ...	35
Tabla 2. Composición medio RPMI 1640 para privación de suero/glucosa (Gibco catálogo número 11879)	45
Tabla 3. Composición medio EBSS para privación de suero/aminoácidos (SIGMA catálogo número E2888).....	46

ABREVIATURAS

3-MA	: 3-metiladenina
A	: Amperes
Ad-LC3-GFP	: Adenovirus LC3 acoplado a proteína fluorescente verde
ADN	: Acido desoxirribonucleico
ADP	: Adenosin difosfato
AIF	: Factor inductor de apoptosis
AMP	: Adenosin monofosfato
AMPK	: Proteína kinasa activada por AMP
ANF	: Factor natriurético auricular
APS	: Persulfato de amonio
Atg	: Genes relacionados a autofagia
ATP	: Adenosina trifosfato
β -MHC	: Cadena pesada de beta-miosina
BSA	: Albúmina de suero de bovino
BrdU	: Bromodeoxiuridina
BSA	: Albúmina de suero de bovino
CaMK	: Calmodulina kinasa
CREB	: Factor de transcripción activado por AMP cíclico
DME	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DTT	: Ditiotreitól

EDTA	: Acido etilendiaminotetracético
EGTA	: Acido etilenglicol-bis-(aminoetil éter)-N,N,N',N'-2 etanosulfónico
EGFR	: Receptor de EGF
EN-A	: Estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos
EN-G	: Estrés nutricional por privación de suero/glucosa
ERK	: Proteína kinasa regulada extracelularmente
FBS	: Suero fetal de bovino
FCS	: Suero fetal de ternera
Gem	: Gemfibrozilo
GFP	: Proteína fluorescente verde
GH	: Hormona del crecimiento
Glut-4	: Transportador de glucosa tipo-4
h	: Horas
HEPES	: Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
IGF-1	: Factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1
JNK	: Kinasa N-terminal de <i>c-Jun</i>
kDa	: Kilo Dalton
LC3	: Proteína asociada a microtúbulos 1, cadena liviana 3 o Atg8
LC3-GFP	: LC3 unido a GFP
M	: Molaridad
M199	: Medio 199
MAPK	: Proteína kinasa activada por mitógenos

MC	: Medio completo
MEK	: Proteína MAP kinasa kinasa (MAPKK)
MPTP	: Potencial del poro de transición mitocondrial
MRI	: Imagen por resonancia magnética
mTOR	: Proteína blanco de rapamicina
MTT	: Sal de tetrazolium
min	: Minuto
mg	: Miligramo
mL	: Mililitro
mm	: Milímetro
mM	: Milimolar
mOsm	: Miliosmolar
MOI	: Multiplicidad de infección
NaCl	: Cloruro de sodio
NADH	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADPH	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
nM	: Nanomolar
nm	: Nanómetro
O ₂	: Oxígeno
PBS	: Tampón fosfato salino
P _i	: Fosfoinositol
PI	: Ioduro de propidio

PI3-K	: Fosfatidilinositol 3-kinasa
PFK-2	: Fosfofructokinasa 2
PMSF	: Fenilmetilsulfonil-fluoruro
PKB	: Proteína kinasa B o Akt
PKC	: Proteína kinasa C
PPAR	: Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PTEN	: Fosfatasa PTEN
p/v	: Porcentaje peso-volumen
ROS	: Especies reactivas derivadas del oxígeno
Rapa	: Rapamicina
r.p.m	: Revoluciones por minuto
Rosi	: Rosiglitazona
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Electroforesis en geel de poliacrilamida desnaturante
SEM	: Error estándar de la media
TBE	: Tris-Borato-EDTA
TBS	: Tampón tris salino
TCA	: Acido tricloroacético
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamina
TMR	: Tetrametilrodamina

TNF- α	: Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TSC1	: Proteína 1 de la esclerosis tuberosa
TSC2	: Proteína 2 de la esclerosis tuberosa
TZD	: Tiazolidinedionas
V	: Volt
μg	: Microgramo
μL	: Microlitro
μm	: Micrómetro
μM	: Micromolar

REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN EL CARDIOMIOCITO POR LIGANDOS FARMACOLOGICOS DEL RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES GAMA (PPAR γ)

RESUMEN

Diversos estudios clínicos han revelado que las tiazolidinedionas, fármacos para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 y resistencia a insulina, podrían reducir la morbimortalidad cardiovascular. Su mecanismo de acción es a través de la activación de los Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPARs), los cuales son factores transcripcionales activados por ligandos. En el sistema cardiovascular, los PPARs se expresan de forma variable y juegan un importante papel en la regulación del metabolismo energético y en la respuesta inflamatoria. Durante diversos estados patológicos como por ejemplo en el infarto al miocardio, el tratamiento con tiazolidinedionas ha mostrado efectos cardioprotectores ya que reducen la hipertrofia y el área infartada y atenúan la respuesta inflamatoria cardíaca. Estos antecedentes sugieren un importante papel de PPAR γ durante el remodelado cardíaco, proceso fisiopatológico que consiste en un cambio estructural y funcional del tejido, caracterizado por fibrosis, hipertrofia y pérdida progresiva de los cardiomiocitos.

Se ha sugerido que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular en el corazón pero últimamente se ha avanzado en los estudios de la participación de la autofagia o “muerte programada de tipo II”. Sin embargo, la autofagia se describió inicialmente como un proceso fisiológico clave para la supervivencia celular durante la privación de aminoácidos, diferenciación celular y desarrollo. Consiste en un proceso dinámico y programado que procede con el secuestro de proteínas citoplasmáticas y organelos enteros dentro de vacuolas de doble membrana, que posteriormente se fusionan con los lisosomas formando los autolisosomas. Todos estos elementos capturados en las vacuolas son degradados por proteasas lisosomales y removidos de la célula por exocitosis. Evidencias recientes han

mostrado que los agonistas de PPAR γ podrían inducir la autofagia en algunas líneas celulares. Sin embargo, aún no queda claro si la autofagia es realmente un proceso de muerte o un mecanismo de sobrevida celular. Dado que prácticamente se desconoce si la activación de PPAR γ regula la autofagia cardiaca, en esta tesis se postuló como hipótesis que “El agonista farmacológico de PPAR γ rosiglitazona induce la autofagia del cardiomiocito, protegiéndolo de la muerte”.

Los objetivos específicos propuestos fueron:

- Estudiar *in vitro* el efecto de agonistas farmacológicos de PPAR α y/o PPAR γ en la viabilidad del cardiomiocito de rata.
- Determinar si rosiglitazona induce autofagia en el cardiomiocito y si ésta se relaciona con sobrevida celular.
- Investigar si la estimulación con rosiglitazona afecta la viabilidad de cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional, estrés hiperosmótico o a isquemia/reperfusión simulada.

El modelo experimental utilizado fue cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas tratados con rosiglitazona en un rango creciente de concentraciones y de tiempo. La autofagia se evaluó mediante procesamiento de la proteína LC3 endógena, cambio en la distribución y degradación de la proteína GFP-LC3 en cardiomiocitos transducidos con el adenovirus GFP-LC3.

Los resultados mostraron que PPAR γ está presente en cardiomiocitos de ratas y que es transcripcionalmente activo, lo cual se demostró mediante un plasmidio reportero que contiene el elemento de respuesta para este factor transcripcional. Además, rosiglitazona estimuló temprana y progresivamente la autofagia en los cultivos primarios de cardiomiocitos, determinada por el procesamiento de la proteína endógena LC3-I, efecto similar al observado en respuesta al tratamiento con rapamicina. Rosiglitazona también incrementó la distribución punteada de LC3-GFP, sin embargo

no disminuyó la fluorescencia de la proteína LC3-GFP en los cardiomiocitos transducidos con el adenovirus LC3-GFP. Por otra parte, rosiglitazona no modificó de forma significativa los niveles intracelulares de ATP y ni afectó la viabilidad basal del cardiomiocito. El tratamiento con gemfibrozilo, tampoco modificó su viabilidad.

Para determinar si la inducción de autofagia tiene un efecto en la viabilidad del cardiomiocito, los cultivos celulares se expusieron a estrés mecánico por hiperosmolaridad y se midió la viabilidad. El estrés hiperosmótico indujo de manera rápida y potente la muerte de las células cardiacas. Sin embargo, rosiglitazona y gemfibrozilo no previnieron este efecto. La muerte de las células cardiacas inducida por el estrés hiperosmótico es mediante apoptosis, lo que se demostró la evaluación por citometría de flujo de la subpoblación G1 en células permeabilizadas y tratadas con yoduro de propidio y determinación de potencial mitocondrial. Rosiglitazona y gemfibrozilo no previnieron la apoptosis del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico. Rosiglitazona tampoco bloqueó la muerte celular inducida por isquemia y reperfusión simulada.

Finalmente, los resultados obtenidos con el desarrollo de esta tesis permiten concluir que rosiglitazona induce la autofagia del cardiomiocito pero que ésta es insuficiente para modificar la viabilidad celular.

REGULATION OF CARDIOMYOCYTE AUTOPHAGY BY PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR GAMMA (PPAR γ) LIGANDS

ABSTRACT

Clinical studies showed that thiazolidinediones, drugs used for type 2 diabetes and insulin resistance treatment, can reduce cardiovascular morbidity and mortality. These compounds are highly specific ligands of peroxisome proliferator-activator receptor gamma (PPAR γ), a nuclear hormone receptor superfamily member. PPARs are variably expressed in the cardiovascular system and play an important role in both energetic metabolism regulation and inflammation response. In myocardial infarct, treatment with thiazolidinediones has cardioprotective effects reducing cardiac hypertrophy, infarcted area and inflammatory response. These data suggest an important role of PPAR γ during cardiac remodeling. Remodeling is a physiopathological alteration in heart structure and function characterized by cardiomyocytes fibrosis, hypertrophy and death.

Apoptosis has been described as the main cardiac cell death mechanism. However, recent studies have also described the participation of autophagy, also known as type II programmed cell death. Autophagy was first described as an adaptive physiological process during amino acids starvation. It has also been described its participation in cellular differentiation and development. Autophagy consists in the sequestration of cytoplasm portions and organelles within double membrane vesicles, named autophagosomes. These vesicles were subsequently fused with lysosomes forming the autophagosomes. All elements captured in these vesicles are degraded by lysosomal proteases and removed by exocytosis. Recent evidence has shown that PPAR γ agonists could induce autophagy in some cell lines. However, it is not clear whether autophagy is a mechanism for cell survival or death. Based on these antecedents we postulated the following hypothesis: "The pharmacological PPAR γ agonist, rosiglitazone, induces cardiomyocyte autophagy protecting them from cell death".

The specific aims were:

- To study *in vitro* the effects of PPAR α and PPAR γ pharmacological agonists on neonatal rat cardiomyocytes.
- To determine whether rosiglitazone induces autophagy in cardiomyocyte and whether this process is related with cell viability.
- To investigate if the stimulation with rosiglitazone affects cardiomyocyte viability when exposed to nutritional stress, hyperosmotic stress and simulated ischemia/reperfusion.

The experimental models were primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes treated with rosiglitazone at different concentrations and times. Autophagy was evaluated by endogenous LC3-I processing, and by change in adenoviral expressing GFP-LC3 distribution and degradation.

Results showed that PPAR γ is expressed and is transcriptionally active in neonatal rat cardiomyocytes as determined by western blot and activity of PPAR reporter plasmid. Furthermore, rosiglitazone stimulated early and progressively cardiac autophagy as determined by endogenous LC3-I processing. This effect was similar to that induced by rapamycin. Rosiglitazone also increased the GFP-LC3 punctuated pattern, but without decreasing GFP-LC3 fluorescence. On the other hand, rosiglitazone neither affects ATP levels nor viability of cardiomyocytes. Gemfibrozil treatment, also did not affect cardiomyocyte viability.

To determine whether autophagy affects cardiomyocyte viability, cultured cells were exposed to hyperosmotic stress in the presence or absence of rosiglitazone or gemfibrozil, and viability was measured. Hyperosmotic stress induced a rapid decrease in cardiomyocyte viability. Cardiomyocyte death was also achieved by

simulated ischemia/reperfusion. Neither rosiglitazone nor gemfibrozil prevented cardiomyocyte death induced by both procedures. Hyperosmotic stress-induced cell death was characterized as apoptosis, as determined by mitochondrial potential decay and DNA fragmentation visualized by sub G1 population in propidium iodide-treated cells followed flow cytometry. Both rosiglitazone and gemfibrozil did not prevent the hyperosmotic stress-induced apoptosis.

Finally, these results allow us to conclude that rosiglitazone induces cardiomyocyte autophagy but this process does not affect cardiomyocyte viability.

1. INTRODUCCION

Hoy en día los desórdenes metabólicos como la Diabetes Mellitus tipo 2, obesidad y síndrome metabólico son importantes factores de riesgo cardiovascular. Las patologías cardiovasculares son la principal causa de morbi-mortalidad en estos pacientes. La resistencia a insulina es común en estos desordenes metabólicos y podría ser uno de sus factores etiológicos. La resistencia a insulina se asocia a una alteración del metabolismo de la glucosa, obesidad abdominal, dislipemia e hipertensión arterial, y contribuye a la aparición de enfermedades cardiovasculares^{1,2}.

1.1. Tiazolidinedionas y riesgo cardiovascular

Las tiazolidinedionas (TZD) o glitazonas, entre las que se encuentran rosiglitazona, pioglitazona y ciglitazona, son una nueva clase de fármacos antidiabéticos orales que ejercen efectos directos sobre el mecanismo de la resistencia de insulina. Estudios clínicos han revelado que las TZD disminuyen las concentraciones circulantes de glucosa, ácidos grasos e insulina tanto en condiciones de ayuno como en estados postprandiales³⁻⁶. Estos hallazgos se han observado tanto en sujetos controles como en pacientes diabéticos tipo 2, donde incrementan la incorporación de glucosa dependiente de insulina en los tejidos periféricos, hepático y adiposo³⁻⁶. Por esta razón estos fármacos se conocen como “sensibilizadores de insulina”. Además, las TZD tienen el potencial de mejorar otros componentes de la resistencia a insulina, como las dislipidemias (aumentando las concentraciones de HDL y disminuyendo las de triglicéridos) y la hipertensión arterial³⁻⁶. Si bien estos antecedentes indican que estos fármacos podrían disminuir el riesgo cardiovascular, otras investigaciones recientes han revelado que rosiglitazona (Avantia®) incrementa el riesgo de infarto al miocardio en pacientes diabéticos y el riesgo de muerte por causas cardiovasculares⁷. Estos antecedentes controversiales han puesto en jaque el uso de las TZD. Sin embargo, aún no queda claro los mecanismos por los que estos fármacos podrían estar ejerciendo los efectos deletéreos a nivel cardiovascular. Debido a estos antecedentes se ha tornado de vital importancia la investigación del mecanismo de acción de las TZD a nivel cardiovascular y la participación de su blanco farmacológico denominado **receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)**.

1.2. Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPAR)

La acción de las TZD cursa a través de su unión a estos receptores, los que actúan regulando la expresión de numerosos genes involucrados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos⁴⁻⁶. Los PPARs son receptores y factores transcripcionales activados por ligandos, integrantes de la superfamilia de receptores nucleares a los que pertenecen también los receptores para hormonas esteroideas, tiroideas y el ácido retinoico. Estos receptores poseen una gran homología estructural entre sí y están formados por 4 módulos funcionales (Figura 1). El módulo A/B, en el extremo amino-terminal, posee el dominio de transactivación que es independiente de ligando (AF-1), el cual contiene sitios de fosforilación, que modifican la actividad de estos receptores. El módulo C, comprende el dominio de unión al DNA (DBD) que incluye dos motivos de dedos de Zinc. En el módulo D, se encuentra el dominio de "bisagra", cuya función aún no está bien definida, pero estructuralmente es muy flexible y es crucial para la unión al DNA. En el extremo carboxilo-terminal, en el módulo E/F, se encuentran los dominios de unión a ligando (LBD) y el de transactivación dependiente de ligando (AF-2). Además, esta región es necesaria para la localización nuclear, dimerización del receptor e interacción con proteínas coactivadoras o represoras⁸⁻¹¹.

La unión de agonistas específicos activan los PPARs, induciendo la formación de un heterodímero entre ellos y el receptor para el ácido cis 9-retinoico (RXR) y su posterior unión al DNA en los elementos de respuesta PPRE de los promotores de sus genes blancos. Luego, el dímero PPAR/RXR recluta diversos coactivadores tales como CBP/p300, SRC1, PBP y PGC-1¹⁰. La activación individual de los RXR o PPAR puede inducir la transcripción de genes, pero hay sinergia cuando se coactivación simultáneamente ambos receptores⁸⁻¹¹ (Figura 2)

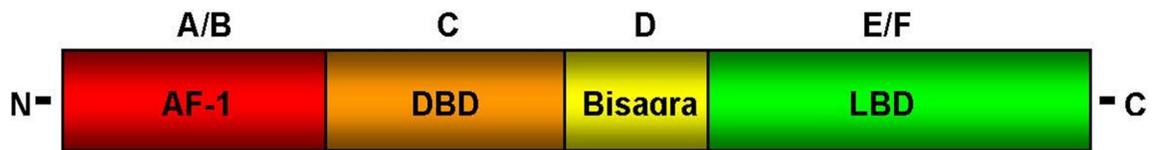


Figura 1: Estructura y dominios funcionales de los PPARs. AF-1, dominio de activación independiente de ligando.; DBD, dominio de unión al DNA; LBD, dominio de unión a ligando.

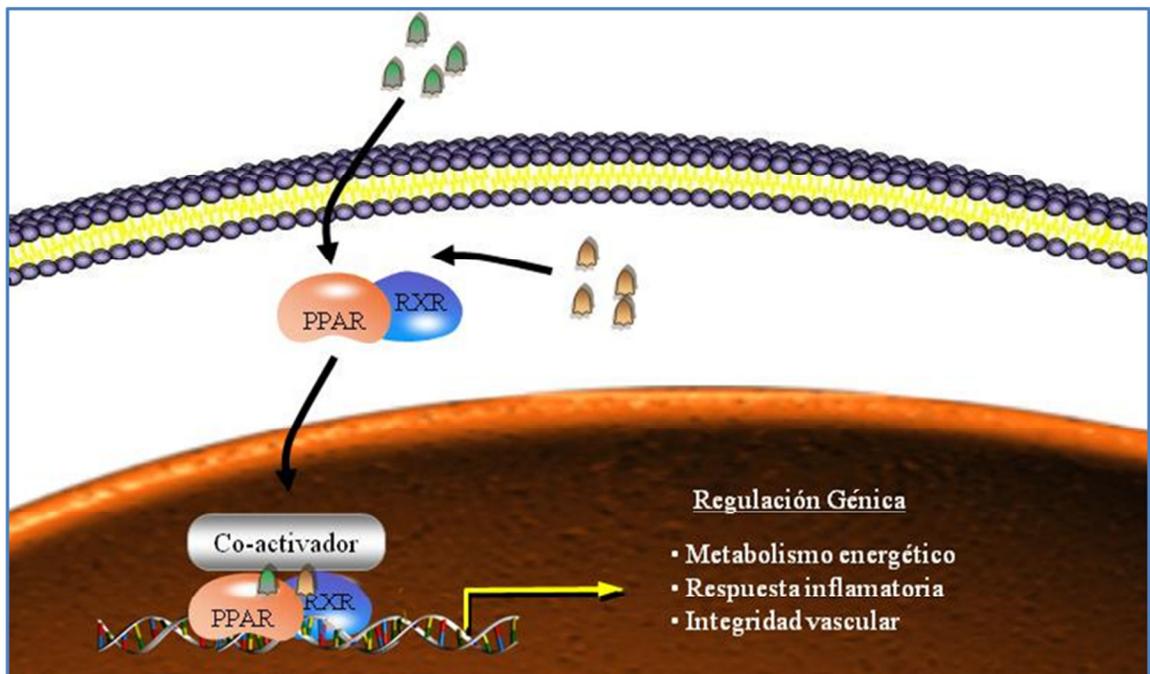


Figura 2: Mecanismo de acción de los PPAR. El ligando ingresa a la célula donde se une al receptor y favorece la dimerización con el receptor del ácido 9-cis-retinoico (RXR). El complejo formado migra al núcleo donde se une al DNA, en elementos de respuesta de genes específicos involucrados en metabolismo, respuesta inflamatoria e integridad celular.

Se han descrito tres isotipos de PPARs: α , β/δ y γ , los que muestran entre un 60-80% de homología estructural¹⁰. Se ha establecido que ellos son codificados por distintos genes, muy conservados en las distintas especies⁸⁻¹¹. Si bien, los tres PPARs son

activados por ácidos grasos, presentan diferencias entre sus ligandos, especificidad por sus genes blancos y expresión en distintos tejidos⁸⁻¹¹.

PPAR α es relativamente abundante en tejidos con gran capacidad oxidativa, como hígado, riñón y corazón¹⁰. Este receptor es activado por ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), fosfolípidos oxidados y por productos lipídicos de las lipoproteínas⁸⁻¹¹. La importancia clínica de PPAR α radica en que es blanco farmacológico de fibratos, tales como gemfibrozilo y fenofibrato (Figura 3). Estos fármacos son utilizados para el tratamiento de las dislipidemias y han demostrado tener efectos protectores a nivel cardiaco ya que reducen la mortalidad cardiovascular en pacientes con síndrome metabólico^{3,4,12}.

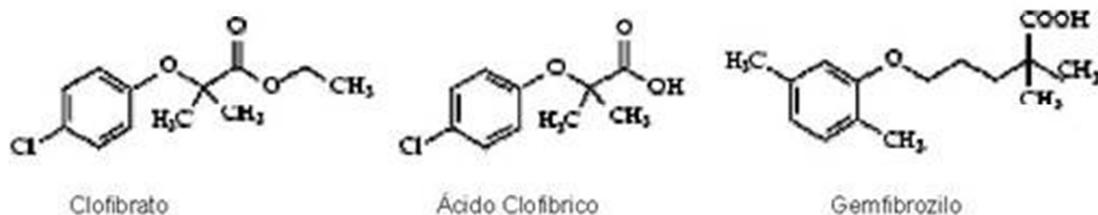
La expresión de PPAR- β/δ parece ser ubicua y su abundancia depende del tejido. Hasta la fecha se conoce poco respecto a la función de PPAR β/δ , pero se sabe que al igual que PPAR α , se activan por ácidos grasos y tiene un papel importante en el metabolismo lipídico, estimulando la β -oxidación de ácidos grasos⁸⁻¹¹, así como un papel fundamental en el desarrollo embrionario¹³.

La expresión de PPAR γ está limitada a un número reducido de tejidos, principalmente a los tejidos adiposo y vascular. Sin embargo, se le ha atribuido una importante presencia en el tejido cardiaco, donde sus efectos han sido controversiales¹⁴⁻¹⁹. Agonistas naturales de PPAR γ son las formas oxidadas de los ácidos linoléico, 9- y 13-HODE (hidroxioctadecadienoico) y el derivado de la prostaglandina D2, 15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) quien tiene un papel clave en la inflamación. Sin embargo, la importancia clínica de PPAR γ se debe a que es el receptor para las TZD (Figura 3) y responsable de sus efectos antidiabéticos, reduciendo la resistencia a la insulina y disminuyendo los niveles sanguíneos de glucosa en los pacientes con diabetes tipo 2^{5,6,10}.

Se ha demostrado que los tres PPARs tienen la función principal de regular el metabolismo intermediario, pues los PPARs regulan varios de los genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos, así como la “conversación” entre estas vías

metabólicas²⁰. Además, las tres isoformas están expresadas de forma variable en el sistema cardiovascular, donde se les atribuye participación en la regulación del crecimiento celular, migración, estrés oxidativo e inflamación, afectando el remodelado cardiovascular^{11,21} y principalmente el metabolismo cardíaco^{22,23}.

FIBRATOS



TIAZOLIDINEDIONAS

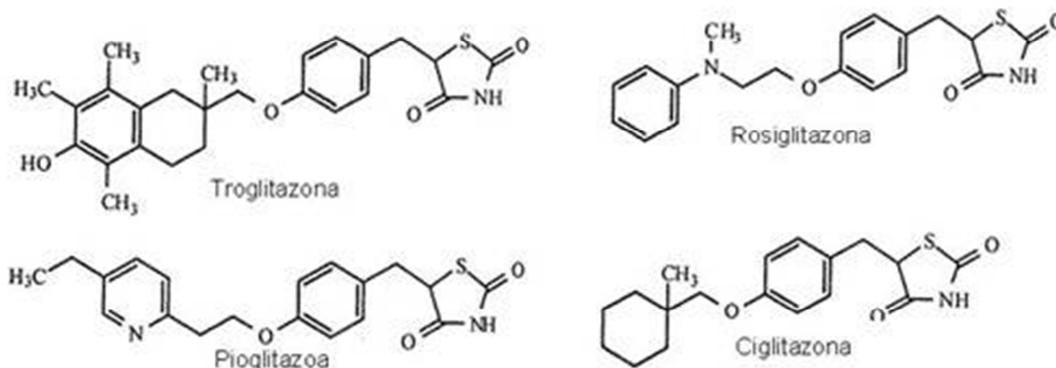


Figura 3: Ligandos farmacológicos de PPAR α (fibratos) y PPAR γ (tiazolidinedionas).

1.3. Metabolismo cardiaco

La regulación del metabolismo cardiaco de un mamífero es compleja y depende de múltiples factores ligados entre sí, como los niveles de sustratos y hormonas en la circulación arterial, el flujo coronario, el estado inotrópico y el estatus nutricional del tejido^{22,23}. La función cardiaca bajo condiciones normales y patológicas depende del metabolismo de ácidos grasos, de la glicólisis y de la oxidación de piruvato, cuyo principal propósito es la generación de ATP. El ATP provee la energía para realizar los procesos celulares que incluyen las reacciones biosintéticas, la contracción muscular y transporte activo a través de las membranas celulares^{22,23}.

La generación de ATP viene del proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial que utiliza los equivalentes de reducción aportados por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) a partir de la oxidación del acetil-CoA. En el cardiomiocito, el acetil-CoA es el producto de la oxidación de los ácidos grasos derivados principalmente del plasma y de los triglicéridos almacenados intracelularmente, y del piruvato proveniente de la oxidación láctica (lactato deshidrogenasa) o de la glicólisis^{22,23}.

El corazón adulto normal obtiene gran parte de sus requerimientos energéticos (60-90% del ATP requerido) de la β -oxidación de ácidos grasos (FAO) de cadena larga, y sólo una parte (10-40%) por la oxidación de la glucosa (glicólisis)⁹. En contraste, durante el desarrollo fetal, en un ambiente relativamente hipóxico, el corazón obtiene su energía principalmente de la oxidación de la glucosa y lactato⁹. Inmediatamente en el periodo postnatal, cuando incrementa la disponibilidad de O₂ y ácidos grasos, la expresión de las enzimas involucradas en la FAO aumentan, lo que lleva a la transición desde el metabolismo glicolítico al lipídico^{9,20,22,23}. En distintas patologías cardiacas, ocurre un "switch" metabólico similar al observado en el nacimiento. En el corazón hipertrófico, la capacidad oxidativa mitocondrial disminuye y se privilegia la oxidación glicolítica, asemejándose a lo observado en el feto. A su vez, en los diabéticos no controlados, debido a la resistencia a insulina en los cardiomiocitos y los altos niveles de ácidos grasos libres circulantes, el miocardio utiliza casi exclusivamente lípidos para sustentar la síntesis de ATP^{9,20,22,23}.

Se ha mostrado que los PPARs regulan varios de los genes involucrados en el metabolismo lipídico, así como la “conversación” entre las rutas metabólicas de la glicólisis y la β -oxidación de ácidos grasos^{9,19,24}. PPAR α es el regulador maestro de los genes de la FAO (MCPTI, MCAD y ACO), por lo que en el corazón, la expresión y actividad de PPAR α aumenta después del nacimiento, pudiendo así, suplir los requerimientos energéticos^{9,19}.

1.4. Papel fisiopatológico de los PPARs en el corazón.

Se ha descrito que la actividad y la expresión de los PPARs varían en estados patológicos. Por ejemplo, los niveles de PPAR α disminuyen en los ventrículos hipertrofiados²⁵ mientras que aumentan en la cardiomiopatía diabética²⁶. Estos antecedentes han sugerido que la disminución o aumento en la expresión de las enzimas responsables de la FAO en estas patologías se debe, al menos en parte, a alteraciones en la señalización del PPAR α , regulador maestro de los genes de la β -oxidación de ácidos grasos²⁴⁻²⁶. El tratamiento con agonistas para PPAR α regula la expresión de las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos en el corazón hipertrófico, favoreciendo la β -oxidación y restaurando así el metabolismo cardíaco^{15,25,27}.

Sin embargo, las acciones de los ligandos de PPAR son más amplias y no sólo están circunscritas a la regulación del metabolismo cardíaco. Interesantemente, los agonistas de PPAR γ inhiben la hipertrofia del cardiomiocito^{28,29}, efecto inicialmente atribuido sólo a PPAR α . Estudios en corazones de ratas infartadas, sometidos a isquemia/reperfusión o a infusión de angiotensina II han mostrado que los fibratos y tiazolidinedionas reducen significativamente tanto el tamaño del área infartada como la fibrosis y mejoran la función contráctil^{17,27-35}. El mecanismo por el cual actúan se ha vinculado principalmente a sus propiedades anti-inflamatorias, ya que hay una disminución en el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, así como también en la expresión de proteínas de respuesta inflamatoria^{17,27-35}. Este efecto anti-inflamatorio no está restringido sólo al corazón. A nivel vascular, los PPARs se expresan en células endoteliales, células del músculo liso vascular, macrófagos y linfocitos T. En estas células, los ligandos de PPAR α y PPAR γ exhiben propiedades antiinflamatorias, antiaterogénicas y antiproliferativas, antagonizando *in vivo* e *in vitro* la acción de angiotensina II^{21,30,31,36,37}.

Además, los ligandos de PPAR α y PPAR γ ejercen acciones antioxidantes, inhibiendo la generación de ROS y mediadores inflamatorios en los vasos. Todas estas acciones ocurren gracias a la inhibición de la actividad de factores transcripcionales pro-inflamatorios como NF κ B y AP-1, sugiriendo la participación de los PPARs en el remodelado cardiovascular^{10,11,38,39}.

1.5. El remodelado cardiaco y la muerte del cardiomiocito

El remodelado cardiaco es un proceso fisiopatológico común a varias enfermedades cardiovasculares, consistente en un cambio estructural y funcional del tejido cardiaco, caracterizado por muerte e hipertrofia de los cardiomiocitos, proliferación de los fibroblastos y alteraciones en la composición de la matriz extracelular (MEC)⁴⁰.

Los cardiomiocitos dan cuenta de aproximadamente el 70% del volumen cardiaco y corresponden al 33% del total de células del corazón⁴⁰. Son los protagonistas centrales en el proceso de contracción cardiaca, un tipo celular muy especializado que cesa de proliferar casi inmediatamente después del nacimiento. En consecuencia, la muerte de los cardiomiocitos compromete el funcionamiento del corazón⁴⁰. Por esta razón existe gran interés en conocer los mecanismos involucrados en la muerte celular del cardiomiocito, a fin de disponer de nuevos y mejores blancos farmacológicos.

Existen diversas formas de muerte celular, entre las que se incluyen a la apoptosis (muerte celular programada de tipo I), autofagia (muerte celular programada de tipo II) y la necrosis (muerte celular no programada)⁴¹⁻⁴⁴. **La apoptosis** es una forma de muerte celular controlada genéticamente que involucra cambios bioquímicos y estructurales diferentes de los observados en la necrosis (Figura 4). Estos son la disminución del volumen celular, colapso de los elementos del citoesqueleto pero una preservación de los organelos hasta etapas tardías del proceso. Otra característica es la fragmentación nuclear y del DNA, con o sin activación de caspasas y la formación de cuerpos apoptóticos⁴⁵. La membrana plasmática mantiene su integridad, con lo que se evita el vaciamiento del contenido celular y el desarrollo de un estado inflamatorio, característico en la necrosis^{45,46}.

A diferencia de la apoptosis, la muerte por **necrosis** se describe como un evento caótico e independiente de la regulación genética, en el cual la célula se hincha, proceso conocido como oncosis, aumentando su volumen hasta que se pierde la continuidad de la membrana plasmática, reventando y vertiendo su contenido intracelular al exterior, con el subsecuente proceso inflamatorio⁴⁷ (Figura 4).

La autofagia se define como un proceso dinámico y programado que, a diferencia de la apoptosis, procede con la degradación temprana de organelos pero una preservación de elementos del citoesqueleto hasta estados tardíos. El secuestro de proteínas citoplasmáticas y organelos enteros ocurre dentro de vacuolas de doble membrana, que se contactan y posteriormente se fusionan con los lisosomas formando las vacuolas autofágicas. Todos estos elementos capturados en las vacuolas son degradados por proteasas lisosomales y son removidos de la célula por exocitosis⁴³. La apoptosis requiere la activación de caspasas y fragmentación del DNA, sin embargo estos eventos no se requieren en la muerte por autofagia,. En contraste con la necrosis y al igual que en la apoptosis, la autofagia no presenta respuesta inflamatoria⁴⁸.

Si bien los tres tipos de muerte mencionados anteriormente se han descrito en cardiomiocitos, aún no están completamente aclarados los mecanismos por los cuales estas células desaparecen del tejido cardiaco durante la insuficiencia cardiaca. La pérdida progresiva de cardiomiocitos es una de las características más importantes de esta patología y se ha sugerido que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular además de ser un proceso clave en la transición de la hipertrofia a la insuficiencia cardiaca descompensada^{43,45}.

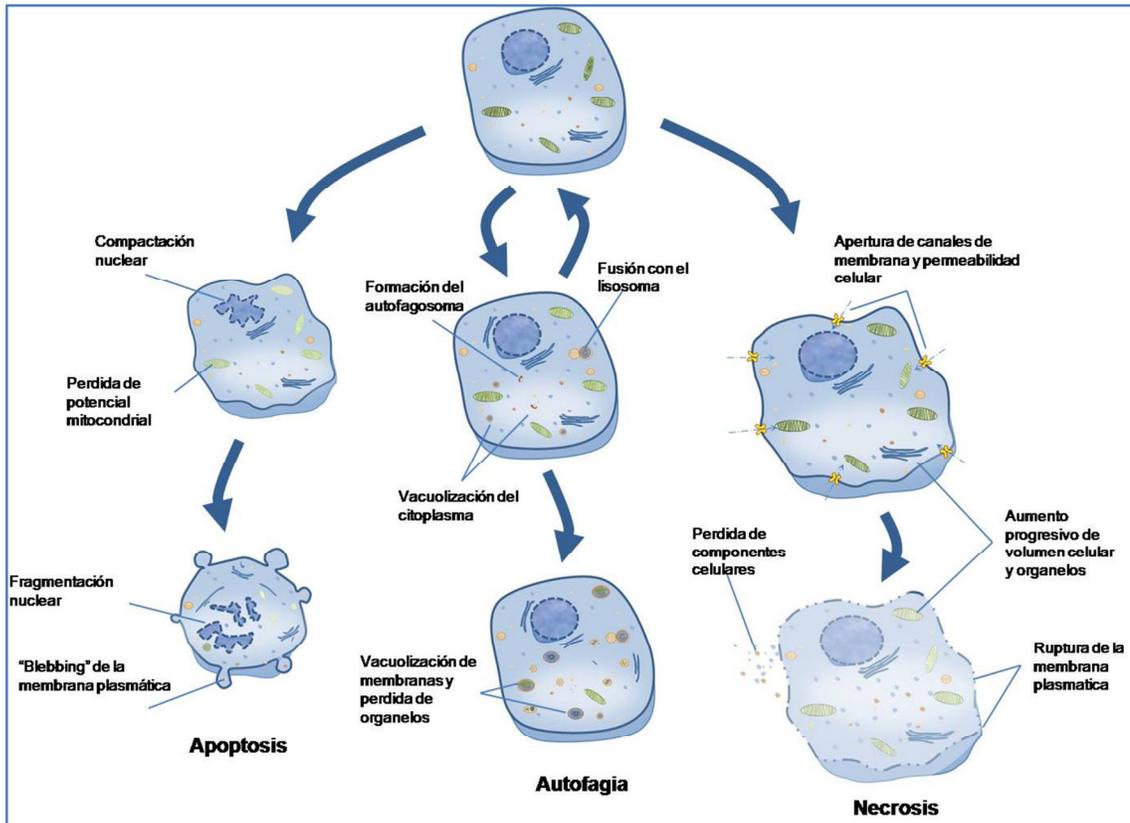


Figura 4: Diferencias celulares entre apoptosis, necrosis y autofagia. En el proceso necrótico la membrana celular se rompe, provocando el vaciamiento del contenido citoplasmático al espacio extracelular y posterior desarrollo de un proceso inflamatorio en el sitio de la necrosis. En cambio, el proceso apoptótico se caracteriza por una disminución del volumen celular, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos, manteniendo la estructura de la membrana plasmática intacta. Los restos celulares son fagocitados por macrófagos o células vecinas, sin originar inflamación. La autofagia se menciona como un probable proceso de supervivencia o una forma alternativa de muerte celular programada.

1.6. Apoptosis en el cardiomiocito

En el cardiomiocito, así como en otras células, las etapas iniciales del proceso apoptótico ocurren principalmente a través de dos vías transduccionales independientes:

1.6.1. Vía extrínseca o mediada a través de receptores de muerte

Esta vía transduccional se activa por ligandos externos que se unen a integrantes de la superfamilia de receptores de muerte, de los cuales Fas y TNFR1 (receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1) son los mejores ejemplos⁴⁹. Estos receptores de transmembrana interactúan físicamente en forma directa con otros elementos transduccionales formando el complejo DISC, que interactúa con otras proteínas que conducen al reclutamiento de proteasas intracelulares específicas conocidas como caspasas⁴⁹⁻⁵¹. La unión del Fas ligando (FasL) o del TNF α a sus receptores induce la trimerización y agregación de estos últimos, conduciendo a la activación de la caspasa-8, la cual a su vez activa a la caspasa-3. La activación de estas proteasas por proximidad, gatilla una cascada proteolítica para llevar a cabo la ejecución de la apoptosis. Tanto Fas como TNFR-1 se expresan en el cardiomiocito y se inducen por estrés oxidativo producido en la hipoxia- reoxigenación⁴⁹⁻⁵¹.

1.6.2. Vía intrínseca o mitocondrial

Diversos estudios sugieren que los principales cambios en este proceso ocurren en la mitocondria. La mitocondria contiene un vasto arsenal de sustancias, altamente letales, que inician la apoptosis cuando se liberan al citosol. Entre ellas se cuentan al citocromo c, factor inductor de la apoptosis (AIF), endonucleasa G y las proteínas Smac/Diablo⁴⁹. El citocromo c junto a la procaspasa-9, ATP y la proteína Apaf-1 forman el apoptosoma que por proximidad física conduce al procesamiento de la procaspasa-9 a caspasa-9 y la posterior activación de la caspasa-3, proteasa crítica en la ejecución de las etapas tardías del proceso apoptótico. Esta vía apoptótica se activa en el cardiomiocito en respuesta al estrés nutricional (privación de suero o glucosa), estrés redox y activación constitutiva de G α_q . Esta mayor vulnerabilidad del cardiomiocito, no es aplicable a todo músculo rico en mitocondria ya que los miocitos esqueléticos no poseen Apaf-1 y no experimentan muerte celular dependiente del citocromo c⁴⁹⁻⁵¹. Las proteínas de la familia Bcl2 son importantes reguladores de la apoptosis a nivel de la mitocondria, controlando la integridad de su membrana. Estas proteínas se subdividen en tres subfamilias, una antiapoptótica y otras dos proapoptóticas. Algunas proteínas Bcl-2 se asocian a proteínas del poro de transición

mitocondrial (MPTP) y regulan la liberación del citocromo c. Los integrantes proapoptóticos (Bax, Bak, Bad) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xl) de la familia Bcl2 se asocian y neutralizan entre sí, de manera que el balance relativo entre estos efectores determina la decisión entre la vida y la muerte celular^{52,53}. En el cardiomiocito, algunas proteínas Bcl-2 son reguladas a nivel transcripcional, mientras que otras son moduladas post-transduccionalmente ya sea por fosforilación, ubiquitinación, etc. que pueden conducir a su degradación y/o cambios en su distribución subcelular⁴⁹. En diferentes formas de estrés miocárdico tales como exposición al óxido nítrico, lipopolisacárido (LPS), sobrecarga hemodinámica, estiramiento mecánico e hipoxia-reoxigenación, los niveles de las proteínas Bcl-2 experimentan complejos cambios⁴⁹. Diversos estudios han mostrado que los niveles de estas proteínas aumentan en respuesta al estrés y que sólo bajo algunas condiciones participarían en la liberación del citocromo c⁴⁹.

Múltiples antecedentes indican que la muerte del cardiomiocito ocurre por apoptosis en diversas patologías cardiacas. Estímulos como la privación de suero, angiotensina II, hiperglicemia, sobrecarga de presión, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y estrés osmótico causan apoptosis del cardiomiocito^{45,46,54-56}. Los cambios osmóticos del medio extracelular son una característica de estados patológicos tales como isquemia, shock séptico y coma diabético. Para tolerar los cambios en osmolaridad, las células han desarrollado mecanismos regulatorios de volumen celular, los cuales son activados por cambios osmóticos y cuya finalidad es normalizar el volumen y mantener la función normal de la célula⁵⁶. En primera instancia, la regulación del volumen celular se lleva a cabo modificando el contenido iónico intracelular, mientras que a largo plazo ocurre a través de cambios en el metabolismo y crecimiento⁵⁶. Se ha observado que durante un periodo en la isquemia del miocardio, el corazón experimenta cambios hiperosmóticos y en nuestro Laboratorio se ha demostrado que el estrés hiperosmótico por sorbitol induce apoptosis en el cardiomiocito y que este efecto es más rápido y potente que otros estímulos apoptóticos⁵⁴.

No obstante a lo anteriormente mencionado, en muestras de tejido coronario de pacientes con insuficiencia cardiaca se reveló que en parte de los cardiomiocitos había un aumento tanto en el mRNA, como en las enzimas conjugadoras de ubiquitina, importantes en el proceso de autofagia. Además, a nivel ultraestructural se observó degeneración

celular, incluyendo la formación de agregados de proteínas poliubiquitinadas en vacuolas autofágicas⁴³. Esta evidencia indica que la apoptosis no es el único mecanismo de muerte del cardiomiocito, sino que estos también podrían morir por autofagia.

1.7. Autofagia

La autofagia se describió inicialmente como un proceso fisiológico clave para la supervivencia celular durante la privación de aminoácidos, diferenciación celular y desarrollo. Además, cumple un importante papel tanto en el recambio de macromoléculas y organelos como en patologías neurodegenerativas (Síndrome de Parkinson y Enfermedad de Alzheimer). La autofagia se define como un proceso dinámico y programado que procede con el secuestro de proteínas citoplasmáticas y organelos enteros dentro de vacuolas de doble membrana, que se contactan y posteriormente, se fusionan con los lisosomas formando los autolisosomas. Todos estos elementos capturados en las vacuolas son degradados por proteasas lisosomales y reutilizados^{57,58}.

La autofagia participa en la degradación de proteínas normales en respuesta a la privación de nutrientes, remodelado celular, diferenciación, metamorfosis, envejecimiento y transformación celular⁵⁸⁻⁶⁰. También se la ha implicado en el crecimiento del útero durante la gestación y su atrofia después del parto; en la remoción de componentes celulares anormales acumulados durante la toxicidad celular y recientemente, con el ayuno que experimenta el recién nacido en sus primeras horas de vida⁵⁹. Además, la inhibición de la autofagia se correlaciona con una disminución en la degradación de proteínas y el crecimiento celular neto⁶⁰.

1.7.1. Tipos de autofagia

Hasta el momento se han descrito en la literatura tres tipos de autofagia: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia.

En la **microautofagia** la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones que se desprenden de la membrana y quedan en el interior del lisosoma, incorporando material citosólico. Este proceso cumple una función muy importante en la degradación de los peroxisomas⁶¹ y en la renovación de la cromatina nuclear⁶².

La **autofagia mediada por chaperonas** difiere de la microautofagia en que el tráfico vesicular no está involucrado. En cambio, las proteínas sustratos de esta ruta presentan el motivo peptídico KFERQ, el cual es reconocido por un complejo de chaperona molecular para luego ser transportadas a los lisosomas, molécula por molécula. La proteína sustrato y el complejo de chaperona se unen a la membrana lisosomal a través de la proteína tipo 2a asociada al lisosoma (LAMP-2A). Luego la proteína sustrato se despliega y es empujada hacia el lumen del lisosoma para su degradación, mientras que el complejo de chaperona se recicla⁶³.

La **macroautofagia**, de aquí en adelante **autofagia**, es una vía para la degradación de proteínas de vida media larga y se induce bajo diferentes condiciones de estrés celular, principalmente durante estrés nutricional como la privación de aminoácidos⁵⁹. Diversas investigaciones han demostrado que la autofagia es un proceso de múltiples pasos que comienza con el secuestro de material citoplasmático para formar el autofagosoma, estructuras delimitadas por una doble membrana con bajo contenido de proteínas de transmembrana. Luego el autofagosoma se fusiona con los endosomas, formando una estructura híbrida que se acidifica por la adquisición de la bomba de protones, llamada el autofagosoma intermediario, el cual contiene además una membrana única. Finalmente, existe una interacción directa de los autofagosomas con los lisosomas formando una estructura denominada comúnmente autolisosoma. El contenido vacuolar se digiere y recicla para proveer a la célula de aminoácidos y energía^{58,64}.

1.7.2. Formación del autofagosoma

Los mecanismos moleculares que conducen a la formación del autofagosoma requieren de la participación de distintas proteínas codificadas en “genes relacionados a autofagia” (atg) los que se han mantenido conservados entre distintas células eucariotas,

desde levaduras hasta humanos^{57,58,65}. En un primer paso la proteína Atg7 (“E1-like”) activa a Atg12 formando un intermediario Atg12-Atg7. Posteriormente, Atg12 se transfiere a Atg10 para formar el complejo Atg12-Atg10 para finalmente ser transferida a Atg5. Luego este complejo (Atg12-Atg5) se une en forma no covalente a Atg16L⁶⁶ lo que genera un complejo de aproximadamente 800 kDa (Atg12-Atg5/Atg16L). Aunque este complejo reside mayoritariamente en el citosol, una pequeña fracción se ubica inicialmente en la membrana lo que conlleva a su distribución asimétrica durante el proceso de elongación, con la mayoría del complejo asociándose a la membrana externa. Finalmente, este complejo se disocia de la membrana al completarse la formación del autofagosoma⁶⁷ (Figura 5). Estudios con mutantes para estas proteínas han demostrado que la formación del complejo Atg12-Atg5/Atg16L es esencial para el proceso de elongación de la membrana pero no para la generación de estructuras precursoras⁶⁸.

Otra proteína importante en la formación del autofagosoma es la proteína LC3 o Atg8. Esta proteína experimenta algunas modificaciones post-traduccionales antes de unirse a la membrana. Inmediatamente, después de la síntesis se remueven los aminoácidos de su COOH-terminal (22 aminoácidos en rata y 5 aminoácidos en humanos). Este procesamiento es catalizado por el Atg4. La forma resultante se conoce como LC3-I (18 kDa) que reside principalmente en el citosol. Al igual que con Atg12, la proteína Atg7 activa a LC3-I y la transfiere a la proteína Atg3, una enzima equivalente a E2 del sistema de ubiquitinación, que finalmente conjuga a LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE). El producto final conocido como LC3-II (16 kDa) se asocia al precursor de membrana y, a diferencia de Atg12-Atg5/Atg16L permanece unido a la membrana después de haberse completado la formación del autofagosoma (Figura 5), por lo que la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas^{67,69-71}.

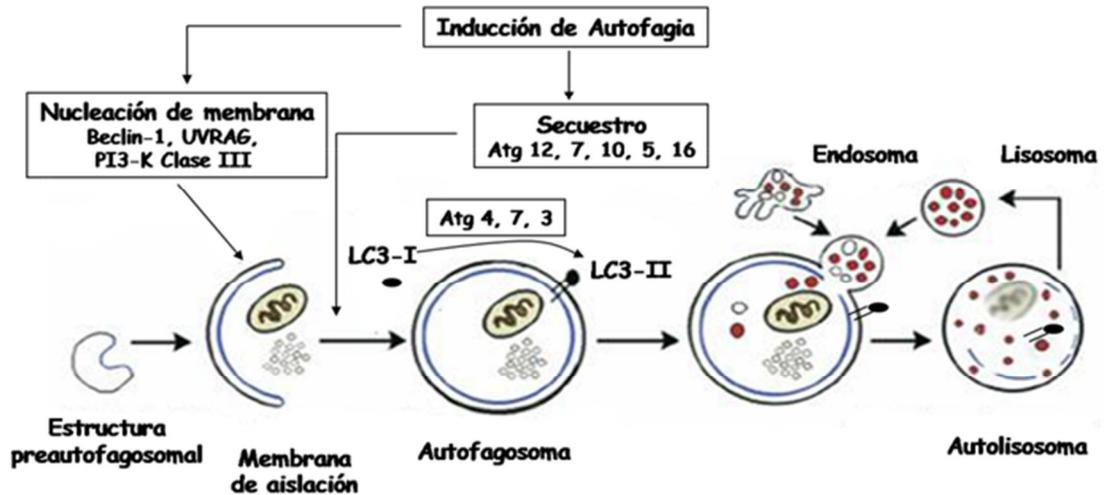


Figura 5. Etapas del proceso de formación del autolisosoma. Diferentes estímulos como eventos de isquemia/reperfusión, privación de nutrientes, ceramidas y estrés osmótico inducen la autofagia¹⁰⁰⁻¹⁰². La etapa de nucleación o formación de la estructura membranosa pre-autofagosomal requiere el concurso de las proteínas Beclin-1 (Atg 6) y PI3-K clase III. El progresivo desarrollo de esta estructura ocurre conjuntamente con la captura tanto elementos del citoplasma como organelos subcelulares (mitocondria, retículo endoplásmico, etc). Con la participación de distintas proteínas de la familia Atg se forma el autofagosoma, estructura esférica de doble membrana, que se fusiona con el endosoma y, posteriormente, con el lisosoma para dar origen al autolisosoma. LC3-II es un marcador específico del autofagosoma

1.7.3. Vías transduccionales que regulan la autofagia

Las vías transduccionales que regulan la autofagia son altamente dependientes de una serie de cascadas de fosforilaciones. Entre estas, de gran importancia es la vía PI3K/AKT/mTOR. Tanto las PI3Ks de las clases I y III participan en la regulación de la autofagia⁷². La PI3K clase I inhibe el secuestro del citoplasma y la subsecuente degradación mediante inhibición de la kinasa mTOR⁷². Por otro lado, la PI3K clase III juega un papel importante en las primeras etapas de la generación del autofagosoma ya que estimula el secuestro del citoplasma y el reclutamiento de proteínas desde el citosol para su posterior degradación. También provee a la célula de los componentes de membrana necesarios a la vía autofágica. Esta acción requiere de la interacción de la PI3K clase III con la proteína Beclin-1, lo que se ha demostrado al correlacionar directamente la

expresión de Beclin-1 con la formación del autofagosoma⁷³⁻⁷⁵. Se ha observado que una serie de compuestos pueden prevenir la formación de los precursores de la autofagia inhibiendo la PI3K clase III, entre ellos wortmanina, 3-metiladenina (3-MA) o LY294002⁷².

La autofagia se induce bajo condiciones de privación de nutrientes^{58,76}. Esta inducción está mediada en gran parte por el sensor de energía, mTOR, una proteína kinasa que censa los niveles energéticos⁷⁷. Cuando los niveles de aminoácidos y ATP son normales, mTOR promueve la progresión del ciclo celular mediante la hiperfosforilación de p70-S6K. Sin embargo, en ausencia de nutrientes, mTOR se encuentra inhibido con lo que p70-S6k se encuentra hipofosforilado, lo que promueve la desunión de los ribosomas del retículo endoplasmático. Este es considerado uno de los primeros eventos moleculares en la generación del autofagosoma^{58,78}. La función de mTOR está conservada desde la levadura hasta los mamíferos. La inhibición de mTOR por rapamicina remeda varias de las características fenotípicas de las células privadas de nutrientes⁷⁹.

Otro sensor de energía es la proteína kinasa activada por AMP (AMPK), que responde a cambios en la razón intracelular de AMP/ATP⁸⁰. La activación de AMPK resulta en la estimulación de una variedad de procesos intracelulares involucrados en la producción de ATP. Estos procesos involucran el incremento de la incorporación y la oxidación de ácidos grasos^{76,81} y de glucosa por un aumento de la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) de manera independiente a PI3-K/Akt⁸², al mismo tiempo aumenta la glicolisis vía activación de PFK-2 (fosfofructoquinasa-2)⁸³. Además, la activación de AMPK lleva a la reducción de procesos que consumen energía como la síntesis de proteínas y ácidos grasos⁷⁶, siendo la represión de la síntesis de proteínas vía inhibición de la señalización de mTOR⁸⁴.

El reciente descubrimiento que AMPK inhibe a mTOR mediante la fosforilación de TSC 1/2 (complejo de esclerosis tuberosa1/2)⁸⁵ y que es activada por pequeños cambios en los niveles de ATP citosólico o un incremento del AMP, ha posicionado a la AMPK como un interesante candidato como regulador de la autofagia⁸⁵. Recientemente se demostró que la privación de glucosa induce una fuerte activación de AMPK e inactivación de mTOR en cardiomiocitos, acciones que correlacionan con la estimulación de la autofagia⁸⁶. Además *in vivo*, la inducción de autofagia durante una isquemia aguda se acompaña por la

activación de AMPK en el corazón, siendo esta activación de autofagia inhibida por un dominante negativo de AMPK⁸⁶.

1.7.4. Autofagia como muerte celular programada

La autofagia es un proceso fisiológico presente en todas las células eucariotas, por el cual se eliminan moléculas y organelos intracelulares en los lisosomas. La palabra autofagia fue acuñada por Christian de Duve en 1963 y significa comida (fagia) propia (auto)⁸⁷. Este mecanismo, clave para la supervivencia celular se activa cuando hay algún tipo de estrés celular, infección por patógenos o malformaciones celulares internas⁸⁷. Así, participa en procesos de vital importancia como en el metabolismo energético, regulación del crecimiento y desarrollo. En las células musculares la autofagia tiene la misión de eliminar las mitocondrias defectuosas⁸⁸. Sin embargo, se ha descrito que la autofagia en ocasiones lleva a la muerte celular⁸⁹. La muerte celular autofágica es principalmente una definición morfológica (muerte celular asociada con autofagosomas/autolisosomas) y aún no existe evidencia concluyente de que sea un mecanismo específico de muerte. Si bien, se acepta que la autofagia eventualmente puede destruir una célula⁴¹, aún es controversial si la actividad autofágica en células en proceso de muerte es la causa de muerte, o por el contrario, un mecanismo de supervivencia. Los estudios morfológicos e histoquímicos no han podido probar una relación de causa-efecto entre la autofagia y la muerte celular. Sin embargo, argumentos recientes refuerzan la idea de que la actividad autofágica en células en proceso de muerte puede actuar como un mecanismo de supervivencia⁸⁹.

La muerte celular autofágica se ha descrito en varios tipos celulares. Por ejemplo, en las células de cáncer de mama, MCF-7 tratadas con tamoxifeno evidencian un tipo de muerte en la cual hay acumulación de vacuolas autofágicas en el citoplasma⁹⁰. En líneas celulares de fibroblastos de ratón, L929, la inhibición de la caspasa-8 induce muerte autofágica, siendo severamente afectada por la ausencia de Atg-7 y Beclin-1, dos proteínas esenciales en la autofagia⁹¹. Los fibroblastos de embriones de ratones (MEF) doble "knockout" para las proteínas Bax y Bak (Bax/Bak^{-/-}) se caracterizan por ser resistentes a la apoptosis pero mueren por autofagia, requiriendo para ello de Atg-5 y Beclin-1 funcionales⁹². Estos antecedentes han llevado a postular que las células que no pueden morir por apoptosis, lo hacen mediante otros mecanismos, entre ellos por autofagia⁹³.

La evidencia de comunicación entre las vías apoptóticas y autofágicas ha ido en aumento en los últimos años. Así se ha descrito que vías antiapoptóticas inhiben la autofagia, como la vía transduccional PI3K/AKT/mTOR. La mitocondria integra las señales de muerte celular llevando a la célula a apoptosis. Sin embargo, cuando estas están dañadas son removidas por autofagia; por lo tanto, la mitocondria representa un nodo de interacción para apoptosis y autofagia. En células mamíferas, las proteínas de la familia Bcl-2 localizadas en la membrana interna de la mitocondria modulan la autofagia^{94,95}. Evidencias recientes sugieren que Bcl-2 inhibe la autofagia a través de una directa interacción con Beclin-1 y que mantiene a la autofagia en niveles compatibles con la supervivencia celular⁹⁶. Por otra parte, la caída del potencial mitocondrial puede desencadenar la degradación de la mitocondria por autofagia⁹⁷. Sin embargo, se desconoce si la inhibición de la autofagia incrementa el número de mitocondrias despolarizadas o que este estado las haga blanco del autofagosoma. La caída del potencial mitocondrial presenta un punto de convergencia entre la apoptosis y la autofagia, a través de las proteínas de la familia Bcl-2 que regulan el potencial mitocondrial. Así la relación entre caída del potencial mitocondrial, apoptosis y autofagia mitocondrial es un blanco interesante de investigación, como también la interacción de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y Beclin-1.

1.8. Autofagia y patologías cardiovasculares

Existen diversos antecedentes, tanto *in vitro* como *in vivo* que sugieren que la autofagia puede tener diferentes funciones en el corazón, las que son beneficiosas o perjudiciales para la morfología y función cardíaca⁹⁸⁻¹⁰³. Recientes antecedentes han mostrado la inducción de autofagia en cardiomiocitos frente a múltiples formas de estrés cardiovascular, incluyendo sobrecarga de presión, isquemia crónica, isquemia y reperfusión, y daño inducido por toxina diftérica⁹⁸. Tannous y cols. mostraron que la agregación de proteínas en el corazón expuesto a sobrecarga de presión es suficiente para inducir autofagia en el cardiomiocito y que la atenuación de la actividad autofágica aumenta la abundancia y el tamaño del agregosoma, consistente con el rol de la autofagia en la eliminación de agregados proteicos⁹⁹. Es así como se ha descrito el papel de la autofagia en la degradación de componentes citoplasmáticos en condiciones basales, lo que lleva a cardiomiopatías en el caso que la degradación autofágica es defectuosa¹⁰⁰. Además, la

autofagia proporciona protección eliminando las mitocondrias y otros organelos dañados y disfuncionales^{101,102}, observándose este proceso en el miocardio expuesto a estrés^{102,103}.

Uno de los estímulos que induce y acelera la formación de vesícula autofágicas a nivel cardiaco es la privación transitoria de nutrientes¹⁰³, característica de la isquemia. Si bien, se ha observado que en periodos breves de isquemia no se induce la autofagia, el número de autofagosomas se incrementa durante la reperfusión (ref). Sin embargo la autofagia aumenta en periodos de isquemia más prolongados, la que se incrementa durante la reperfusión. Incluso en periodos de isquemia de 60 min se observan lisosomas disfuncionales durante la reperfusión, sugiriendo que la isquemia prolongada puede afectar la vía autofagolisosomal^{104,105}. Evidencia reciente indica que la isquemia cardiaca induce autofagia de una manera dependiente de AMPK⁸⁶.

Aparte de su papel fundamental en la eliminación de agregados proteicos y organelos dañados, la autofagia sirve como una fuente catabólica de generación de energía en el ayuno. De hecho, se ha sugerido que la autofagia de los cardiomiocitos entre el nacimiento y el primer amamantamiento puede proporcionar una fuente necesaria de energía¹⁰⁶. Los cardiomiocitos del ratón transgénico GFP-LC3 ayunado tienen altos números de autofagosomas para sobrevivir a las condiciones adversas de privación de nutrientes. En concordancia con esta idea, la autofagia promueve la supervivencia durante la isquemia manteniendo una homeostasis energética. Durante la isquemia se inhibe la generación de la ATP a través de la fosforilación oxidativa y estos niveles reducidos de ATP han demostrado inducir autofagia¹⁰⁷.

En general, estos resultados claramente indican que la autofagia tiene en primer lugar un papel pro-sobrevivencia en el corazón. Este hecho es contradictorio con los altos niveles de autofagia encontrados en los corazones insuficientes, los cuales soportan la teoría que una inducción excesiva de autofagia subyace muerte celular por autofagia y pérdida de cardiomiocitos. De hecho, se ha descrito cardiomiocitos con características autofágicas en corazones de pacientes con insuficiencia cardiaca dilatada^{43,108}, cardiomiopatía valvular e hipertensiva¹⁰⁹, isquemia crónica y miocardio hibernante¹¹⁰, pero no en el corazón normal^{108,111}.

1.9. Autofagia y PPAR

En vista a los antecedentes descritos, se asume que la autofagia actúa en el cardiomiocito y en otras células como una vía de supervivencia durante la privación de nutrientes y otras formas de estrés celular. Sin embargo, cuando existe una activación severa de la autofagia, los mecanismos protectores se podrían ver sobrepasados llevando a la muerte celular, lo que podría ser de manera dependiente o independiente de la apoptosis.

Existen algunos antecedentes que sugieren la participación de los PPARs en la regulación de la apoptosis en distintos tipos celulares. Mientras se estudiaba el efecto antiapoptótico del agonista de PPAR γ 15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2), Butler y *co/s.* observaron que esta prostaglandina gatilla la muerte de células de cáncer de próstata¹¹². Sin embargo, la muerte observada utilizaba una vía no apoptótica y se registraron interesantes cambios morfológicos como distensión del retículo endoplasmático y una abundante presencia de vacuolas que contenían mitocondrias en su interior¹¹². Estos resultados también se han observado en células de neuroblastoma¹¹³ donde se determinó la participación de PPAR γ en el proceso. Estas evidencias muestran la participación de PPAR γ como mediador de la inducción de autofagia y la muerte celular¹¹²⁻¹¹³. Sin embargo, hallazgos recientes indican que la activación del PPAR γ por su agonista farmacológico rosiglitazona induce autofagia en células de cáncer de mama pero no su muerte¹¹⁴. Además la activación del PPAR γ se ha vinculado con la inducción de la autofagia en hígados de ratones sometidos a isquemia y reperfusión, postulándose en este modelo a la autofagia como un mecanismo de autopreservación celular¹¹⁵.

La revisión de los antecedentes bibliográficos expuestos permiten resumir que:

1. La autofagia es un proceso de adaptación al estrés metabólico,
2. Aún se debate si la autofagia es un proceso de muerte o de supervivencia celular en el corazón.
3. Los PPARs tienen un papel clave en el metabolismo cardiaco.

4. Agonistas de estos receptores como fibratos y tiazolidinedionas son medicamentos ampliamente utilizados en pacientes con riesgo cardiovascular y desórdenes metabólicos.
5. Algunos antecedentes sugieren que podría existir una relación en PPARs, muerte celular y autofagia en otros tipos celulares.
6. No hay antecedentes de tal relación en el corazón.

En consecuencia el objetivo de esta tesis es investigar si existe una relación entre: la autofagia, la muerte o sobrevivencia del cardiomiocito y la actividad y/o expresión de PPAR γ , regulado su agonista farmacológico rosiglitazona.

2. HIPOTESIS

“El agonista farmacológico de PPAR γ rosiglitazona induce la autofagia del cardiomiocito y lo protege de la muerte”.

3. OBJETIVOS GENERALES

- a) Investigar si la activación del PPAR γ por rosiglitazona induce autofagia en el cardiomiocito
- b) Estudiar si la activación de PPAR γ previene la muerte del cardiomiocito expuesto a estrés mediante la inducción de autofagia.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar *in vitro* el efecto de agonistas farmacológicos de los PPAR α y/o PPAR γ en la viabilidad del cardiomiocito de rata.
- Determinar si rosiglitazona induce autofagia en el cardiomiocito y si ésta se asocia a sobrevida celular.
- Investigar si rosiglitazona modifica la viabilidad del cardiomiocito expuesto a estrés nutricional, estrés hiperosmótico o isquemia/reperfusión simulada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio Hank's, medio DME, medio M199, pancreatina, gelatina, Tritón X-100, 5-bromo-2'-deoxiuridina, L-lactato, yoduro de propidio, RNasa, PMSF, azul de tripán, rodamina 123, NADH, anti-IgG de ratón conjugado a FITC, anticuerpo anti-tubulina, EDTA, EGTA, 3-metiladenina (3-MA), rapamicina, además de otros reactivos bioquímicos. Rosiglitasona se adquirió de Alexis Biochemicals (San Diego, CA, EEUU) y gemfibrozilo de Laboratorio Sanitas (Santiago, Chile). Colagenasa, tripsina-EDTA, Earle's media balanced salt solution (EBSS) y RPMI Medium 1640 se adquirieron a Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU). Suero fetal bovino (FBS) y de ternero (FCS) se obtuvieron de Hyclone. Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa se adquirieron a Calbiochem (La Jolla, EEUU) y el anticuerpo anti-PPAR γ a GenWay (San Diego, CA, EEUU). El anticuerpo anti-Bcl-1 se adquirió en Santa Cruz Biotechnology y los anti IgG de pollo conjugado a Cyan-2 y a peroxidasa en Abcam (Cambridge, RU). En Cell Signaling Technology (Beverly, EEUU) se adquirieron los anticuerpos IgG de conejo anti-caspasa-3, LC3. De Promega (Ma, EEUU) se obtuvieron los kits de medición cellTiter y Dual luciferase Reporter y el vector plasmidial pRL-SV40. El reactivo Western Lightning se adquirió en Perkin Elmer Life Sciences, Inc (Boston, MA). El medio de montaje para fluorescencia DAKO y la lipofectamina se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA) De MERCK (Dasnstadt, Alemania) se adquirió: gelatina, compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes. El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de cardiomiocitos se adquirió a Falcon (EEUU).

5.2. Modelo animal

Se utilizaron ratas neonatas Sprage-Dawley (2-3 días) provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. El diseño experimental contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.3. Diseño experimentales

Se utilizó como modelo experimental cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas. Las células se purificaron según el procedimiento descrito más adelante y posteriormente se sembraron y mantuvieron en medio de cultivo DMEM/M199 (4:1) en presencia de suero fetal bovino (SFB) 5% y suero fetal de ternera (SFT) 10% por 18-24 h. Posteriormente se siguieron dos modelos experimentales (Figura 6).

5.3.1. Modelo de autofagia

Cultivos primarios de cardiomiocitos se mantuvieron por 24 h en medio de cultivo con 5% de SFB. Posteriormente las células se trataron con rosiglitazona, ligando farmacológico de PPAR γ , en presencia de 2,5% de SFB y en un rango creciente de concentraciones y de tiempo. Para evaluar la autofagia, los cardiomiocitos se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 y se determinó por microscopia de fluorescencia el cambio en distribución de la proteína GFP-LC3 y mediante citometría de flujo la disminución relativa en la cantidad de GFP. Además, el procesamiento de la proteína LC3 se determinó por Western blot. Para evaluar la viabilidad de cardiomiocitos se realizaron ensayos de incorporación de yoduro de propidio (PI) cuantificado por citometría de flujo en células no permeabilizadas.

5.3.2. Modelo de estrés hiperosmótico

Cultivos primarios de cardiomiocitos se mantuvieron por 24 h en medio de cultivo DME/M199 privado de suero. Posteriormente las células se expusieron a los ligandos farmacológicos de PPAR α (gemfibrozilo) y de PPAR γ (rosiglitazona) en un rango creciente de concentraciones y de tiempo. Igualmente, los cardiomiocitos se expusieron a estrés osmótico en medio DME/M199 que contenía 300 mM de sorbitol (osmolaridad final: 600 mOsm). Para evaluar la viabilidad de cardiomiocitos se realizaron ensayos de exclusión de azul tripán y de incorporación de yoduro de propidio (PI) cuantificado por citometría de flujo en células no permeabilizadas. La apoptosis se determinó por citometría de flujo mediante la cuantificación de la población Sub-G1, al incorporar PI en células permeabilizadas con metanol. También se determinó la caída de potencial mitocondrial mediante el decaimiento de la fluorescencia de tetrametil rodamina (TMRM). La cantidad de ATP producido se determinó por una reacción quimioluminiscente utilizando el kit celltiter-glo. Mediante Western blot e inmunofluorescencia se determinó la presencia de PPAR γ y su actividad fue determinada en cardiomiocitos transfectados con un plasmidio reportero que contiene el elemento de respuesta (PPRE) del promotor de la acil-CoA oxidasa (ACOX; PPRE(ACOX)3-Tk-Luc).

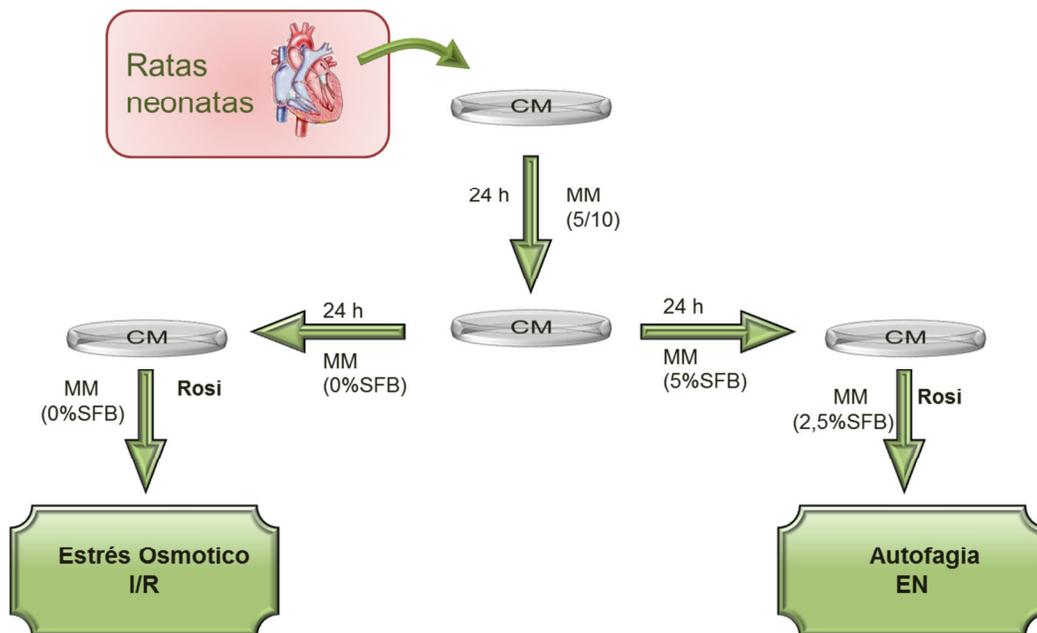


Figura 6: Cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas como modelo experimental. Los cardiomiocitos (CM) se aislaron según el procedimiento descrito y mantenidos en medio de cultivo en presencia de suero fetal bovino (SFB) 5% y suero fetal de ternera (SFT) 10% por 18-24 h. Posteriormente las células se cultivaron en presencia de suero o en ausencia de suero dependiendo del modelo experimental a seguir. I/R, isquemia y reperfusión; EN, estrés nutricional.

5.4. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de ratas

Para aislar y cultivar cardiomiocitos desde corazones de rata, estos últimos se extrajeron, se lavaron a 37°C en medio Hank's estéril, se descartaron las aurículas y se picaron finamente antes de comenzar con la digestión enzimática con lo que se obtuvieron las células disgregadas. Los ciclos de digestión se realizaron en presencia de colagenasa de tipo II y pancreatina como se describe en detalle en la publicación de Foncea y cols¹¹⁶. Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial de los fibroblastos y cardiomiocitos sobre superficies plásticas, el producto de la digestión se dejó reposar en placas de 100 mm durante 2 h en medio DME:M199 (4:1) 10% FBS. Luego, el sobrenadante, se recolectó y se centrifugó a 1.000 x g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y la pella se resuspendió en 20 ml de medio DME:M199 (4:1) 5%

FBS y 10% FCS. El número de células se determinó en una cámara de Neubauer usando como colorante azul de tripán y por microscopía se visualizaron las células vivas y muertas. Conocida su concentración, las células se sembraron en DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS a distintas densidades, según las necesidades experimentales, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina (10 μ M), sobre placas de cultivo precubiertas con una mono capa de gelatina (2% p/v) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5% y aire al 95%.

5.5. Preparación de extractos de proteínas totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar la presencia de PPAR γ en cardiomiocitos en estado basal, así como para evaluar la actividad autofágica a través del procesamiento de la proteína LC3, en respuesta al tratamiento con rosiglitazona. Para este fin, las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de $0,25 \times 10^6$ células/pocillo. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 50 μ L de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%(v/v); SDS 0,1% (v/v); deoxicolato 1%; aprotinina 20 mg/ml; leupeptina 1 mg/ml; PMSF 1 mM y Na₃VO₄ 1 mM). El homogenizado se sonicó por 5 min y luego se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo Eppendorf nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y se desnaturó en tampón de carga 4x (glicerol 20%, β -mercaptoetanol 20%, SDS 5%, 125 mM Tris y 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8), para ser almacenado (el extracto) a -20°C.

5.6. Electroforesis de geles de poliacrilamida

La separación y resolución de las proteínas de acuerdo a su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución 29,2:0,8 de acrilamida: bisacrilamida. Los geles se cargaron con 30 μ g de extracto proteico. Los geles concentradores (stacking) y separadores (running) fueron de 5 y 12%, respectivamente. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis por 1,5h.

5.7. Electrotransferencia

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF de 0,45 μm de poro a una corriente constante de 0,45 A en tampón de transferencia por 45 min.

5.8. Western blot

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y agitación suave en las condiciones mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos, dilución y condiciones de bloqueo utilizados en los western blots.

Anticuerpo	Tampón de bloqueo	Dilución	Tampón de incubación
PPAR γ	TBS 1x Tween-20 0,1% Gelatina 0,2% p/v	1:2.500	TBS 1x Tween-20 0,1% Gelatina 0,2% p/v
LC3	TBS 1x Tween-20 0,1% Leche descremada 5% p/v	1:1.000	TBS 1x Tween-20 0,1% Leche descremada 2,5% p/v
Beclin-1		1:2.000	
Tubulina		1:10.000	
β -actina		1:5.000	
Anti-IgG de conejo		1:5.000	
Anti-IgG de pollo	TBS 1x Tween-20 0,1% BSA 3% p/v	1:5.000	TBS 1x Tween-20 0,1% BSA 3% p/v

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x que contenía Tween-20 al 0,1% e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo o pollo, conjugado con peroxidasa, en tampón de bloqueo TBS 1x/Tween-20 al 0,1%. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min con el reactivo “Western Lightning” y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron con ayuda de los programas computacionales Adobe Photoshop y USI (Un-Scan-It gel, Silk Scientific Corporation).

5.9. Transfección plasmidial y actividad luciferasa

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 2.5×10^5 células/pocillo y se mantuvieron en medio DME/M199 FBS 5% /FCS 10% a 37°C en incubadora. Pasadas 24 h, las células se lavaron 3 veces con tampón Moscona (PBS 1x-Glucosa) para eliminar completamente el debris celular y se adicionó 300 μ l de medio de manutención DME:M199 (4:1).

La transfección se realizó en medio de manutención tal como se describe a continuación para un pocillo: se agregó 47,6 μ l medio de manutención (s/suero y sin antibióticos) en un tubo Eppendorf estéril y se adicionó 2,4 μ l de lipofectamina. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Independientemente, a 300 μ l de medio de manutención se agregó 0,5 μ g del plasmidio PPRE-(AOX)3-Tk-fLuc y 0,1 μ g del plasmidio pTk-rLuc-SV40 como control de transfección. La mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se mezcló con la solución que contiene la lipofectamina y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de transfección fue adicionada a las células las que se incubaron por 24 h. Transcurrido el tiempo de transfección las células fueron estimuladas con rosiglitazona 1-20 μ M en medio de manutención fresco durante 24 h.

La actividad luciferasa se midió a través de un kit comercial. Para este fin, las células se lisaron mediante un buffer de lisis incluido en el kit. En un tubo Eppendorff se agregó 10 μ l de muestra (lisis celular) y 10 μ l de reactivo de ensayo de luciferasa 2x,

inmediatamente se agitó la mezcla en un vortex y se detectó la luminiscencia en un luminómetro. Posteriormente a la mezcla de reacción se le agregó 10 μ l de reactivo “Stop and Glo” para medir la actividad de luciferasa de renilla. Para la detección de la actividad de luciferasa, se debió ajustar los tiempos de “delay” y de “integrate” en el luminómetro, para estas células los tiempos óptimos correspondieron a 2 y 10 seg, respectivamente.

5.10. Ensayos de viabilidad celular

Cardiomicitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 1×10^5 células/cm² y se mantuvieron en un medio DME/M199 sin suero por 24 h. Pasado este tiempo, se aplicó rosiglitazona o gemfibrozilo a los tiempos y concentraciones según cada experimento. Luego las células se suspendieron utilizando tripsina-EDTA 1x, la cual posteriormente se inhibió utilizando DME/M199 que contenía 10% suero, en proporción 1:5. Posteriormente se tomó una alícuota de 20 μ l de la suspensión de células y se le adicionaron 20 μ L de solución de azul de tripán, se homogeneizó y de esta nueva suspensión se tomaron 20 μ L que se colocaron en una cámara de Neubauer y se contaron las células vivas.

5.11. Tratamiento adenoviral

Las células se sembraron a distintas densidades dependiendo de las necesidades experimentales. Luego de 24 h, las células se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 (Ad-GFP-LC3) a una multiplicidad de infección (MOI) de 30 partículas virales por célula y mantenidas en esas condiciones alrededor de 24 h, antes de lavarlas y exponerlas al estímulo.

5.12. Cuantificación de autofagia

Para evaluar el efecto de rosiglitazona en la autofagia, los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se transdujeron con el Ad GFP-LC3 (MOI 30) por 24 h. Luego los cardiomiocitos se estimularon con rosiglitazona 1, 5 ó 10 μ M por 2, 8 y 24 h en medio

DME:M199 (4:1) al 2,5% SFB. Como control positivo se utilizó rapamicina (inhibidor de mTOR que induce autofagia). Se utilizó microscopía de fluorescencia para visualizar la distribución de la proteína LC3-GFP, contándose aproximadamente 150 células por condición y clasificándolas en positivas o negativas para autofagia. Además se determinó la degradación de GFP como medida de autofagia, con este objetivo los cardiomiocitos se transdujeron con el Ad GFP-LC3 y se estimularon con rosiglitazona 1, 5 ó 10 μ M por 2, 8 y 24 h y se determinó la fluorescencia relativa GFP-LC3 por citometría de flujo¹¹⁷. También se utilizó el procesamiento de la proteína LC3-I como marcador de inducción de autofagia⁵⁷.

5.13. Microscopia de fluorescencia e inmunofluorescencia

Se utilizó microscopía de fluorescencia para visualizar la distribución de la proteína LC3 en cardiomiocitos transducidos con el Ad GFP-LC3 e inmunofluorescencia para visualizar la presencia del PPAR γ .

Para investigar la distribución de la proteína LC3-GFP, los cardiomiocitos se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/placa, sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos de gelatina (2% p/v). Después de 24 h, los cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con el Ad GFP-LC3 (MOI 30) por 24 h y luego se estimularon con rosiglitazona 1, 5 ó 10 μ M por 2, 8 y 24 h en medio DME:M199 (4:1) al 2,5% SFB. Posterior al estímulo con rosiglitazona, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 10 min, las células se montaron sobre DAKO en portaobjetos, para retardar el decaimiento de la fluorescencia y se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Axiovert 135.

Para los estudios de inmunofluorescencia de PPAR γ , los cardiomiocitos se sembraron a una densidad de $0,1 \times 10^6$ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos de gelatina (2% p/v). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con metanol absoluto (-20°C) 30 min, y se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron en presencia de diluciones 1:200 del anticuerpo anti PPAR γ en TBS-BSA 2% durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron

por 2 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz con un anticuerpo secundario desarrollado en cabra anti-IgG de pollo conjugado a Cy-2 (cianina-2 sulfóxido). Finalmente, las células se montaron sobre DAKO en portaobjetos, para retardar el decaimiento de la fluorescencia y se observaron mediante microscopía confocal, en un microscopio Carl Zeiss Axiovert 135. El análisis de las imágenes se realizó con el software Image J.

5.14. Evaluación de la apoptosis mediante citometría de flujo

La técnica es una adaptación de la utilizada para la cuantificación de las poblaciones G1, S y G2 del ciclo celular, y se basa en que las células apoptóticas condensan su cromatina, lo que dificulta el acceso del colorante yoduro de propidio al DNA, por lo que aparece una población celular con menor fluorescencia al lado de la prominente señal de G1, tal como se aprecia en la Figura 7¹¹⁸.

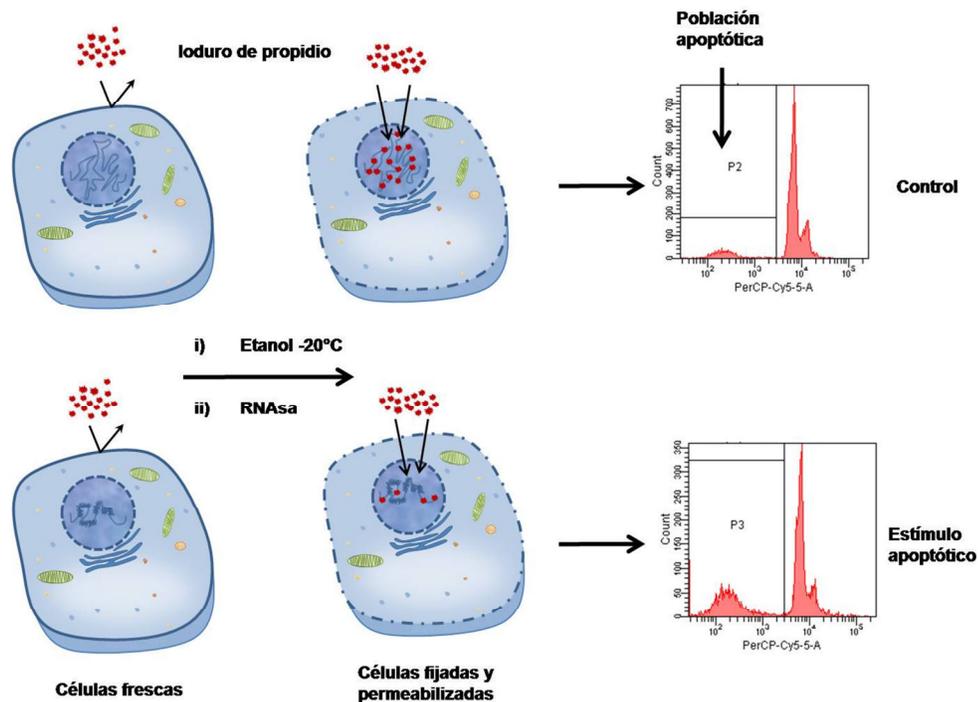


Figura 7. Esquema representativo del estado del estado del DNA en células sanas y apoptóticas. Luego de que son permeabilizadas con metanol y eliminado el RNA y sus correspondiente gráfica proveniente de la citometría. Se destaca el incremento de la población con baja fluorescencia en las células apoptóticas

Al término de cada experimento el medio de cultivo se removió y traspasó a un tubo Falcon para citómetro y a cada placa se le agregó 0,3 ml de dilución de tripsina-EDTA 1x en PBS (37°C) para soltar las células adheridas. Después de 5 min en el incubador, se les agregó a las placas 0,1 ml de medio de mantención (MM) con FBS 10% para detener la acción de la tripsina.

Las células se traspasaron inmediatamente al tubo Falcon que contenía el medio removido y se centrifugaron a 1500 r.p.m. por 5 min. El sobrenadante se eliminó procurando dejar un volumen tal, que cubra el pellet y se resuspendió con un pulso de vortex de 3 seg. En este momento se les agregó 1 ml de etanol (-20°C) al tubo y se traspasó a un tubo Eppendorf. Las muestras se guardaron a -20°C por un período de no menos de 24 y, no más, de 48 h. Luego de este tiempo, se repitió la centrifugación a 1500 r.p.m. por 5 min y la eliminación del sobrenadante pero, dejando un volumen para cubrir el pellet y se aplicó un pulso de vortex. En esta etapa se les agregó 0,3 ml de PBS que contiene RNAsa (0,1 mg/ml) y se dejó a 24 °C por, al menos, 1h. Las células se traspasaron a tubos FALCON para citómetro en un volumen final de 0,5 ml. Finalmente, se agregó 5 µl de yoduro de propidio (1 mg/ml) y se registró en el citómetro por el canal FL3.

5.15. Evaluación de la necrosis mediante citometría

La técnica se basa en que las células necróticas pierden la integridad y continuidad de sus membranas celulares, por lo que al agregar yoduro de propidio al medio, este ingresará con mucha facilidad lo que se aprecia en la aparición de una población celular con un aumento evidente de la fluorescencia, tal como se aprecia en la Figura 8¹¹⁹.

Al término de cada experimento, el medio de cultivo se removió y traspasó a un tubo Falcon para citometría y a cada placa se le agregó 0,3 ml de dilución de tripsina-EDTA 1x en PBS (37°C) para soltar las células adheridas. Después de 5 min en el incubador, se les agregó a las placas 0,1 ml de MM con FBS 10% para detener la acción de la tripsina. Las células se traspasaron inmediatamente al tubo Falcon que contenía el medio removido y en un volumen final de 0,5 ml y se les agregan 5 µl de yoduro de propidio (1 mg/ml) y se registra en el citómetro por el canal FL3 (Figura 8).

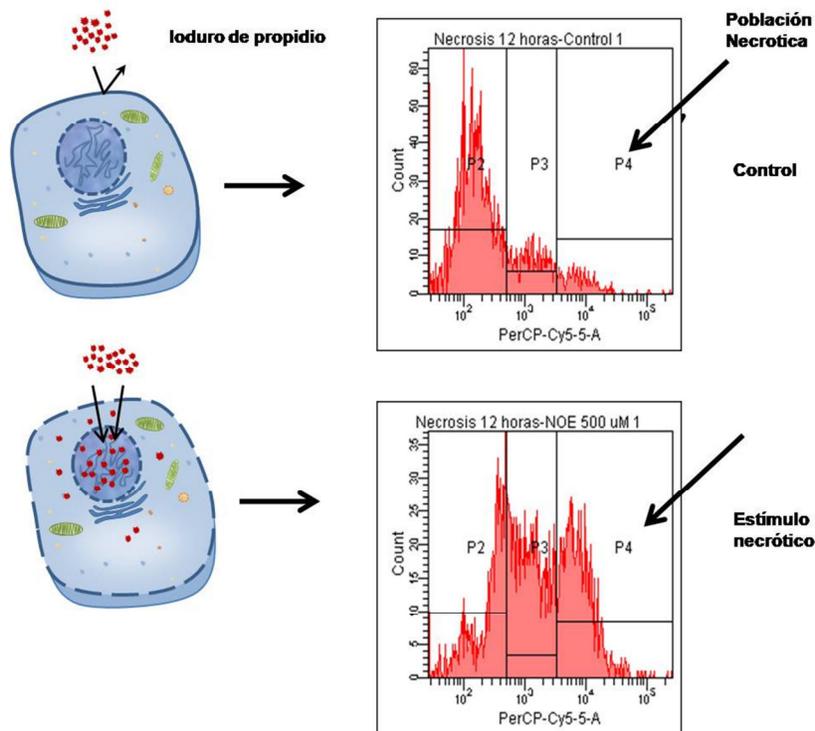


Figura 8. Representación del comportamiento esperado del yoduro de propidio frente a células con diferentes grados de permeabilidad de membrana y su correspondiente gráfica proveniente de la citometría.

5.16. Análisis del potencial mitocondrial

5.16.1. Determinación de la caída del potencial mitocondrial mediante citometría

Para la medición de la caída del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante citometría de flujo se utilizó la sonda Rodamina 123 (Rho 123). Una hora antes del término del experimento, a las células se les agregó una cantidad de Rho 123, de manera que alcance una concentración en pocillo de 250 μM , este tiempo es suficiente para que la sonda alcance a la mitocondria, que de no presentar alteraciones se concentraría en dicho organelo, presentando posteriormente, en el histograma una mayor fluorescencia¹²⁰ (Figura 9).

Al término del experimento, el medio de cultivo se removió y a cada placa se le agregó 0,3 mL de dilución de tripsina-EDTA 1x en PBS (37°C) para soltar las células adheridas. Después de 5 min en el incubador, a las placas se les agregó 0,1 mL de MM con FBS 10% para detener la acción de la tripsina. Inmediatamente las células se traspasan a tubos Falcon para citometría en un volumen final de 0,5 mL y se registra en el citómetro por el canal FL1.

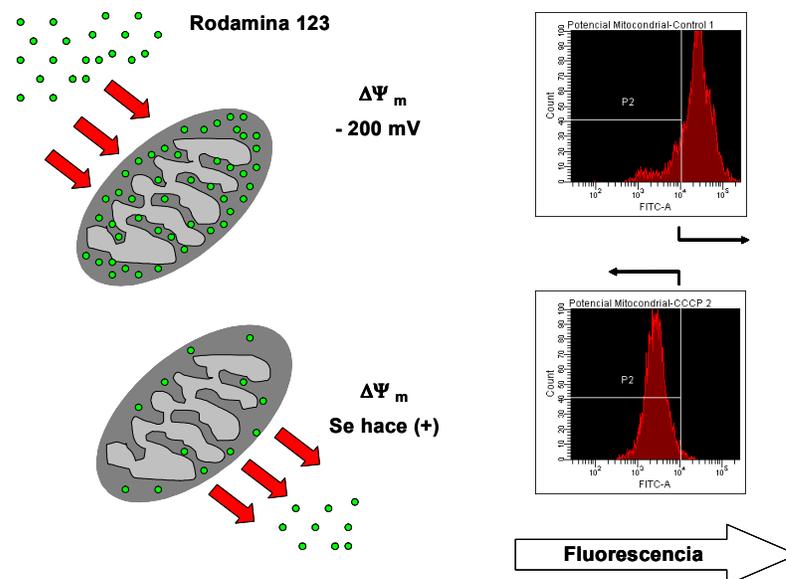


Figura 9. Esquema representativo de la cuantificación de la caída del potencial mitocondrial mediante citometría de flujo. Luego de estimular las células con C2-ceramida 10 ó 20 μ M por 1 h, con o sin inhibidores, éstas se adquieren en el citómetro y se cuantifica el % de células con baja fluorescencia. Como se aprecia en la figura, una mitocondria con un buen potencial mitocondrial (-200 mV) acumula la sonda en su interior lo que se traduce en una alta fluorescencia (mitocondria e histograma de arriba).

5.16.2. Determinación de la caída del potencial mitocondrial mediante microscopía confocal

Para la medición de $\Delta\Psi_m$, los cardiomiocitos se sembraron en cubreobjetos redondos de 25 mm de diámetro a una densidad de 1.0×10^6 células/placa y se mantuvieron en un medio DME/M199 sin suero por 24 h. Pasado este tiempo, se estimularon con

rosiglitazona 10 μ M por 24 h. Posteriormente se cargaron con 100 nM de la sonda tetrametilrodamina (TMRM) por 20 min a 37°C, previo al término del experimento. Las células se lavaron con medio Krebs con calcio para remover el exceso de sonda no incorporada y luego se montó el cubreobjetos en el sistema de visualización microscópico Carl Zeiss Axiovert 135. La fluorescencia de la TMRM se excita mediante un láser de 543 nm de longitud, mientras que su emisión máxima se obtiene entre 560 nm. A los 20 segundos de excitación del fluoróforo, las células son sometidas a estrés hiperosmótico con 600 mOsm de sorbitol (sorbitol 300 mM). La depolarización de la mitocondria resultó en un descenso de la fluorescencia. El análisis de las imágenes se realizó con el software Image J¹²¹.

5.17. Determinación del contenido intracelular de ATP

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/pocillo. Finalizados los tiempos de estimulación, se removió el medio y se agregaron 20 μ L de medio Krebs con Ca^{2+} (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES-Na, 5.6 mM glucosa, pH 7.4). Posteriormente se adicionó el tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo® en una relación 1:1 y finalmente se agitó la placa durante 2 min para completar la reacción. Finalmente, las células lisadas se traspasaron a una placa opaca de 96 pocillos y la luminiscencia se midió en un luminómetro TopCountNXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

5.18. Estrés nutricional

El estrés nutricional se indujo mediante tres procedimientos: el primero consistió en la privación de suero (EN-S), el segundo en privación de suero y glucosa (EN-G) y el tercero por privación de suero y aminoácidos (EN-A). Las células incubadas con medio completo (DME/M199 4:1 + 2,5% FBS) se usaron como control. Para inducir el estrés nutricional por privación de glucosa y suero se utilizó el medio RPMI 1640 sin glucosa (Tabla 2) o el medio EBSS (Tabla 3) para el estrés nutricional de privación de suero y aminoácidos por diferentes tiempos en presencia o ausencia de rosiglitazona.

5.19. Representación de datos y análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm SEM para el número de experimentos independientes señalados. Las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron por análisis de varianza ANOVA de una o dos vías seguido de prueba de Tukey. En cada figura se señala el análisis aplicado.

Tabla 2. Composición medio RPMI 1640 para privación de suero/glucosa (Gibco catálogo número 11879)

Composición	mg/dL	Composición	mg/dL
Aminoácidos			
Glicina	0.133	Pantotenato de calcio	0.000524
Arginina	1.15	Ácido fólico	0.00227
Asparagina	0.379	Niacinamida	0.0082
Ácido aspartico	0.15	Ácido para-aminobenzoico	0.0073
Cisteina	0.208	Piroxidina	0.00485
Ácido glutámico	0.136	Riboflavina	0.000532
Glutamina	2.05	Tiamina	0.00297
Histidina	0.0968	Vitamina B12	0.0000037
Hidroxiprolina	0.153	Inositol	0.194
Isoleucina	0.382	Sales inorgánicas	
Leucina	0.382	Nitrato de calcio (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	0.424
Lisina	0.274	Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.407
Metionina	0.101	Cloruro de potasio (KCl)	5.33
Fenilalanina	0.0909	Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	23.81
Prolina	0.174	Cloruro de sodio (NaCl)	103.45
Serina	0.286	Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	5.64
Treonina	0.168	Otros componentes	
Triptofano	0.0245	Glutación (reducido)	0.00326
Tirosina	0.111	Rojo fenol	0.0133
L-Valina	0.171		
Vitaminas			
Biotina	0.00082		
Colina	0.0214		

Tabla 3. Composición medio EBSS para privación de suero/aminoácidos (SIGMA catálogo número E2888)

Componentes	g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,265
MgSO ₄	0,09767
KCl	0,4
NaHCO ₃	2,2
NaCl	6,8
NaH ₂ PO ₄	0,122
Glucosa	1
Rojo Fenol	

6. RESULTADOS

6.1. Presencia de PPAR γ en el cardiomiocito

Como primer objetivo en la presente tesis, se determinó la presencia de PPAR γ en cardiomiocitos de ratas neonatas. La Figura 10A muestra mediante Western blot la presencia de PPAR γ en cardiomiocitos, la que es mayor en las células estimuladas con rosiglitazona tal como se describe en la literatura^{19,112,115}. La presencia de PPAR γ se corroboró mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 10B) en los que se observó la presencia de PPAR γ en cardiomiocitos en estado basal (tratados con DMSO 0,01%) y estimulados por 24h con rosiglitazona 10 μ M.

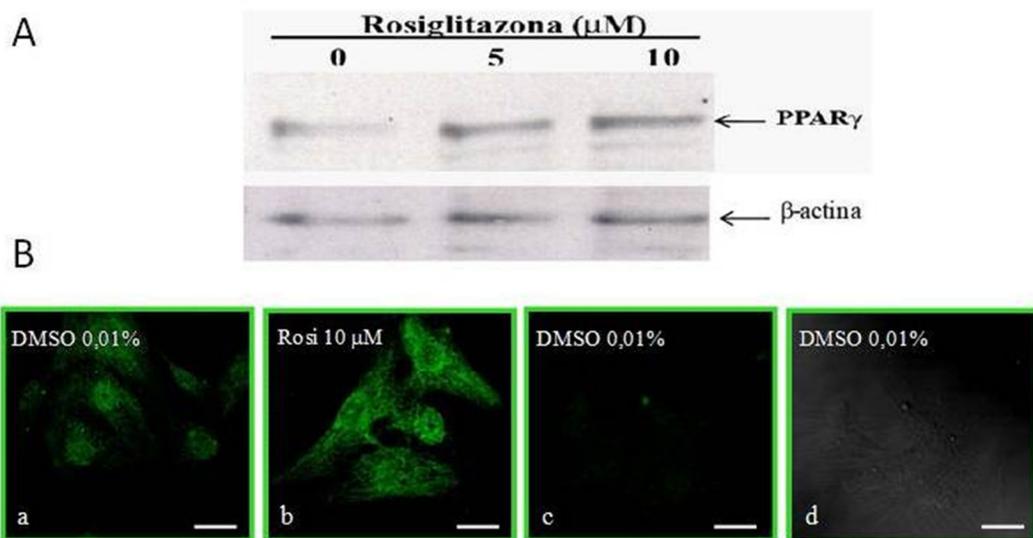


Figura 10: Expresión de PPAR γ en el cardiomiocito. (A) PPAR γ se determinó por Western blot de extracto total de cardiomiocitos estimulados por 24 h con DMSO 0,01% o con rosiglitazona 5 y 10 μ M. Se utilizó anticuerpo anti-PPAR γ (1:2500) y anti β -actina como control de carga (1:5.000). (B) Microscopía confocal de PPAR γ en cardiomiocitos estimulados por 24 h con DMSO 0,01% (a) o con Rosiglitazona (Rosi, 10 μ M; b). Como control se realizó una inmunofluorescencia sin anticuerpo^{1^{ro}} (c). (d) Detección de luz transmitida del mismo campo observado en (c). Barra: 20 μ m.

6.2. Actividad de PPAR γ en el cardiomiocito

Una vez confirmada su presencia, se determinó si PPAR γ era transcripcionalmente activo en el cardiomiocito. Para este fin, las células se transfectaron con el plasmidio reportero para PPAR, que contiene el elemento de respuesta (PPRE) del promotor de la acil-CoA oxidasa (ACOX; PPRE_{(ACOX)3}-Tk-Luc) que responde tanto a PPAR α y PPAR γ ¹⁵. Posteriormente se estimularon con rosiglitazona 10 μ M. La transfección de 1 μ g de plasmidio fue suficiente para observar un efecto significativo en la actividad transcripcional de PPAR γ al estimularlo con 10 μ M de rosiglitazona (Fig. 11A-B). Lo mismo ocurrió al estimular con 100 μ M del agonista de PPAR α gemfibrozilo (Fig. 11C). Como control de la transfección, se utilizó el plasmidio que carece de la secuencia PPRE (Fig. 11D). Estos resultados indican que tanto PPAR α como PPAR γ son transcripcionalmente activos en el cardiomiocito de rata neonata, al estimularlos con sus agonistas respectivos.

6.3. Efecto de rosiglitazona y gemfibrozilo en la viabilidad del cardiomiocito

Para determinar si PPAR γ tiene algún efecto en la muerte del cardiomiocito, estas células se trataron con rosiglitazona 10 μ M, por un período de 18 a 80 h. Los resultados obtenidos por incorporación de azul tripán indicaron que rosiglitazona no indujo muerte en estas células durante los tiempos observados (Fig 12A). Los mismos resultados se obtuvieron mediante MTT (resultados no mostrados). Al estimular por 24 h con distintas concentraciones de rosiglitazona (1-100 μ M) tampoco se observó un efecto en la viabilidad del cardiomiocito (Fig. 12B-C).

Al analizar los efectos del tratamiento con gemfibrozilo en la viabilidad del cardiomiocito, se observó los mismos resultados que con rosiglitazona. Tratamientos con gemfibrozilo 100 μ M entre 18 y 80 h no afectaron significativamente la viabilidad del cardiomiocito (Fig. 13A). Lo mismo se observó al estimular con concentraciones de 1 a 100 μ M, por 24 h (Fig. 13B-C). Sin embargo, altas concentraciones (1 mM) disminuyeron la viabilidad en un 55%, efecto debido principalmente a la alta concentración del vehículo usado (DMSO 1%).

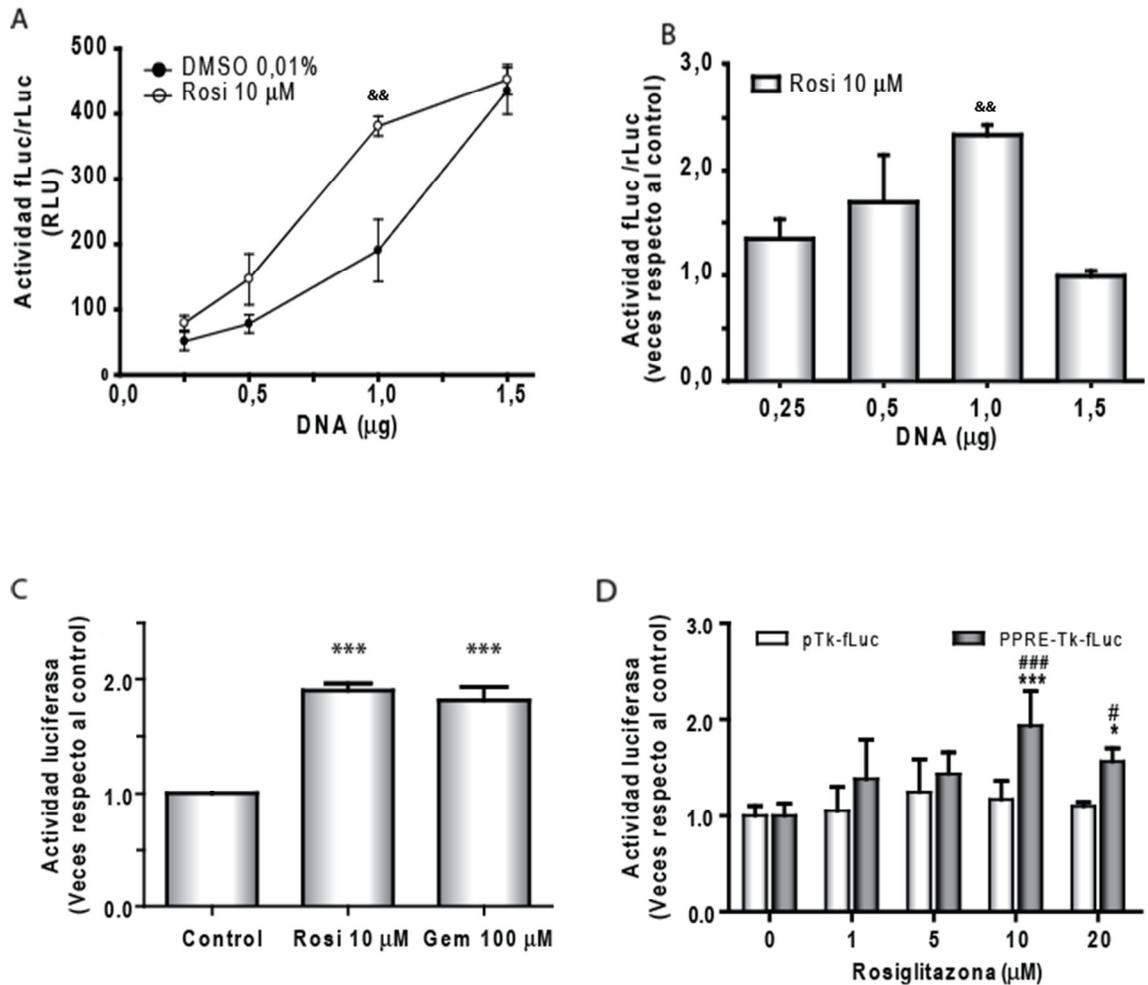


Figura 11. Actividad de PPAR γ y PPAR α en el cardiomiocito. (A) Cardiomiocitos se transfectaron con 0,25; 0,5; 1 y 1,5 μ g de plasmidio PPRE-(AOX) $_3$ -Tk-fLuc y con 100 ng de plasmidio Tk-rLuc como control de transfección. Las células se estimularon con Rosi (10 mM) o con DMSO 0,01% como vehículo. (B) Cuantificación de la actividad luciferasa obtenida en (A) relativizada al control con DMSO 0,01%. (C) Actividad luciferasa en cardiomiocitos transfectados con 1,0 μ g de plasmidio PPRE-(AOX) $_3$ -Tk-fLuc y estimulados con Rosi 10 μ M o con Gemfibrozilo (Gem, 100 mM) por 24 h. (D) Actividad luciferasa en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio PPRE-(AOX) $_3$ -Tk-fLuc o con el plasmidio vacío Tk-fLuc y estimulados con Rosi (1-20 μ M) por 24 h. Los gráficos muestran la razón entre las actividades relativas de luciferasa (RLU) de *firefly* y *renilla*, normalizados respecto al control (DMSO 0,01% para Rosi y DMSO 0,1% para Gem). Los valores graficados corresponden al promedio de las RLU respecto al control \pm DE. ^{&&}p<0,01 vs DMSO 0,01%-1 mg DNA; *p<0,05; ^{***}p<0,001 vs DMSO; [#]p<0,05; ^{###}p<0,001 vs Tk-fluc, por análisis de ANOVA. n= 3-6 en triplicado.

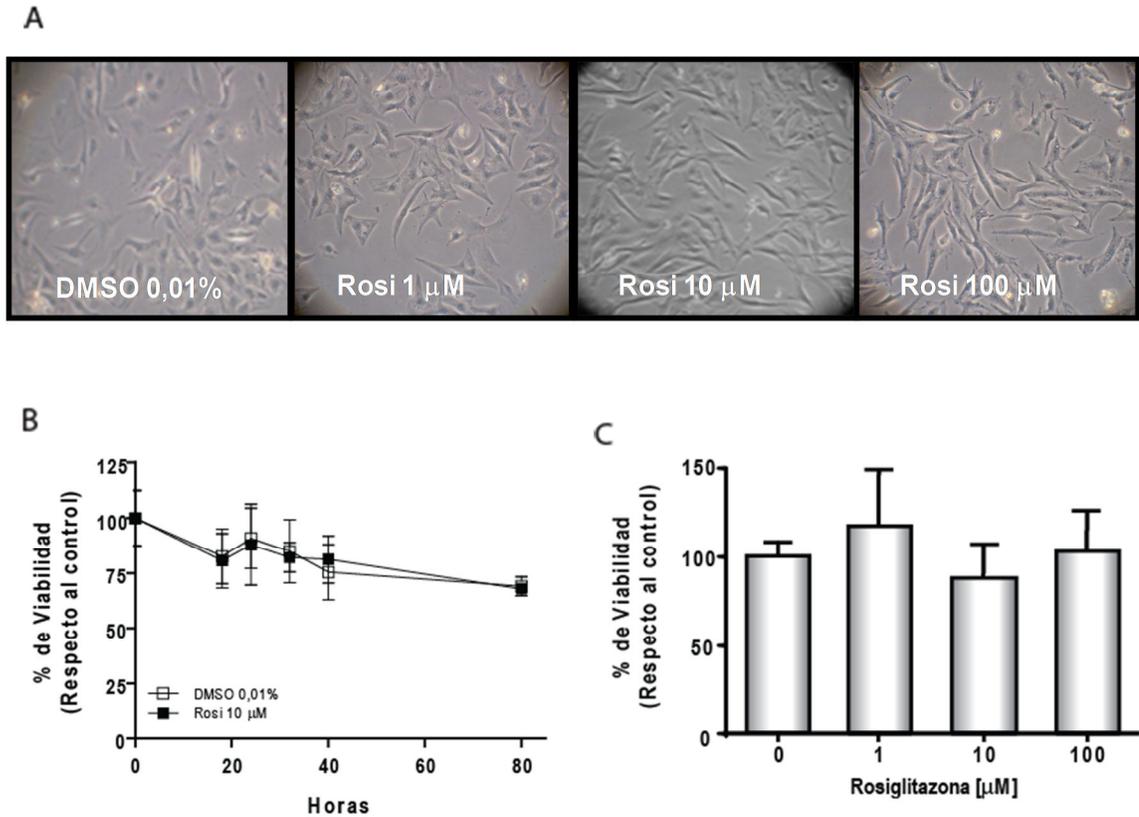


Figura 12: Efecto de rosigitazona sobre la viabilidad del cardiomiocito. Cardiomiocitos ($100,000$ células/cm²) se trataron con rosigitazona 1-100 μ M, utilizando DMSO 0,01% como vehículo, por distintos tiempos. (A) Imágenes representativas de cardiomiocitos tratados con DMSO 0,01% y con rosigitazona 1, 10 y 100 μ M por 24 h. (B) La viabilidad del cardiomiocito tratado rosigitazona (Rosi, 10 μ M) o DMSO 0,01% como vehículo, se determinó a los tiempos indicados. (C) Viabilidad del cardiomiocito estimulado con rosigitazona (1-100 μ M) por 24 h. La viabilidad se determinó por el método de exclusión del azul tripán. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de viabilidad respecto al control \pm DE (n= 3-4, en triplicado)

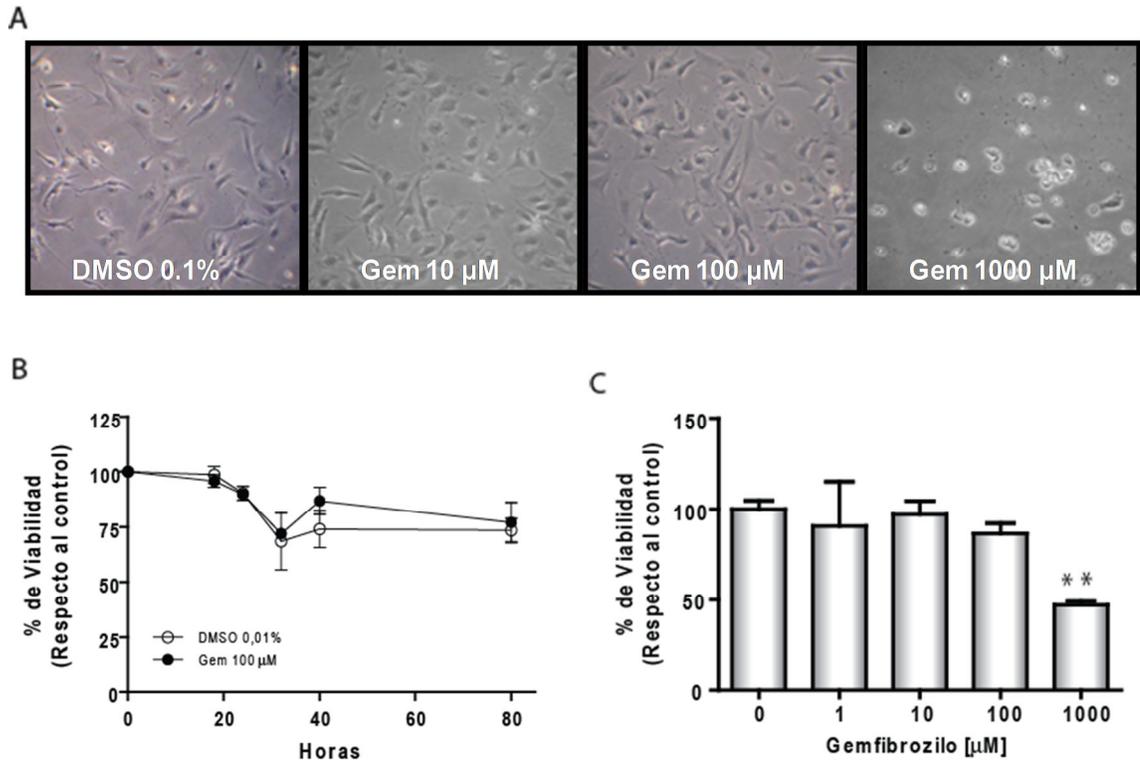


Figura 13: Efecto de gemfibrozilo sobre la viabilidad del cardiomiocito. Cardiomiocitos ($100,000 \text{ células/cm}^2$) se estimularon con gemfibrozilo 1-1000 μM , utilizando DMSO 0,1 y 1% como vehículo, por distintos tiempos. (A) Imágenes representativas de cardiomiocitos tratados con DMSO 0,1 y 1% y con gemfibrozilo (Gem) 10, 100 y 1000 μM por 24 h. (B) Viabilidad del cardiomiocito estimulado gemfibrozilo (Gem, 100 μM) o DMSO 0,1% como vehículo, a los tiempos indicados. (C) Viabilidad del cardiomiocito estimulado con gemfibrozilo (1-1000 μM) por 24 h. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de viabilidad respecto al control \pm DE ($n=3$). Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de viabilidad respecto al control \pm DE ($n=3$, en triplicado). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,01$ vs. control; # $p<0,05$ vs DMSO 1 mM, por ANOVA.

6.4. Formación de vesículas autofágicas en cardiomiocitos estimulados con rosiglitazona

La autofagia es un proceso vital en el corazón. Se ha descrito que participa en la remoción de componentes citosólicos disfuncionales y sirve como una fuente de energía durante periodos de privación de nutrientes¹²²⁻¹²⁴. Durante el inicio de la autofagia la proteína citosólica LC3 es procesada para formar LC3-II la que es luego reclutada a la membrana del autofagosoma (fig. 14)^{125,126}. La transfección transitoria de la proteína de fusión GFP-LC3 permite la detección de autofagosomas, los cuales aparecen como partículas puntuales que pueden ser detectadas por microscopía de fluorescencia.

Trabajos previos de nuestro Laboratorio han mostrado que la privación de glucosa, aminoácidos o suero generan características morfológicas típicas de autofagia, evaluadas por microscopía electrónica⁷⁶. En el presente trabajo, para evaluar la autofagia, se realizó la transducción de cardiomiocitos con un adenovirus que sobreexpresa la proteína GFP-LC3. Los resultados obtenidos mostraron que la privación de suero por 24h aumentó el número de células autofágicas en un 44% comparado con células mantenidas en 10% de suero mientras que la estimulación con rapamicina 0,1 μ M, utilizado como clásico inductor de la autofagia, aumentó el número de células autofágicas en un 58% (Fig. 15).

Recientemente se ha descrito que la activación de PPAR γ está asociada a un aumento en la inducción de autofagia en hígado y en células de neuroblastoma^{113,115}. En el presente trabajo se investigó si rosiglitazona inducía autofagia en cardiomiocitos transducidos con el adenovirus LC3-GFP. La estimulación con rosiglitazona 10 μ M por 24 h incrementó el número de células autofágicas en un 26% comparado al control (8,8%). Rapamicina 0,1 μ M aumentó en un 62% el número de células autofágicas, siendo significativamente mayor al producido por rosiglitazona. Este efecto no se observó al utilizar una concentración de rosiglitazona 1 μ M (Fig. 16A-B). Al analizar el procesamiento de LC3-GFP por Western blot se obtuvo un resultado similar, observándose que rosiglitazona sólo a una concentración 10 μ M produjo un aumento en la razón LC3-II/LC3-I comparado con el control (Fig. 16C-D). Rapamicina 0,1 μ M también aumentó la razón LC3-II/LC3-I, sin embargo dicho aumento no fue significativamente mayor que el producido por rosiglitazona.

Debido a que esta diferencia se puede deber a la alta expresión de la proteína GFP, se analizó el procesamiento de LC3 endógeno en cardiomiocitos. Al estimular con rosiglitazona 10 μ M por 24 h se observó un aumento significativo en los niveles de LC3-II de 2,3 veces mientras que la estimulación con rapamicina 0,1 μ M aumento 3,2 veces (Fig. 17). De estos resultados se concluye que rosiglitazona indujo el procesamiento de LC3 de manera significativa y que esta estimulación no es significativamente distinta a la inducida por rapamicina.

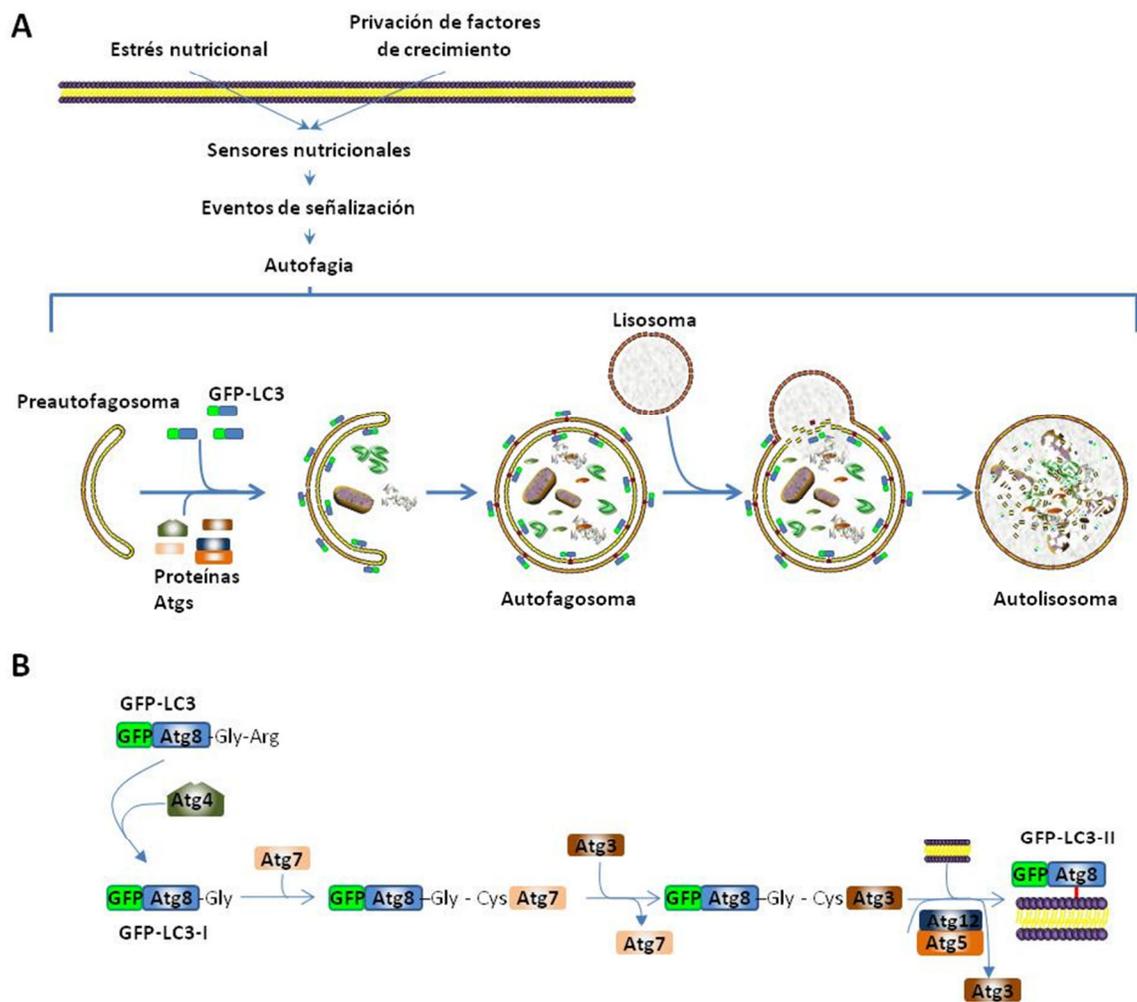
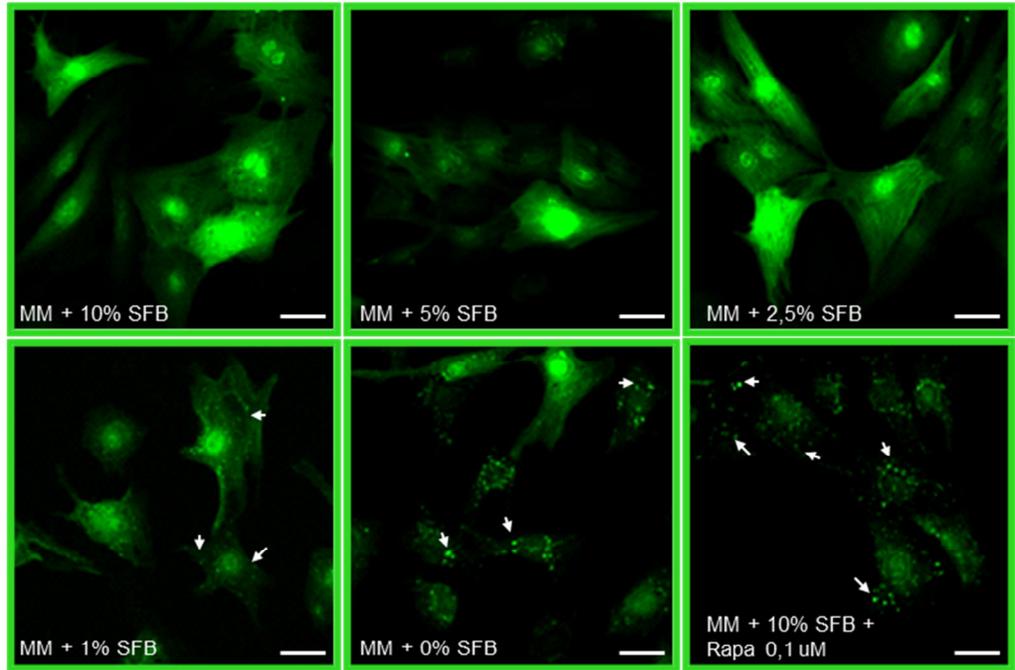


Figura 14: Inducción y formación de la vacuola autofágica durante la privación de nutrientes.

(A) Durante la privación de nutrientes y la privación de factores de crecimiento, se gatilla el proceso autofágico, una estructura membranosa denominada membrana de aislamiento rodea una porción de citoplasma y organelos, posteriormente se forma el autofosoma de doble membrana que se fusiona con el lisosoma para dar origen al autolisosoma degradando todo su contenido, incluido la proteína LC3. (B) La participación de la proteína LC3-GFP en la formación del autofosoma comienza con su procesamiento el que es catalizado por Atg4. La forma resultante se conoce como LC3-I que reside principalmente en el citosol. La proteína Atg7 activa a LC3-I y la transfiere a la proteína Atg3, que finalmente conjuga a LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE). El producto final conocido como LC3-II se asocia al precursor de membrana y, a diferencia de Atg12-Atg5 permanece unido a la membrana después de haberse completado la formación del autofosoma, por lo que la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofosomas. Sin embargo, una vez que el autofosoma se fusiona con el lisosoma para dar origen al autolisosoma degrada todo su contenido, incluido la proteína LC3-GFP, proteína asociada a microtúbulos de cadena liviana 3 fusionada con GFP.

A



B

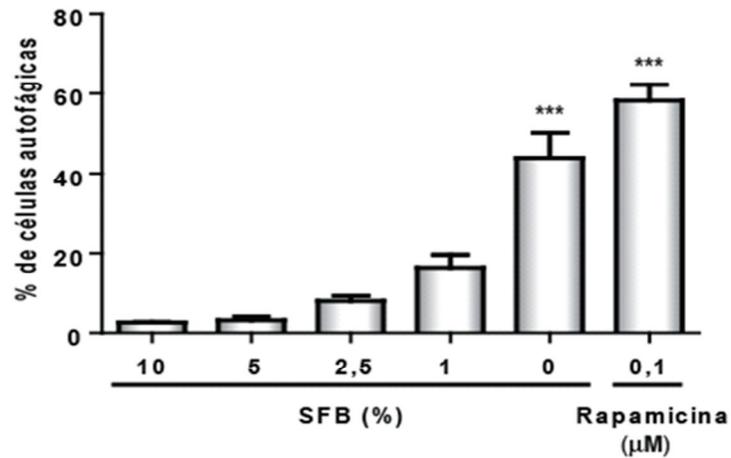


Figura 15. Estandarización del método. Formación de vesículas autofágicas en cardiomiocitos transducidos con el adenovirus LC3-GFP y privados de suero. Los cardiomiocitos se transdujeron con el adenovirus LC3-GFP (MOI: 30) por 2 h y luego se mantuvieron en MM + 5% de SFB por 18-24 h. Pasado este tiempo, el medio se reemplazó por MM que contenía 10, 5, 2,5 o 0% de SFB. Como control positivo de formación de vesículas se utilizó rapamicina 0,1 mM. (A) Imágenes de microscopía confocal. Las flechas indican vesículas autofágicas (B) Cuantificación del porcentaje de células que presentan vesículas autofágicas después de 24 h. Los valores mostrados corresponden al promedio de este porcentaje \pm DE (n= 3 en triplicado). *** $p < 0,001$ por análisis de ANOVA. Barra: 20 μ m.

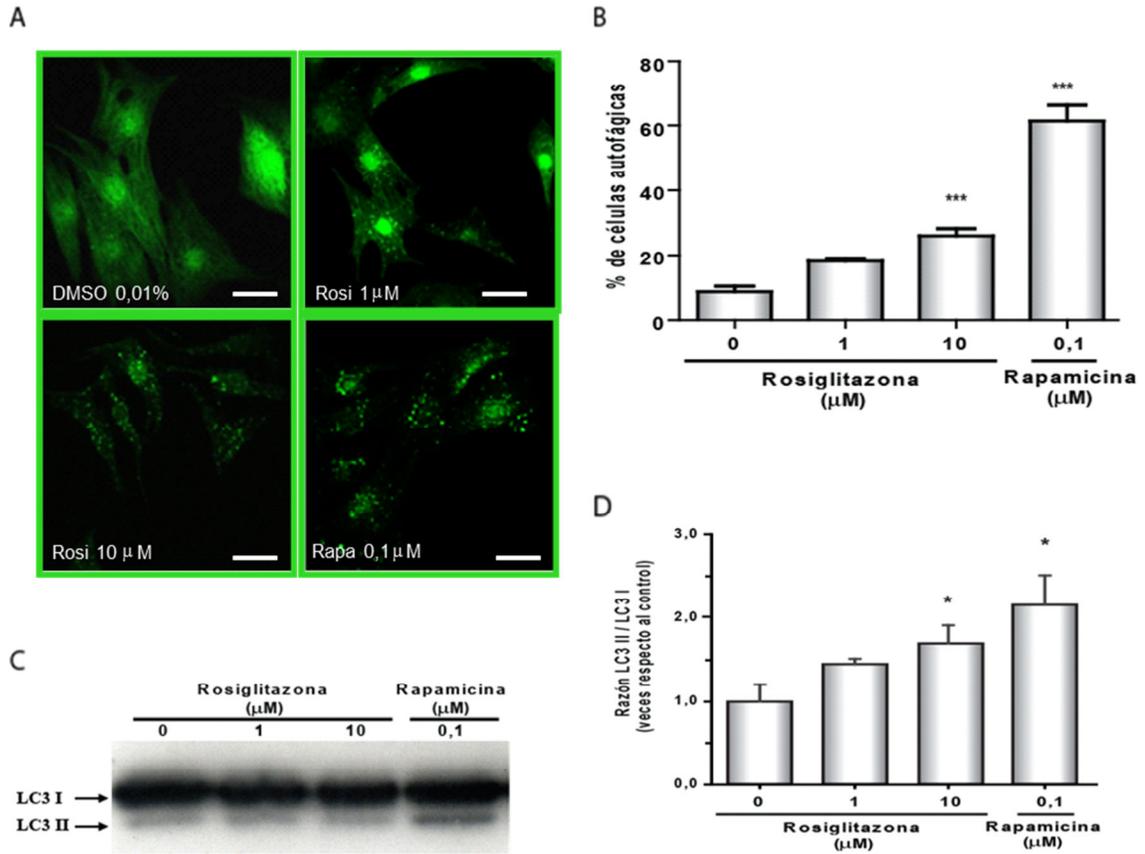


Figura 16: Rosiglitazona induce la formación de vesículas autofágicas en el cardiomiocito. Las células se transdujeron con el adenovirus LC3-GFP (MOI:30) por 2 h, luego se mantuvieron en MM + 5% de SFB por 18 -24 h. Pasado este tiempo, el medio se reemplazó por MM + 2,5% SFB que contenía DMSO 0,01%; rosiglitazona (Rosi; 1 ó 10 μM), o rapamicina (Rapa; 0,1 μM) como control positivo por 24 h. (A) Imágenes de microscopía confocal. (B) Cuantificación del porcentaje de células que presentan vesículas autofágicas después de 24 h. Los valores mostrados corresponden al promedio de este porcentaje ± SD. (n= 3 en triplicado). (C) Western blot para LC3-GFP en cardiomiocitos transducidos. Se utilizó anticuerpo anti-GFP (1:10.000) (D) Cuantificación de la razón de LC3 II / LC3 I en cardiomiocitos. Los valores graficados corresponden al promedio ± DE (n= 3). *p<0,05, ***p<0,001 vs control por análisis de ANOVA. Barra 20 mm.

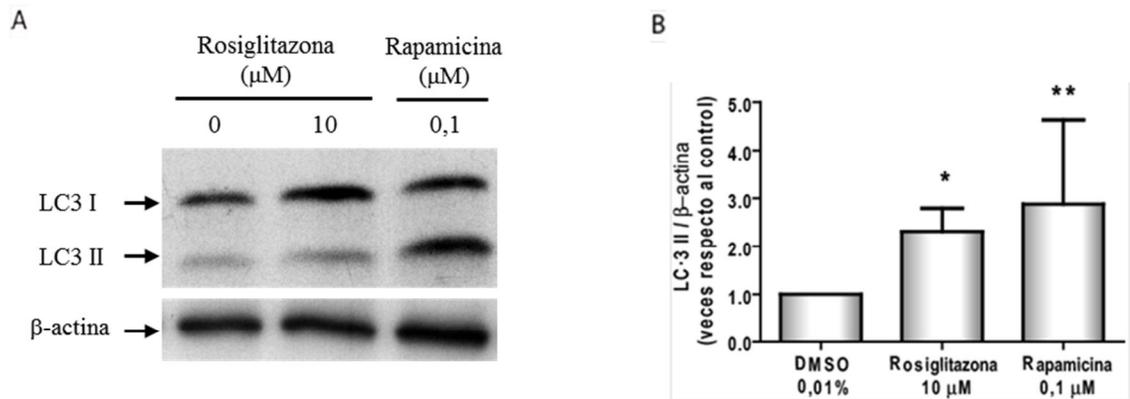


Figura 17: Procesamiento de LC3 endógeno por rosiglitazona en cardiomiocitos. (A) Western blot para LC-3 B. Cardiomiocitos se estimularon con rosiglitazona 10 μM o rapamicina 0,1 μM utilizando DMSO 0,01% como vehículo, por 24 h. Se utilizó anticuerpo anti-LC3B (1:1000) y anti beta-actina como control de carga (1:5.000). (B) Cuantificación del incremento de LC3 II en cardiomiocitos. Los valores graficados corresponden al promedio \pm SD. (n= 5). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs control.

6.5. La formación de vesículas autofágicas inducida por rosiglitazona es un efecto rápido en el cardiomiocito

Al analizar el curso temporal del efecto de rosiglitazona en la formación de vesículas autofágicas, se observó que a las 2 h de estímulo tanto rosiglitazona 10 μM como rapamicina 0,1 μM generaron un aumento significativo (Fig. 18A). Sin embargo, el efecto de rosiglitazona desapareció a las 8 h, para luego a las 24 h volver a aumentar significativamente respecto al control. A las 24 h incluso con rosiglitazona 5 μM hubo un aumento significativo (Fig. 18A). Al confirmar estos resultados mediante el procesamiento de LC3 endógeno, se observó que a las 2 h rosiglitazona (5 y 10 μM) y rapamicina (0,1 μM) aumentaron significativamente los niveles de LC3II respecto al control. Similar a lo observado mediante microscopía, a las 8 h de estímulo no se observaron diferencias significativas, sin embargo, luego de 24 h se volvió a observar un aumento significativo con rosiglitazona 10 μM y rapamicina 0,1 μM (Fig. 18B-C).

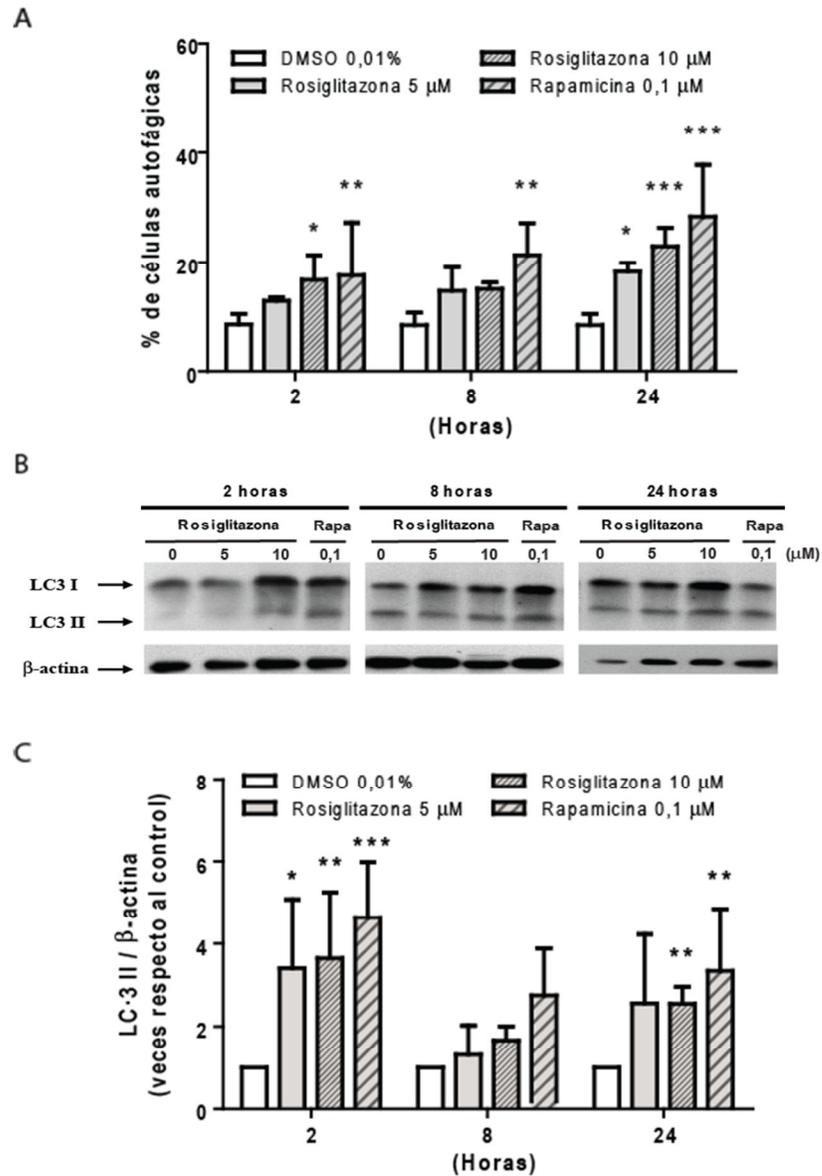


Figura 18: Evaluación temporal de la inducción de autofagia en cardiomiocitos. Las células se estimularon con rosiglitazona 5 y 10 μ M o rapamicina 0,1 mM, utilizando DMSO 0,01% como vehículo, por 2, 8 y 24 h. (A) Cuantificación del porcentaje de células autofágicas en cardiomiocitos transducidos con el adenovirus LC3-GFP. El gráfico muestra la cuantificación del porcentaje de células que presentan vesículas autofágicas después del tiempo señalado. (B) Western blot para LC-3 B. Se utilizó anticuerpo anti-LC3B (1:1000) y anti beta-actina como control de carga (1:5000). (C) Cuantificación del incremento de LC3 II en cardiomiocitos después de ser estimulados por el tiempo señalado. Los valores graficados corresponden al promedio \pm SD. n= *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001 vs DMSO 0,01% por análisis de ANOVA. (n= 3-5)

6.6. Degradación de LC3-GFP en cardiomiocitos estimulados con rosiglitazona

Producto de la fusión entre el lisosoma y el autofagosoma, el contenido de este último, incluyendo LC3 es degradado (Fig. 14). Shvets y *co/s.* aprovechando este evento, mediante citometría de flujo mostraron que la intensidad de la fluorescencia de GFP-LC3 se reducía durante la inducción de autofagia por rapamicina de manera dependiente del tiempo¹¹⁷. Shvets y *co/s.* mostraron además que la degradación de GFP-LC3 es inhibida por 3-metiladenina (3-MA), un inhibidor de la autofagia¹¹⁶. Siguiendo la misma metodología, se estudió si rosiglitazona aumentaba la degradación de GFP-LC3. La Figura 19A muestra que rapamicina 0,1 μM disminuyó la intensidad de fluorescencia en cardiomiocitos transducidos con el adenovirus GFP-LC3 a las 24 h de estímulo. Sin embargo, este efecto no se observó a las 2 u 8 h ni tampoco en respuesta a rosiglitazona 10 μM en ninguno de los tiempos observados (Fig. 19B-D). La 3-MA no modificó la degradación de GFP-LC3 a las 2 h de tratamiento (Fig. 19B), pero a las 8 h incrementó significativamente la fluorescencia en los cardiomiocitos controles y de los estimulados con rosiglitazona 10 μM , lo que da cuenta de la inhibición del proceso de degradación de LC3 (Fig. 19C). Si bien en las células tratadas con rapamicina 0,1 μM por 8 h no hubo inducción significativa de la degradación de GFP-LC3, tampoco aumentó la fluorescencia al adicionar 3-MA como en el caso control, lo que nos sugiere un aumento en el proceso de autofagia pero no en la degradación (Fig. 19C). Esto se corroboró con el resultado obtenido a las 24 h pues hubo una disminución significativa de la degradación de GFP-LC3 en cardiomiocitos tratados con rapamicina 0,1 μM más 3-MA, pero que es significativamente menor al obtenido en los cardiomiocitos sólo con 3-MA (Fig. 19D).

Para determinar si rosiglitazona modula la degradación de GFP-LC3 inducida por rapamicina, se trataron cardiomiocitos con ambos compuestos. Los resultados obtenidos muestran que rosiglitazona 10 μM no afectó la acción de rapamicina en presencia o ausencia de 3-MA en ningún tiempo ensayado (Fig. 19B-D).

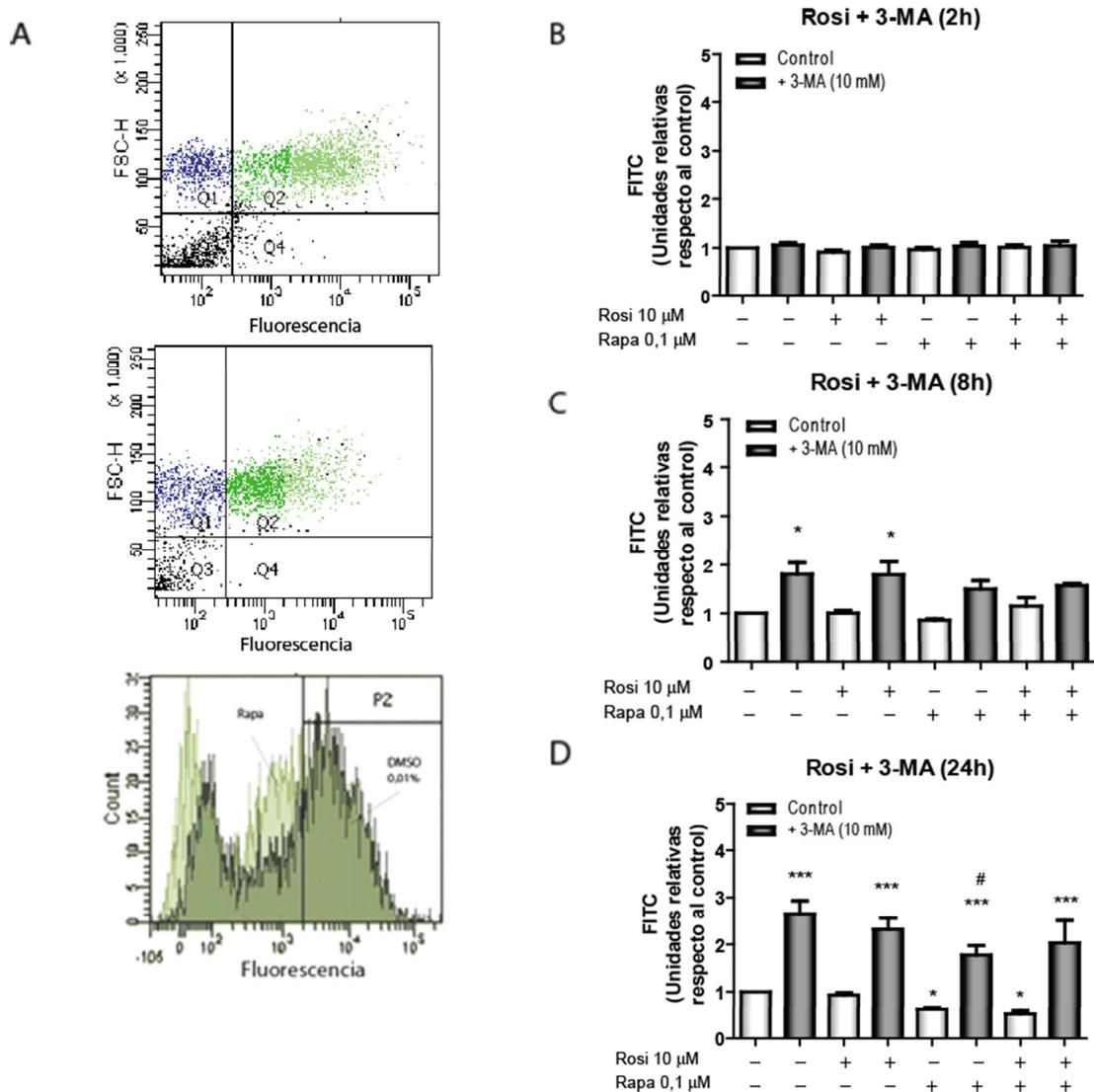


Figura 19: Degradación de LC3-GFP en los cardiomiocitos. Las células se transdujeron con el adenovirus LC3-GFP por 24 h y posteriormente se estimularon con rosiglitazona 10 μ M, rapamicina 0,1 mM ó 3-MA 10 mM, utilizando DMSO 0,01% como vehículo, por 2, 8 y 24 h. (A) Cuantificación de la fluorescencia en unidades relativas de LC3-GFP e histograma de la fluorescencia relativa versus número de células, en cardiomiocitos tratados con rapamicina 0,1 mM. (B-D) Cuantificación de la fluorescencia en unidades relativas en cardiomiocitos transducidos con el adenovirus LC3-GFP y estimulados por 2 (B), 8 (C) o 24 h (D). Los valores graficados corresponden al promedio \pm SD. N = * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs DMSO 0,01% por análisis de ANOVA. (n= 3-5)

6.7. Efecto de la inhibición de la autofagia en la viabilidad del cardiomiocito tratado con rosiglitazona

Los resultados de la primera parte de esta tesis mostraron que rosiglitazona no afecta la viabilidad del cardiomiocito. Sin embargo, debido a los antecedentes de la literatura y de nuestro Laboratorio que señalan que la autofagia podría ser tanto un mecanismo de muerte como de supervivencia celular, se investigó los efectos de rosiglitazona en la viabilidad de los cardiomiocitos cuando estaba inhibida su autofagia. Para este objetivo, se determinó la viabilidad mediante incorporación de yoduro de propidio en cardiomiocitos tratados con rosiglitazona 10 μM , rapamicina 0,1 μM o rosiglitazona más rapamicina en presencia o ausencia de 3-MA, a las 2 y 24 h (Fig. 20). Los resultados muestran que sólo el tratamiento con 3-MA indujo la muerte celular de manera significativa a las 24 h de tratamiento (Fig. 20C), consistente con los antecedentes antes descritos que sugieren a la autofagia como un mecanismo de supervivencia del cardiomiocito. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, rosiglitazona no afectó la viabilidad del cardiomiocito ni tampoco la previno en presencia de 3-MA.

6.8. Producción de ATP en cardiomiocitos estimulados con rosiglitazona

Nuestro Laboratorio ha mostrado el papel de la autofagia en la mantención de los niveles de ATP⁷⁶. Debido a esto se investigó si la inducción de autofagia mediada por rosiglitazona se relaciona con variaciones en los niveles de ATP en el cardiomiocito. Los resultados mostraron que rosiglitazona 10 μM o rapamicina 0,1 μM no modificaron significativamente los niveles de ATP en el cardiomiocito a los tiempos evaluados (Fig. 21).

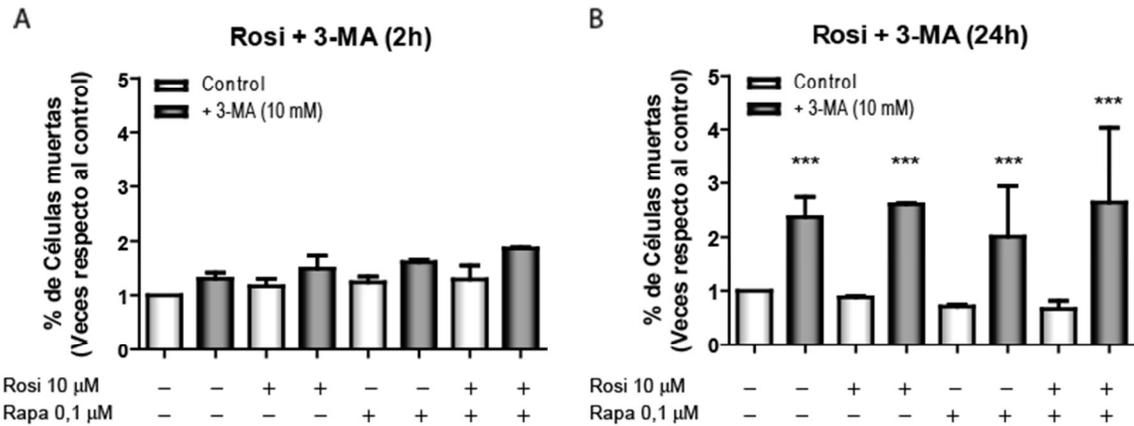


Figura 20: Efecto de 3-MA en la viabilidad del cardiomiocito. Cardiomiocitos (100,000 células/cm²) se estimularon con rosigitazona 10 μ M, rapamicina 0,1 mM ó 3-MA 10 mM, utilizando DMSO 0,01% como vehículo, por 2 (A) y 24 h (B). El porcentaje de células muertas se determinó mediante incorporación de PI en cardiomiocitos no permeabilizados y detectados por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de células muertas \pm DS (n=3 en duplicado). ***p<0,001 vs control por ANOVA.

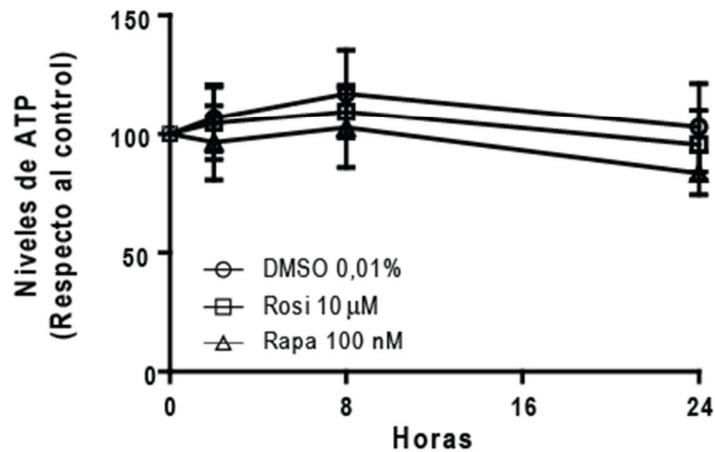


Figura 21: Producción de ATP en cardiomiocitos tratados con rosigitazona o rapamicina. Cardiomiocitos se estimularon con rosigitazona 10 μ M o rapamicina 0,1 mM utilizando DMSO 0,01% como vehículo, por 2, 8 y 24 h. La cantidad de ATP se determinó por una reacción quimioluminiscente, utilizando el kit celltiter-Glo

6.9. Efecto de rosiglitazona en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés nutricional (privación de nutrientes)

Nuestro grupo ha mostrado que el estrés nutricional por privación de nutrientes disminuye la viabilidad del cardiomiocito, lo que se ha relacionado con la inducción de autofagia⁷⁶. Además, la inhibición de esta mediante 3-MA ha demostrado disminuir aún más la viabilidad celular, lo que se sugiere que la autofagia es un mecanismo protector frente a estos estímulos. Como se ha demostrado anteriormente, rosiglitazona induce la formación de vesículas autofágicas, por lo que se estudió cuál era su efecto frente al estrés nutricional. Con este propósito, cardiomiocitos se estimularon con rosiglitazona 10 μ M por 24 h y posteriormente se mantuvieron en tres condiciones de estrés nutricional: i) por privación de suero (EM-S); ii) por privación de glucosa (EN-Glu); y iii) por privación de aminoácidos (EN-Aa). La viabilidad se comparó frente a una situación control con medio completo (MC; 2,5% SFB). Como se observa en la Figura 22, la privación de nutrientes aumentó significativamente la muerte de los cardiomiocitos, efecto que no fue prevenido por rosiglitazona 10 μ M ni tampoco por rapamicina 0,1 μ M o por el tratamiento conjunto de rosiglitazona y rapamicina (Fig. 23).

6.10. Efecto de la privación de nutrientes sobre la actividad de PPAR γ .

Con el fin de poder aproximarse a determinar el vínculo que pudiera existir entre la activación de PPAR γ y la autofagia, se investigó si la privación de nutrientes modula la actividad de este PPAR. Al comparar la actividad de luciferasa en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio reportero de PPAR, y sometidos a privación de nutrientes, se observó que esta actividad no se modificó en cardiomiocitos privados de aminoácidos (EN-Aa). Sin embargo, la actividad luciferasa fue significativamente mayor en los cardiomiocitos privados de aminoácidos y tratados con rosiglitazona 10 μ M que aquellos cultivados en medio completo (MM + 2,5% SFB) (Fig. 24A). Los cardiomiocitos mantenidos en medio privados de glucosa (EN-Glu) en ausencia de rosiglitazona no muestran diferencias con los mantenidos en medio completo, lo que tampoco cambió de manera significativa en presencia de rosiglitazona. Estos resultados indicarían una inhibición de la actividad de PPAR γ en un medio privado de glucosa, sin embargo, al normalizar la

actividad de PPAR γ por cada situación control independientemente, rosiglitazona indujo significativamente la actividad de PPAR γ (Fig. 24B) en cada uno de las condiciones de igual manera.

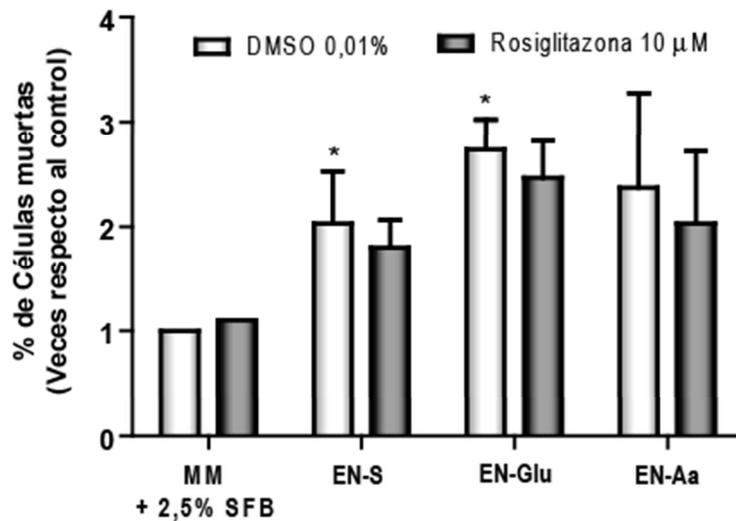


Figura 22: Efecto del estrés nutricional por privación de suero, glucosa y aminoácidos en la viabilidad del cardiomiocito. Las células se estimularon con rosiglitazona 10 μ M, rapamicina 0,1 mM o ambos estímulos, utilizando DMSO 0,01% como vehículo, en medios completo (MC; MM+ 2,5% SFB), medio sin suero (EM-S), medio sin glucosa (EM-Glu) y medio sin aminoácidos (EM--Aa). El porcentaje de células muertas se determinó mediante incorporación de PI en cardiomiocitos no permeabilizados y detectados por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de células muertas \pm DS (n=3 en duplicado). *p<0,01, ***p<0,001 vs DMSO MC por ANOVA

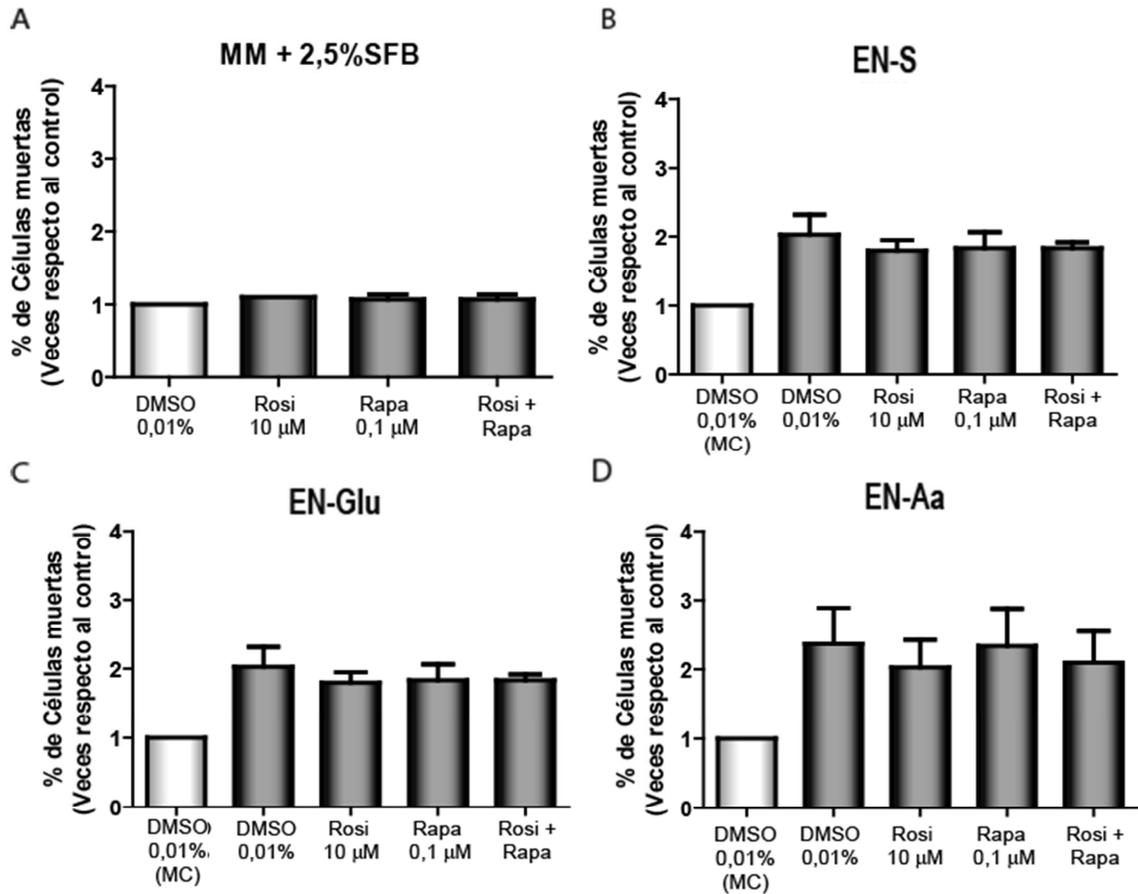


Figura 23: Efecto de rosiglitazona sobre el estrés nutricional por privación de suero, glucosa y aminoácidos en la viabilidad del cardiomiocito. Las células se estimularon con rosiglitazona 10 μM, rapamicina 0,1 mM o ambos estímulos, utilizando DMSO 0,01% como vehículo, en medios completo (MC; MM+ 2,5% SFB), (A); medio sin suero (MM; EN-S) (B); medio sin glucosa (RPMI; EN-Glu) (C); y medio sin aminoácidos (EBSS; EN-Aa) (D). El porcentaje de células muertas se determinó mediante incorporación de PI en cardiomiocitos no permeabilizados y detectados por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de células muertas ± DS (n=3 en duplicado). **p<0,01, ***p<0,001 vs DMSO MC por ANOVA.

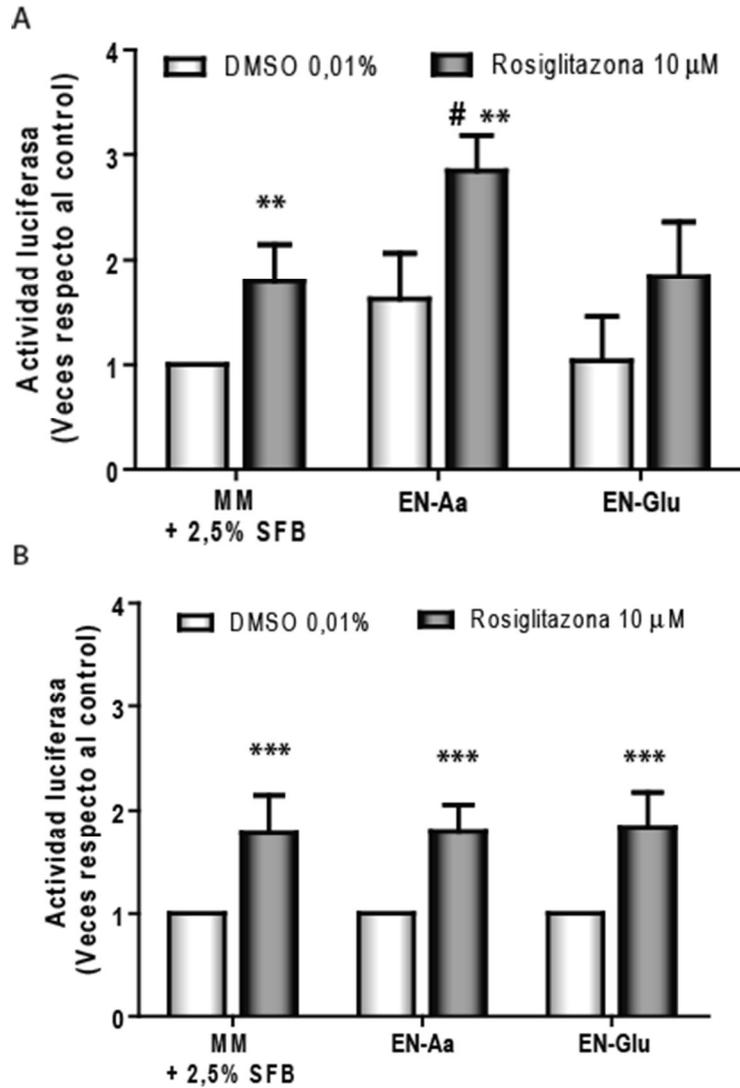


Figura 24: Efecto del estrés nutricional por privación de nutrientes en la actividad de PPAR γ en el cardiomiocito. Las células se transfectaron con 1 μ g de plasmidio PPRE(AOX)3-Tk-fLuc con 100 ng de plasmidio Tk-rLuc como control de transfección. Las células se mantuvieron en medios MM + 2,5% SFB, en medio sin aminoácidos (EBSS: EN-Aa) o en medio sin glucosa (RPMI: EN-Glu) y estimuladas con DMSO 0,01% o rosiglitazona 10 μ M por 24 h. El gráfico (A) muestra la razón entre las actividades de luciferasa (RLU) de firefly y renilla, normalizados respecto al control con MM + 2,5% SFB. El gráfico (B) muestra la razón entre las actividades de luciferasa de cada grupo normalizados respecto a su respectivo control con DMSO 0,01%. Los valores mostrados corresponden al promedio de la actividad de luciferasa respecto al control \pm SD. ** p <0,01, *** p <0,001 vs DMSO 0,01%; # p <0,05 vs MM+5%SFB + rosiglitazona, por análisis de ANOVA. n = 3 en triplicado.

6.11. Efecto de rosiglitazona en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.

Nuestro laboratorio ha mostrado que el estrés hiperosmótico induce la muerte en el cardiomiocito de forma rápida y potente^{54,55}, efecto que es prevenido con el pretratamiento con IGF-1⁵⁶. De acuerdo con estos antecedentes, se determinó si la activación de PPAR γ con el ligando rosiglitazona tenía algún efecto en la muerte del cardiomiocito inducida por el estrés hiperosmótico. Los resultados muestran que Rosiglitazona 10 μ M no previno la muerte del cardiomiocito, distinto a lo observado con el pretratamiento con IGF-1 10 nM (Fig. 25 A, Fig. anexo 1). Estos resultados contrastan con los antecedentes recientes que muestran la participación de PPAR γ en la modulación de la apoptosis cardiomiocitos¹²⁷⁻¹³⁰. Con el propósito de dilucidar si PPAR γ modula la apoptosis se analizó este proceso mediante la incorporación de yoduro de propidio en células fijadas y permeabilizadas con metanol y se evaluó la población Sub-G1, indicativo de la condensación del DNA. Similar a lo obtenido anteriormente por nuestro laboratorio, se observó que la exposición por 8 h a estrés hiperosmótico i aumentó significativamente la apoptosis, efecto que no fue prevenido por rosiglitazona (Fig. 25 B). Estos resultados fueron además corroborados por la determinación de caída de potencial mitocondrial de cardiomiocitos mediante microscopía confocal, tal como se ha descrito en nuestro Laboratorio¹²¹. La Figura 25C muestra que el estrés hiperosmótico produjo una rápida caída de la fluorescencia relativa de la tetrametilrodamina (TMRM) comparado con las células sin estimular. El tratamiento previo por 24 h con rosiglitazona 10 μ M no afectó la caída de potencial mitocondrial inducida por el estrés hiperosmótico. Similares resultados se obtienen al analizar la caída de la fluorescencia relativa mediante citometría de flujo (Fig. 29B-C). Al determinar el efecto sobre la necrosis del cardiomiocito, se obtienen los mismos resultados (Fig. Anexo 6)

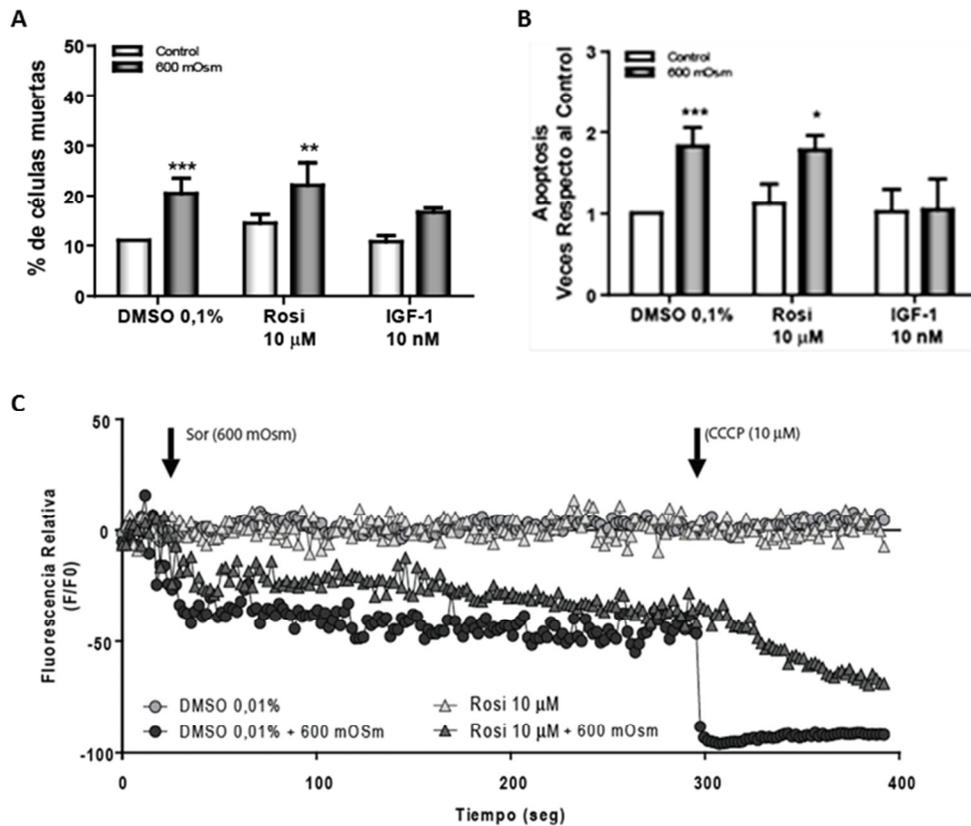


Figura 25: Efecto del pretratamiento con rosiglitazona sobre la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico. (A) Cardiomiocitos se trataron por 24 h con Rosi (10 μ M) o con IGF-1 (10 nM) por 30 min. y posteriormente expuestos a 600 mOsm por 8 h. La viabilidad se determinó por incorporación de yoduro de propidio al DNA en células no permeabilizadas y se cuantificó por citometría de flujo. (B). Las células se trataron por 24 h con Rosi (10 μ M) y posteriormente expuestas a 600 mOsm por 8 h. La fragmentación del DNA se determinó por incorporación del yoduro de propidio (PI) en células permeabilizadas por citometría de flujo. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de células muertas \pm DS (n=3 en duplicado). *P<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs control por ANOVA. (C) El decaimiento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) se determinó en cardiomiocitos tratados con Rosi (10 μ M) por 24 h y luego cargados con tetrametilrodamina (TMRM). (A) Fluorescencia determinada por microscopía confocal. Las células se estimularon con sorbitol 600 mOsm, adicionado al tiempo indicado (primera flecha) y por los tiempos indicados. CCCP: carbonil cianida-m-clorofenilhidrazona.

6.12. Efecto del estrés hiperosmótico sobre la actividad de PPAR γ .

Los resultados mostrados hasta ahora indican que PPAR γ está presente en el cardiomiocito y que es transcripcionalmente activo al ser estimulado con rosiglitazona. Sin embargo, la activación de PPAR γ carece de un efecto protector en cardiomiocitos sometidos a estrés hiperosmótico ya que no previene la muerte por apoptosis o necrosis en estas células. A fin de determinar si la actividad de PPAR γ podría ser afectada por el estrés hiperosmótico, los cardiomiocitos se transfectaron con el plasmidio reportero para PPAR, y posteriormente estimulados con rosiglitazona 10 μ M. Los resultados muestran que la actividad basal de PPAR γ no se modificó en los cardiomiocitos expuestos a 4 h de estrés hiperosmótico. Sin embargo, la actividad de PPAR γ se inhibió en los cardiomiocitos pre-estimulados con rosiglitazona por 24 h y luego expuestos por 4 h a estrés hiperosmótico al ser comparada con el control (Fig. 26).

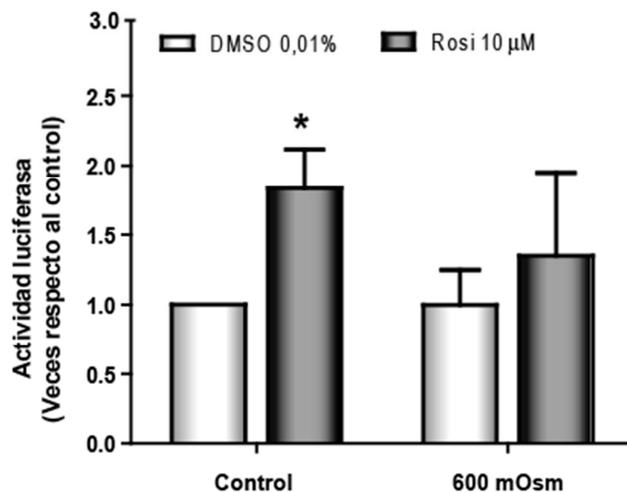


Figura 26: Actividad de PPAR γ en cardiomiocitos expuestos a estrés hiperosmótico. Cardiomiocitos se transfectaron con 1 μ g de plasmidio PP RE-(AOX) $_3$ -Tk-rLuc y con 100 ng de plasmidio Tk-rLuc como control de transfección. Las células se trataron con Rosi (10 mM) o con DMSO 0,01% como vehículo por 24 h y posteriormente expuestas a estrés hiperosmótico (600 mOsm) por 4 h. El gráfico muestra la razón entre las actividades relativas de luciferasa (RLU) de *firefly* y *renilla*, normalizados respecto al control (DMSO 0,01% para Rosi). Los valores graficados corresponden al promedio de las RLU respecto al control \pm DE. * $p < 0,05$ vs DMSO por análisis de ANOVA. $n = 3$ en triplicado

6.13. Efecto de rosiglitazona sobre la viabilidad del cardiomiocito sometido a isquemia y reperfusión

La isquemia (I) del miocardio genera una muerte celular extensa por hipoxia y por falta de nutrientes y de factores protectores presentes en la sangre. En la reperfusión (R), proceso que sigue a la isquemia, diversos metabolitos se acumulan en el medio externo generando un ambiente extracelular hiperosmótico similar a lo que ocurre en el coma diabético y sepsis. Existe evidencia que indica que los distintos componentes de la I/R (hipoxia, privación de glucosa y estrés hiperosmótico) causan apoptosis del cardiomiocito^{54,131,132}. Además se ha descrito que durante la isquemia existe inducción de la autofagia y que ésta podría modular la viabilidad del cardiomiocito¹³³. Por otra parte, en distintos modelos de infarto al miocardio y de isquemia *in vivo* se ha observado que la expresión y actividad de los PPARs disminuyen y que los ligandos de PPAR α y PPAR γ , disminuyen el área infartada y el daño producido por los eventos de I/R en el corazón¹³⁴. Basándose en los antecedentes mencionados, se estudió el efecto de rosiglitazona en cardiomiocitos expuestos a isquemia-reperfusión simulada, para lo cual fue necesario estandarizar las condiciones de isquemia y reperfusión en nuestro laboratorio.

De resultados obtenidos en nuestro laboratorio se determinó que 6 h de isquemia disminuye significativamente la viabilidad del cardiomiocito (Fig. Anexo 7). Para investigar si rosiglitazona afecta la viabilidad de los cardiomiocitos sometidos a isquemia y reperfusión simulada, las células se pretrataron por 24 h con rosiglitazona 5, 10 y 20 μ M, seguido de 6 h de isquemia y 4 h de reperfusión. La Figura 27 muestra que a las concentraciones probadas, rosiglitazona no ejerce ningún efecto significativo sobre la viabilidad del cardiomiocito sometidos a isquemia y reperfusión.

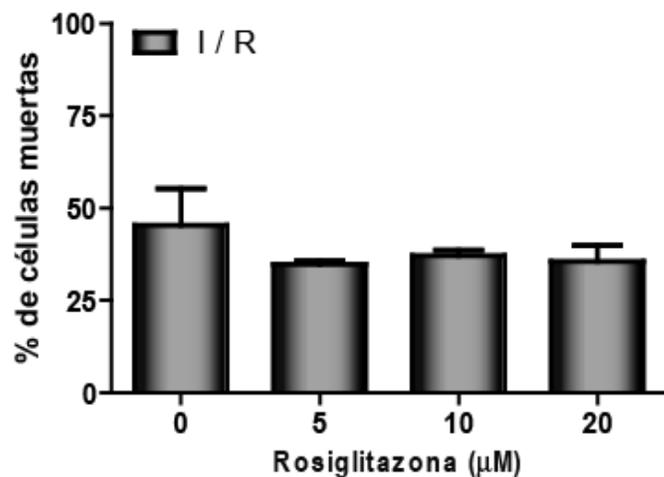


Figura 27: Efecto de rosiglitazona sobre la viabilidad del cardiomiocito sometido a isquemia y reperfusión. Cardiomiocitos se privaron de suero por 24 h, posteriormente se pretrataron por 24 h con Rosiglitazona 5, 10 y 20 mM seguido de 6 h de isquemia y 4 h de reperfusión. La determinación del porcentaje de células muertas se obtuvo al cuantificar las células permeables al azul tripán. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de células muertas \pm DS (en triplicado). * $p < 0,01$ vs control por ANOVA.

7. DISCUSION

La resistencia a insulina se ha considerado como el principal factor de las perturbaciones metabólicas que predispone al paciente a hipertensión arterial, hiperlipidemia, aterosclerosis prematura, hipertrofia ventricular y disfunción endotelial². Además de ser un poderoso factor de riesgo cardiovascular, la resistencia a insulina se relaciona estrechamente con la disfunción e insuficiencia cardíaca². Las tiazolidinedionas son fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina mejorando los componentes de la resistencia a la insulina en pacientes con síndrome metabólico². La rosiglitazona, una TZD aprobada por la FDA en 1999 para el tratamiento de la hiperglicemia, ha demostrado ser eficiente en la reducción de los niveles de la glicemia y de hemoglobina glicosilada, así como también en el aumento de las HDL y disminución de triglicéridos y de la hipertensión arterial³⁻⁶. Sin embargo, recientemente algunos estudios han revelado que rosiglitazona (Avandia®) incrementa el riesgo de infarto al miocardio y el riesgo de muerte por causas cardiovasculares en pacientes diabéticos⁷, generando gran controversia respecto a los efectos positivos o negativos de las TZD sobre la función miocárdica.

Rosiglitazona es un agonista de PPAR γ y sus efectos protectores^{17,28,29,33,34,135} y deletéreos^{7,18,19,136,137} a nivel cardíaco han sido determinados tanto en humanos como en animales de experimentación. Sin embargo, aún no están claros los mecanismos por los que los agonistas de PPAR γ podrían ejercer estas contrapuestas acciones a nivel cardiovascular, aunque la evidencia demuestra su participación en el remodelado cardíaco inhibiendo los procesos inflamatorios^{10,11,38,39} y la hipertrofia^{17,28,29,33} y aumentando la viabilidad^{16,127,130,138} del cardiomiocito.

El estudio de los mecanismos involucrados en la muerte del cardiomiocito ha sido el objetivo de bastantes grupos de investigación en los últimos años, los que se han centrado en la participación de la apoptosis, la necrosis y recientemente de la autofagia^{15,41-44}.

Esta tesis tuvo por objetivo evaluar si rosiglitazona induce autofagia en el cardiomiocito y si ésta modifica su viabilidad cuando se expone a estrés hiperosmótico o nutricional.

Los principales resultados obtenidos en el presente trabajo fueron:

1. El PPAR γ está presente en el cardiomiocitos de ratas demostrado por Western blot e inmunofluorescencia. Además su estimulación por rosiglitazona estimula su actividad transcripcional.
2. Rosiglitazona estimula la formación de vesículas autofágicas y el procesamiento de la proteína LC3 en el cardiomiocito, sin afectar la autofagia inducida por rapamicina.
3. La inducción de la autofagia inducida por rosiglitazona no afecta la viabilidad del cardiomiocito. Sin embargo, la inhibición de la autofagia por 3-metiladenina o el estrés nutricional (privación de suero, glucosa y aminoácidos) indujo la muerte del cardiomiocito.
4. La actividad de PPAR γ inducida por rosiglitazona aumenta significativamente en condiciones de estrés nutricional por privación de aminoácidos.
5. Rosiglitazona no previno la muerte por apoptosis o necrosis del cardiomiocito inducida por el estrés hiperosmótico o isquemia/reperfusión simulada. .
6. Rosiglitazona activó al factor transcripcional PPAR γ en el cardiomiocito, la cual fue atenuada por el estrés hiperosmótico..

7.1. Presencia y actividad de PPAR γ en el cardiomiocito

La expresión de PPAR γ está limitada a un número reducido de tejidos, principalmente a los tejidos adiposo y vascular^{8,9}. Sin embargo, también se ha descrito su presencia en el tejido cardiaco¹⁴⁻¹⁹. Nuestro trabajo corroboró que el PPAR γ está presente en el cardiomiocito de rata (Fig. 10) y es biológicamente activo ya que rosiglitazona mostró que aumenta la actividad transcripcional de un plasmidio reportero que contenía el elemento de respuesta a PPAR (PPRE) (Fig. 11). Estos hallazgos son consistentes con lo

descrito por diversos investigadores que han mostrado que la estimulación con agonistas de PPAR γ induce la expresión de este receptor tanto en cardiomiocitos como en otros tipos celulares^{19,112,115}. PPAR γ presenta dos isoformas, PPAR γ 1 y PPAR γ 2, cuya diferencia radica en 30 aminoácidos adicionales que presenta en su extremo amino terminal la isoforma γ 2. Esta diferencia se debe a la utilización de un promotor alternativo y “splicing” diferencial^{112,139,140}. PPAR γ 1 es la isoforma predominante en todos los tejidos que presentan PPAR γ , excepto en el adipocito, donde la isoforma predominante es PPAR γ 2. Sin embargo, también se ha descrito la presencia de PPAR γ 2 en tejido cardiaco de algunas especies^{18,19}. La presencia de PPAR γ 1 se ha vinculado con una serie de efectos metabólicos y antiinflamatorios tanto en corazón como en cardiomiocitos aislados. La activación del PPAR γ incrementa la expresión miocárdica de transportadores de glucosa, promoviendo la utilización de carbohidratos y disminuyendo la utilización de ácidos grasos en el corazón. El PPAR γ disminuye la expresión de citocinas, agentes proinflamatorios y moléculas de adhesión celular^{14-21,23,141} y además se le ha relacionado con la regulación de la hipertrofia cardiaca^{136,142-147}.

7.2. Rosiglitazona y autofagia del cardiomiocito

La autofagia es reconocida como un mecanismo de supervivencia durante el estrés metabólico y privación de nutrientes. La célula utiliza la autofagia para reciclar materia prima a través de la degradación de material citoplasmático¹²²⁻¹²⁴. Trabajos previos en nuestro Laboratorio han mostrado que la privación de glucosa, aminoácidos o suero generan características morfológicas típicas de autofagia, evaluadas por microscopía electrónica⁷⁶. En este trabajo evaluamos la autofagia usando distintas metodologías. En primer lugar, se realizó una transducción adenoviral de la proteína GFP-LC3, para poder evaluar la redistribución de esta proteína exógena a un patrón punteado como marcador de la presencia de los autofagosomas. Estos hallazgos se confirmaron mediante el procesamiento de la proteína GFP-LC3 exógena como endógena por Western blot. Finalmente para evaluar el grado de ejecución del proceso de autofagia se evaluó la desaparición de la proteína exógena GFP-LC3 como marcador de la degradación en los autolisosomas mediante citometría de flujo. Como control se observó que el estrés nutricional por privación de suero activó la autofagia evaluada por la redistribución

punteada de la proteína exógena GFP-LC3 en los cardiomiocitos transducidos con el Ad-GFP-LC3, efecto que no se observó en los cardiomiocitos expuestos a bajas concentraciones de suero (SFB 2,5%). También la estimulación con rapamicina incrementó la distribución punteada de GFP-LC3 y disminuyó la fluorescencia de GFP-LC3 en los cardiomiocitos transducidos con el Ad-GFP-LC3 e incrementó el procesamiento de LC3-I endógeno, tal como se esperaba como control positivo durante este trabajo. Teniendo un modelo funcional de inducción de autofagia y la reciente evidencia que indica que la activación de PPAR γ está involucrada la regulación de este proceso se estudió si rosiglitazona inducía la autofagia en el cardiomiocito.

Nuestros resultados indican que rosiglitazona indujo el procesamiento de la proteína endógena LC3-I en el cardiomiocito, así como también estimuló un patrón punteado de la proteína exógena GFP-LC3 en cardiomiocitos transducidos con el Ad-GFP-LC3. Estos resultados son consistentes con los antecedentes de la literatura, que muestran que rosiglitazona y otros agonistas de PPAR γ pueden inducir la autofagia en otros tipos celulares como en líneas celulares de cáncer de próstata¹¹², células de neuroblastoma¹¹³, células de cáncer de mama¹¹⁴ y en tejido hepático¹¹⁵. Los mecanismos por los que agonistas de PPAR γ inducen la autofagia se desconocen por completo, sin embargo, Zhou y cols. determinaron mediante un análisis de microarray el perfil de los genes regulados por PPAR γ obteniendo un aumento en la expresión de genes involucrados en angiogénesis, proliferación y crecimiento, metabolismo y en procesos de adhesión y migración¹¹⁴. Así mismo, los resultados indicaron que de los genes involucrados en angiogénesis, el factor transcripcional HIF1 α era requerido para la inducción de la autofagia inducida por la activación de PPAR γ por rosiglitazona en células epiteliales mamarias¹¹⁴. Recientemente se ha publicado que tapsigargina induce la autofagia del condrocito mediante la activación de AMPK y subsecuente inhibición de mTOR, evidenciando que la activación de AMPK requiere de HIF1 α ¹⁴⁸, quien podría estar siendo activado por PPAR γ .

7.3. Rosiglitazona y las vías de transducción de la autofagia

Las vías transduccionales que regulan la autofagia son altamente dependientes de una serie de cascadas de fosforilaciones^{58,72,85}. Entre estas, de gran importancia es la vía PI3K/AKT/mTOR. La privación de nutrientes^{58,78}, la acción de rapamicina⁷² o activación de AMPK^{85,148} inhibe la actividad kinasa de mTOR gatillando la inducción de la autofagia.

En el presente trabajo se observó que la formación de vesículas autofágicas inducida por la estimulación con rosiglitazona es un proceso que se visualiza desde las 2 h de tratamiento. Estos hallazgos coinciden con algunos datos de la literatura que han demostrado que la formación de vesículas autofágicas en el cardiomiocito puede comenzar tempranamente dependiendo de si son sometidos a estrés por privación de nutrientes⁸⁶ o isquemia y reperfusión simulada^{86,149}. Este resultado sugiere que al estimular los cardiomiocitos con rosiglitazona, se activan rápidamente mecanismos que inducen la autofagia, tales como AMPK o PI3K^{86,132}, lo que se ha demostrado en otros tipos celulares¹⁵⁰⁻¹⁵³. Hasta la fecha no existe evidencia que relacione directamente la vía PI3K/AKT/mTOR, una de las principales vías de regulación autofágica, con la autofagia inducida por agonistas de PPAR γ . Sin embargo, existen bastantes antecedentes que indican que agonistas de este receptor pueden estar modulando la actividad de las enzimas involucradas en esta vía. Así se ha demostrado que en células de cáncer de pulmón (NSCLC) rosiglitazona reduce la fosforilación de Akt, mediante la activación de PPAR γ ¹⁵⁰. Así mismo, rosiglitazona induce la fosforilación de AMPK e inhibe la fosforilación de p70S6K a través de vías independientes de la activación de PPAR γ ^{150,152,153}.

Por otro lado, troglitazona, otro agonista de PPAR γ , ha sido implicado en la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la disminución de la actividad de p70-S6K en células del endotelio de la aorta de bovinos (BAEC). Más aún, el tratamiento en conjunto con rapamicina y troglitazona aumentó los efectos, sugiriendo que los efectos inhibitorios mediados por troglitazona son independientes de mTOR. Los efectos de troglitazona, que fueron similares a los de otras TZD, son mediados por la activación de la PP2A, e independientes a la activación de PPAR γ ¹⁵⁴. En células de ovario de hámster

chino (CHO), troglitazona incrementó la translocación nuclear del factor de PDK1 (proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositido-1) lo que llevó a una disminución en la fosforilación de p70-S6K y de mTOR¹⁵⁵. Por otro lado, Han y Roman¹⁵⁰ informaron que rosiglitazona potencia el efecto de rapamicina en la inhibición de la proliferación en células de cáncer de pulmón. Estos efectos no fueron completamente bloqueados con el antagonista de PPAR γ , GW9662, sugiriendo otros mecanismos involucrados en la inhibición del crecimiento mediados por rosiglitazona, también independientes de activación de PPAR γ ¹⁵⁰. Estos antecedentes indican que agonistas de PPAR γ pueden mediar su efecto de manera dependiente o independiente a la actividad de PPAR γ . En la presente tesis se evidenció directamente la participación de PPAR γ en la inducción de autofagia pero no se exploraron los mecanismos. Futuros experimentos serán necesarios para determinar la participación de PPAR γ y vía PI3K/AKT/mTOR en la inducción de la autofagia en cardiomiocito estimulados con rosiglitazona.

Otra vía que se ha descrito que participa en la regulación de la autofagia es la que involucra al factor transcripcional NF κ B. Este factor transcripcional coordina varios aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, inflamación sobrevivida celular y proliferación¹⁵⁶. Se han asociado alteraciones en la vía de NF κ B, con el desarrollo y la progresión del cáncer así como a un gran número de patologías inflamatorias¹⁵⁶. Estudios recientes han mostrado que en diversas líneas células la activación de NF κ B inducida por el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) inhibe la autofagia. Cuando NF κ B es inhibido, TNF α induce autofagia lo que contribuye a la muerte celular por apoptosis¹⁵⁷. Resultados similares han sido obtenidos por Fabre y cols. en los que la inhibición de NF κ B sensibiliza a células mielomonocíticas, para la muerte celular inducida por estrés nutricional¹⁵⁸. El mecanismo por el que NF κ B inhibe la autofagia no está del todo aclarado, sin embargo se ha determinado que está involucrada la activación de mTOR¹⁵⁷. Estos resultados son interesantes considerando que muchos de los efectos descritos para PPAR γ a nivel cardiovascular son atribuidos a la capacidad de este receptor de inhibir la acción de NF κ B compitiendo por la unión al DNA en el elemento de respuesta de estos factores transcripcionales^{17,27,29,33}. Estudios posteriores serían interesantes para poder dilucidar si ambas vías se comunican en la regulación de la autofagia en el cardiomiocito.

Los antecedentes mencionados indican cuáles son las posibles vías que podrían estar involucradas en la inducción de la autofagia por rosiglitazona y la posible vinculación de PPAR γ . Sin embargo tal como se mencionó anteriormente, serán necesarias nuevas investigaciones para determinar la participación de PPAR γ y vía PI3K/AKT/mTOR en la inducción de la autofagia en cardiomiocito estimulada por rosiglitazona, así como la posible regulación de la actividad de PPAR γ por esta vía.

7.4. Rosiglitazona y viabilidad del cardiomiocito

El efecto de los agonistas de PPARs en la viabilidad celular es bastante diverso. Existen antecedentes bastante variados dependiendo del tipo celular en los que agonistas de PPAR γ y PPAR α modulan la viabilidad celular, pasando de tener efectos citotóxicos^{112,113,159,160} a efectos protectores¹⁶¹⁻¹⁶³. Sin embargo sólo recientemente se han atribuido efectos de agonistas de PPAR γ en la viabilidad del cardiomiocito, los que han sido también controversiales^{16,127,130,138,164}. Barak y cols. fueron los primeros en vincular a PPAR γ con una acción a nivel cardiovascular, demostrando que el ratón “knockout” para este receptor presentaba deficiencia en la diferenciación del trofoblasto y la vascularización de la placenta, generando adelgazamiento del miocardio y muerte a los 10 días de desarrollo embrionario (E10.0)¹⁶⁴. Estos resultados mostraron que PPAR γ es requerido para el desarrollo de la placenta y del tejido cardíaco. Posteriormente Liu y cols. mostraron que la hipercolesterolemia incrementa la apoptosis miocárdica en conejos sometidos a isquemia y reperfusión mediante el incremento de factores proapoptóticos. Estos efectos eran atenuados significativamente por el tratamiento previo con rosiglitazona¹⁶. Otra evidencia que apoya el papel cardioprotector de agonistas de PPAR γ es el hallazgo que rosiglitazona disminuye la apoptosis inducida por estrés oxidativo en cardiomiocitos en cultivo¹³⁰. Además de las acciones antiapoptóticas de rosiglitazona, existe evidencia que muestra que el efecto cardioprotector no es exclusivo para este agonista de PPAR γ sino que también es observado en otros agonistas como pioglitazona y 15-dPGJ2¹³⁸.

En esta tesis se evaluó la capacidad cardioprotectora de rosiglitazona en la muerte celular inducida por estrés nutricional, estrés osmótico e isquemia-reperfusión simulada. En primer lugar, nuestros resultados muestran que rosiglitazona no ejerce efecto en la viabilidad celular basal del cardiomiocito. Lo mismo se observa con el tratamiento con

gemfibrozilo. Estos resultados son consistentes con antecedentes que muestran que estos fármacos son inocuos y no afectan la viabilidad en condiciones similares y que el efecto en condiciones basales se vincula a un efecto metabólico principalmente. Sin embargo, al analizar los niveles en la producción de ATP en las células tratadas con rosiglitazona, no se observaron diferencias significativas en las condiciones estudiadas.

Durante el desarrollo de la presente tesis, observamos un aumento en la generación de la formación de vesículas autofágicas al estimular los cardiomiocitos con rosiglitazona. Nuestro grupo y otros⁸⁶ han demostrado que en los cardiomiocitos la privación de nutrientes induce un aumento de la muerte celular que no presenta características de muerte del tipo autofágica, ya que al usar un inhibidor de la autofagia como 3-MA, ésta aumentaba, sugiriendo a la autofagia como mecanismo de sobrevivencia. Sin embargo, nuestros resultados no lograron asociar el aumento de la formación de vesículas autofágicas inducido por rosiglitazona con un aumento en la viabilidad del cardiomiocito cuando estos eran tratados con 3-MA. Los mismos resultados se obtuvieron en células tratadas con rapamicina. Estos resultados fueron confirmados al evaluar la viabilidad del cardiomiocito frente al estrés nutricional en presencia o ausencia de rosiglitazona. Tal como se ha descrito⁸⁶, el estrés nutricional por privación de suero, glucosa y aminoácidos aumenta la mortalidad de los cardiomiocitos, efecto que no es revertido ni potenciado por rosiglitazona. Estos antecedentes sugieren que la inducción de la autofagia mediada por rosiglitazona puede estar involucrada en otros procesos independientes de los mecanismos de sobrevivencia o muerte del cardiomiocito, similar a lo observado por Zhou y cols. en células de cáncer de mama¹¹⁴. Sin embargo estos antecedentes son contradictorios a los resultados de otras investigaciones que han descrito que la autofagia inducida por otros agonistas de PPAR γ se asocia a muerte más que a sobrevivencia^{112,113}.

7.5. Efecto de rosiglitazona en la viabilidad, apoptosis y necrosis del cardiomiocito sometido a estrés hiperosmótico e isquemia/reperfusión simulada.

Una característica de estados patológicos tales como isquemia, shock séptico y coma diabético son los cambios osmóticos del medio extracelular. Para tolerar los cambios en osmolaridad, las células han desarrollado mecanismos regulatorios de volumen celular, los cuales son activados por cambios osmóticos y cuya finalidad es normalizar el volumen

celular y mantener la función normal. En primera instancia, la regulación del volumen se lleva a cabo regulando el contenido iónico intracelular y en el largo plazo, la regulación incursa vía metabolismo y crecimiento⁵⁵. Se ha observado que durante un periodo en la isquemia del miocardio, el corazón sufre estrés hiperosmótico. En estudios previos de nuestro laboratorio, así como en la presente tesis se ha demostrado que el estrés hiperosmótico por sorbitol induce la muerte del cardiomiocito por apoptosis^{54,55}. Se ha publicado que este efecto es dependiente del osmolito utilizado y que además es más rápido y potente que otros estímulos apoptóticos descritos^{54,55}.

Existen antecedentes que indican que las proteínas kinasas ERK, p38-MAPK, JNK, y PI3K/Akt, involucradas en las vías traduccionales pro y anti-apoptóticas del cardiomiocito, pueden fosforilar a los PPARs lo que puede regular la actividad transcripcional de estos receptores de forma dependiente o independiente de la unión a su ligando^{165,166}. Las consecuencias moleculares de esta fosforilación pueden ser múltiples, incluyendo cambios en la afinidad por sus ligandos, unión al DNA, reclutamiento de otros factores y degradación por el proteosoma. Estos efectos ocurren de acuerdo al isotipo de PPAR estudiado, al estímulo dado y al contexto celular^{165,166}. Por otra parte, los antecedentes descritos en la literatura, señalan que tanto PPAR α como PPAR γ tienen un papel importante en la regulación de la apoptosis en distintos tipos celulares y ligandos de ambos receptores han mostrado tener propiedades tanto pro como antiapoptóticas dependiendo del contexto celular^{16,127,130,138,159-164}. Los mecanismos por los cuales PPAR pueden mediar la resistencia a la apoptosis parece involucrar a la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la regulación de la proteína proapoptótica Bak^{16,130}. Butts y cols. demostraron que el gen de Bcl-2 tienen un elemento de respuesta para PPAR γ , y que este receptor podría mediar la transcripción de este gen, aumentando los niveles de Bcl-2 y así proteger de la apoptosis¹⁶³. También se ha descrito que la regulación de p38-MAPK podría participar en los efectos antiapoptóticos mediados por PPAR α ¹⁶⁷ y de PPAR γ ¹⁶. Durante la isquemia/reperfusión hay un aumento de la activación de p38-MAPK¹⁶ y JNK¹⁶⁸, lo que gatilla la apoptosis. La estimulación con rosiglitazona inhibe dicha activación. Sin embargo, en nuestro trabajo, no evidenciamos ningún efecto en respuesta al tratamiento con rosiglitazona en los cardiomiocitos sometidos a estrés hiperosmótico. Esto fue analizado mediante cambios en la viabilidad, fragmentación nuclear (incorporación de PI en células permeabilizadas como marcador de apoptosis tardía), incorporación de PI en

células no permeabilizadas (como marcador de necrosis), y caída del potencial mitocondrial (por citometría y microscopía). En todas las situaciones, el estrés hiperosmótico ejerció efecto, el que no fue inhibido en ningún grado por rosiglitazona. Lo mismo ocurrió cuando las células fueron sometidas a isquemia-reperfusión, en la que rosiglitazona no inhibió la muerte celular. Una posible explicación para la carencia de este efecto puede ser la actividad de PPAR γ . Si bien demostramos que este receptor está presente en el cardiomiocito y responde a la activación con rosiglitazona, también observamos que su actividad disminuye en células sometidas a estrés hiperosmótico. La razón de esta inactivación puede ser la activación de las vías transduccionales antes mencionadas (ERK1-2 p38-MAPK y PI3K/PKB) involucrados en las vías activadas por el estrés hiperosmótico y por la isquemia/reperfusión, las que a su vez regulan la actividad de los PPARs como ya fue comentado. Dada las limitaciones presentes en el desarrollo de esta tesis no se analizaron las vías transduccionales en respuesta a la estimulación con agonistas de PPAR y su posible regulación durante el estrés hiperosmótico.

Considerando todos los antecedentes expuestos en la presente tesis, la activación de PPAR γ en cardiomiocitos estimulados con rosiglitazona, la inducción de la formación de vesículas autofágicas inducido por este agonista, y la carencia de un efecto evidente en la viabilidad del cardiomiocito o en los procesos apoptóticos y necróticos nos hacen sugerir que los efectos cardioprotectores o deletéreos vinculados a los agonistas de PPAR γ pueden depender de otros factores que no han sido analizados en el presente trabajo como un análisis más exhaustivo de procesos metabólicos o vías de transducción involucradas en estos fenómenos en el cardiomiocito.

Conociendo el gran impacto que tienen hoy en día los desórdenes metabólicos como la diabetes mellitus, obesidad y síndrome metabólico como factores de riesgo cardiovascular, es de vital importancia el conocer el efecto sobre la morbi-mortalidad cardiovascular de la terapia farmacológica para estas patologías. Dado el gran uso de agonistas de PPAR γ en estos pacientes con riesgo cardiovascular, el entendimiento del efecto de las tiazolidinedionas en los procesos vinculados a mecanismos de muerte y/o sobrevivencia del cardiomiocito, así como su rol en el metabolismo y en procesos antiinflamatorios y antifibróticos observados en el corazón, no sólo es de interés en la investigación básica, sino que también tiene importantes proyecciones clínicas.

8. CONCLUSIONES

1. El receptor/factor transcripcional PPAR γ está presente en el cardiomiocito de rata y su estimulación por el agonista rosiglitazona estimuló su actividad transcripcional.
2. Rosiglitazona estimuló la autofagia del cardiomiocito, incluso en condiciones normales de nutrientes. Este proceso que se caracterizó por la rápida formación de vesículas autofágicas y el procesamiento de la proteína LC3.
3. La autofagia inducida por rosiglitazona no afectó la viabilidad del cardiomiocito. Sin embargo, el estrés nutricional (privación de suero, glucosa y aminoácidos) y la inhibición de la autofagia por 3-metiladenina indujo la muerte del cardiomiocito.
4. La actividad de PPAR γ inducida por rosiglitazona aumentó en condiciones de estrés nutricional.
5. Rosiglitazona no previno la muerte por apoptosis o necrosis del cardiomiocito inducida por el estrés hiperosmótico o isquemia/reperfusión simulada.
6. Rosiglitazona activó al factor transcripcional PPAR γ en el cardiomiocito, la cual fue atenuada por el estrés hiperosmótico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Gimeno Orna,J.A., Lou Arnal,L.M., Molinero,H.E., Boned,J.B. & Portilla Cordoba,D.P. [Metabolic syndrome as a cardiovascular risk factor in patients with type 2 diabetes]. *Rev. Esp. Cardiol.* **57**, 507-513 (2004).
2. Wang,C.H., Weisel,R.D., Liu,P.P., Fedak,P.W. & Verma,S. Glitazones and heart failure: critical appraisal for the clinician. *Circulation* **107**, 1350-1354 (2003).
3. Chapman,M.J. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* **171**, 1-13 (2003).
4. Krauss,R.M. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**, 1496-1504 (2004).
5. Mudaliar,S. & Henry,R.R. New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: The glitazones or insulin sensitizers. *Annu. Rev. Med.* **52**, 239-257 (2001).
6. Yki-Jarvinen,H. Thiazolidinediones. *N Engl. J. Med.* **351**, 1106-1118 (2004).
7. Nissen,S.E. & Wolski,K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl. J. Med.* **356**, 2457-2471 (2007).
8. Goikoetxea,M.J., Beaumont,J. & Diez,J. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hypertensive heart disease. *Drugs* **64 Suppl 2**, 9-18 (2004).
9. Huss,J.M. & Kelly,D.P. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ. Res.* **95**, 568-578 (2004).
10. Kota,B.P., Huang,T.H. & Roufogalis,B.D. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol. Res.* **51**, 85-94 (2005).
11. Schiffrin,E.L. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **288**, H1037-H1043 (2005).
12. Fievet,C. & Staels,B. Combination therapy of statins and fibrates in the management of cardiovascular risk. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 505-511 (2009).
13. Peters,J.M. *et al.* Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol. Cell Biol.* **20**, 5119-5128 (2000).
14. Takano,H. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* **87**, 596-602 (2000).

15. Gilde,A.J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ. Res.* **92**, 518-524 (2003).
16. Liu,H.R. *et al.* Anti-apoptotic effects of rosiglitazone in hypercholesterolemic rabbits subjected to myocardial ischemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **62**, 135-144 (2004).
17. Wayman,N.S. *et al.* Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. *FASEB J.* **16**, 1027-1040 (2002).
18. Xu,Y. *et al.* Deleterious effects of acute treatment with a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator in myocardial ischemia and reperfusion in pigs. *Diabetes* **52**, 1187-1194 (2003).
19. Xu,Y. *et al.* PPAR-gamma activation fails to provide myocardial protection in ischemia and reperfusion in pigs. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **288**, H1314-H1323 (2005).
20. Barger,P.M. & Kelly,D.P. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 238-245 (2000).
21. Bishop-Bailey,D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 823-834 (2000).
22. Stanley,W.C., Lopaschuk,G.D., Hall,J.L. & McCormack,J.G. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc. Res.* **33**, 243-257 (1997).
23. Stanley,W.C., Recchia,F.A. & Lopaschuk,G.D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* **85**, 1093-1129 (2005).
24. Way,J.M. *et al.* Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* **142**, 1269-1277 (2001).
25. Barger,P.M., Brandt,J.M., Leone,T.C., Weinheimer,C.J. & Kelly,D.P. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J. Clin. Invest* **105**, 1723-1730 (2000).
26. Finck,B.N. *et al.* The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* **109**, 121-130 (2002).
27. Yue,T.L. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **108**, 2393-2399 (2003).

28. Asakawa,M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Circulation* **105**, 1240-1246 (2002).
29. Yamamoto,K., Ohki,R., Lee,R.T., Ikeda,U. & Shimada,K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit cardiac hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* **104**, 1670-1675 (2001).
30. Diep,Q.N. *et al.* PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* **40**, 866-871 (2002).
31. Diep,Q.N. *et al.* PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. *J. Mol. Cell Cardiol.* **36**, 295-304 (2004).
32. Pan,H.Z., Na,L.X. & Tao,L. [DNA damage and changes of antioxidative enzymes in chronic benzene poisoning mice]. *Zhonghua Lao. Dong. Wei Sheng Zhi. Ye. Bing. Za Zhi.* **21**, 423-425 (2003).
33. Shiomi,T. *et al.* Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* **106**, 3126-3132 (2002).
34. Tao,L. *et al.* Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist in hypercholesterolemia. *Circulation* **108**, 2805-2811 (2003).
35. Teissier,E. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties. *Circ. Res.* **95**, 1174-1182 (2004).
36. Diep,Q.N. *et al.* Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation* **105**, 2296-2302 (2002).
37. Diep,Q.N., El Mabrouk,M., Yue,P. & Schiffrin,E.L. Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **282**, H1635-H1641 (2002).
38. Gilde,A.J. & van Bilsen,M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* **178**, 425-434 (2003).
39. Marx,N. *et al.* PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ. Res.* **90**, 703-710 (2002).

40. Weber,K.T. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* **15**, 264-272 (2000).
41. Bursch,W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **8**, 569-581 (2001).
42. Scarabelli,T.M. *et al.* Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium. *Curr. Probl. Cardiol.* **31**, 181-264 (2006).
43. Kostin,S. *et al.* Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ. Res.* **92**, 715-724 (2003).
44. Chandrashekar,Y. & Narula,J. Death hath a thousand doors to let out life.. *Circ. Res.* **92**, 710-714 (2003).
45. Kumar,D. & Jugdutt,B.I. Apoptosis and oxidants in the heart. *J. Lab. Clin. Med.* **142**, 288-297 (2003).
46. Haunstetter,A. & Izumo,S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ. Res.* **82**, 1111-1129 (1998).
47. Syntichaki,P. & Tavernarakis,N. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep.* **3**, 604-609 (2002).
48. Levine,B. & Yuan,J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest* **115**, 2679-2688 (2005).
49. Bishopric,N.H., Andreaka,P., Slepak,T. & Webster,K.A. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 141-150 (2001).
50. Hengartner,M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776 (2000).
51. Torre-Amione,G. *et al.* Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* **92**, 1487-1493 (1995).
52. Cook,S.A., Sugden,P.H. & Clerk,A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ. Res.* **85**, 940-949 (1999).
53. Kluck,R.M., Bossy-Wetzel,E., Green,D.R. & Newmeyer,D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136 (1997).
54. Galvez,A. *et al.* A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res.* **304**, 279-285 (2001).

55. Galvez,A.S. *et al.* Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis - Differential effects of sorbitol and mannitol. *J. Biol. Chem.* **278**, 38484-38494 (2003).
56. Morales,M.P. *et al.* IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 1029-1035 (2000).
57. Kabeya,Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720-5728 (2000).
58. Klionsky,D.J. & Emr,S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717-1721 (2000).
59. Kuma,A. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036 (2004).
60. Dunn,W.A., Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* **110**, 1923-1933 (1990).
61. Subramani,S. Self-destruction in the line of duty. *Dev. Cell* **1**, 6-8 (2001).
62. Roberts,P. *et al.* Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 129-141 (2003).
63. Majeski,A.E. & Dice,J.F. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2435-2444 (2004).
64. Petiot,A., Pattingre,S., Arico,S., Meley,D. & Codogno,P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* **27**, 431-441 (2002).
65. Dunn,W.A., Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* **110**, 1923-1933 (1990).
66. Mizushima,N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395-398 (1998).
67. Mizushima,N., Sugita,H., Yoshimori,T. & Ohsumi,Y. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **273**, 33889-33892 (1998).
68. Mizushima,N. *et al.* Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657-668 (2001).
69. Ichimura,Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492 (2000).

70. Mizushima,N., Yamamoto,A., Matsui,M., Yoshimori,T. & Ohsumi,Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1101-1111 (2004).
71. Tanida,I., Ueno,T. & Kominami,E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2503-2518 (2004).
72. Petiot,A., Ogier-Denis,E., Blommaert,E.F., Meijer,A.J. & Codogno,P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 992-998 (2000).
73. Kihara,A., Kabeya,Y., Ohsumi,Y. & Yoshimori,T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* **2**, 330-335 (2001).
74. Liang,X.H. *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672-676 (1999).
75. Yue,Z., Jin,S., Yang,C., Levine,A.J. & Heintz,N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 15077-15082 (2003).
76. Marambaio,P. *et al.* Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 509-518 (2010).
77. Raught,B., Gingras,A.C. & Sonenberg,N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 7037-7044 (2001).
78. Kim,J. & Klionsky,D.J. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 303-342 (2000).
79. Kamada,Y. *et al.* Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* **150**, 1507-1513 (2000).
80. Kahn,B.B., Alquier,T., Carling,D. & Hardie,D.G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* **1**, 15-25 (2005).
81. Luiken,J.J. *et al.* Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* **52**, 1627-1634 (2003).
82. Russell,R.R., III, Bergeron,R., Shulman,G.I. & Young,L.H. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol* **277**, H643-H649 (1999).

83. Marsin,A.S., Bouzin,C., Bertrand,L. & Hue,L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 30778-30783 (2002).
84. Inoki,K., Zhu,T. & Guan,K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590 (2003).
85. Inoki,K., Zhu,T. & Guan,K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590 (2003).
86. Matsui,Y. *et al.* Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* **100**, 914-922 (2007).
87. Klionsky,D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 931-937 (2007).
88. Elmore,S.P., Qian,T., Grissom,S.F. & Lemasters,J.J. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* **15**, 2286-2287 (2001).
89. Tsujimoto,Y. & Shimizu,S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1528-1534 (2005).
90. Marino,G. & Lopez-Otin,C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 1439-1454 (2004).
91. Yu,L. *et al.* Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **304**, 1500-1502 (2004).
92. Shimizu,S. *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1221-1228 (2004).
93. Lockshin,R.A. & Zakeri,Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2405-2419 (2004).
94. Saeki,K. *et al.* Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ.* **7**, 1263-1269 (2000).
95. Cardenas-Aguayo,M.C., Santa-Olalla,J., Baizabal,J.M., Salgado,L.M. & Covarrubias,L. Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **12**, 735-748 (2003).
96. Pattingre,S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939 (2005).

97. Elmore,S.P., Qian,T., Grissom,S.F. & Lemasters,J.J. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* **15**, 2286-2287 (2001).
98. Rothermel,B.A. & Hill,J.A. Myocyte autophagy in heart disease: friend or foe? *Autophagy* **3**, 632-634 (2007).
99. Tannous,P. *et al.* Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation* **117**, 3070-3078 (2008).
100. Tanaka,Y. *et al.* Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**, 902-906 (2000).
101. Mizushima,N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* **21**, 2861-2873 (2007).
102. Hamacher-Brady,A. *et al.* Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ.* **14**, 146-157 (2007).
103. Sybers,H.D., Ingwall,J. & DeLuca,M. Autophagic response to sublethal injury in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **11**, 331-338 (1979).
104. Decker,R.S. & Wildenthal,K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am. J. Pathol.* **98**, 425-444 (1980).
105. Decker,R.S., Poole,A.R., Crie,J.S., Dingle,J.T. & Wildenthal,K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. II. Immunohistochemical and biochemical changes in cathepsin D. *Am. J. Pathol.* **98**, 445-456 (1980).
106. Kuma,A. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036 (2004).
107. Lum,J.J. *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237-248 (2005).
108. Knaapen,M.W. *et al.* Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **51**, 304-312 (2001).
109. Hein,S. *et al.* Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* **107**, 984-991 (2003).
110. Elsasser,A. *et al.* Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**, 2191-2199 (2004).
111. Elsasser,A. *et al.* Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**, 2191-2199 (2004).

112. Butler,R., Mitchell,S.H., Tindall,D.J. & Young,C.Y. Nonapoptotic cell death associated with S-phase arrest of prostate cancer cells via the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *Cell Growth Differ.* **11**, 49-61 (2000).
113. Rodway,H.A., Hunt,A.N., Kohler,J.A., Postle,A.D. & Lillycrop,K.A. Lysophosphatidic acid attenuates the cytotoxic effects and degree of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation induced by 15-deoxyDelta12,14-prostaglandin J2 in neuroblastoma cells. *Biochem. J.* **382**, 83-91 (2004).
114. Zhou,J. *et al.* PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 2334-2342 (2009).
115. Shin,T. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during hepatic ischemia is age-dependent. *J. Surg. Res.* **147**, 200-205 (2008).
116. Foncea,R. *et al.* Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* **272**, 19115-19124 (1997).
117. Shvets,E., Fass,E. & Elazar,Z. Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy* **4**, 621-628 (2008).
118. Liu,H., Zhang,H.Y., Zhu,X., Shao,Z. & Yao,Z. Preconditioning blocks cardiocyte apoptosis: role of K(ATP) channels and PKC-epsilon. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **282**, H1380-H1386 (2002).
119. Liu,H., McPherson,B.C. & Yao,Z. Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C epsilon and -delta isoforms. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **281**, H404-H410 (2001).
120. Mathur,A., Hong,Y., Kemp,B.K., Barrientos,A.A. & Erusalimsky,J.D. Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **46**, 126-138 (2000).
121. Parra,V. *et al.* Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **77**, 387-397 (2008).
122. Kuma,A. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036 (2004).
123. Mizushima,N., Levine,B., Cuervo,A.M. & Klionsky,D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069-1075 (2008).
124. Yorimitsu,T. & Klionsky,D.J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1542-1552 (2005).

125. Tanida,I., Minematsu-Ikeguchi,N., Ueno,T. & Kominami,E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84-91 (2005).
126. Tanida,I. *et al.* Lysosomal turnover of GABARAP-phospholipid conjugate is activated during differentiation of C2C12 cells to myotubes without inactivation of the mTor kinase-signaling pathway. *Autophagy* **2**, 264-271 (2006).
127. Ehara,N. *et al.* Activators of PPARgamma antagonize protection of cardiac myocytes by endothelin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 345-349 (2004).
128. Yeh,C.H. *et al.* Cardiomyocytic apoptosis following global cardiac ischemia and reperfusion can be attenuated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha but not gamma activators. *Shock* **26**, 262-270 (2006).
129. Kilter,H. *et al.* The PPAR-gamma agonist rosiglitazone facilitates Akt rephosphorylation and inhibits apoptosis in cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation. *Diabetes Obes. Metab* **11**, 1060-1067 (2009).
130. Ren,Y. *et al.* PPAR gamma protects cardiomyocytes against oxidative stress and apoptosis via Bcl-2 upregulation. *Vascul. Pharmacol.* **51**, 169-174 (2009).
131. Bialik,S. *et al.* The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **85**, 403-414 (1999).
132. Valentim,L. *et al.* Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell Cardiol.* **40**, 846-852 (2006).
133. Yan,L., Sadoshima,J., Vatner,D.E. & Vatner,S.F. Autophagy: a novel protective mechanism in chronic ischemia. *Cell Cycle* **5**, 1175-1177 (2006).
134. Wayman,N.S. *et al.* Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. *FASEB J.* **16**, 1027-1040 (2002).
135. Tang,W.H. & Maroo,A. PPARgamma agonists: safety issues in heart failure. *Diabetes Obes. Metab* **9**, 447-454 (2007).
136. Duan,S.Z., Ivashchenko,C.Y., Russell,M.W., Milstone,D.S. & Mortensen,R.M. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circ. Res.* **97**, 372-379 (2005).
137. Nesto,R.W. *et al.* Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. October 7, 2003. *Circulation* **108**, 2941-2948 (2003).

138. Liu, J. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Ligands 15-Deoxy-Delta12,14-Prostaglandin J2 And Pioglitazone Inhibit H2O2-Induced Tumor Necrosis Factor-Alpha And Lipopolysaccharide-Induced Cxc Chemokine Expression In Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *Shock* (2009).
139. Zhu, Y. *et al.* Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7921-7925 (1995).
140. Thuillier, P., Baillie, R., Sha, X. & Clarke, S.D. Cytosolic and nuclear distribution of PPARgamma2 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Lipid Res.* **39**, 2329-2338 (1998).
141. Stanley, W.C., Lopaschuk, G.D. & McCormack, J.G. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* **34**, 25-33 (1997).
142. Alibin, C.P., Kopilas, M.A. & Anderson, H.D. Suppression of cardiac myocyte hypertrophy by conjugated linoleic acid: role of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *J. Biol. Chem.* **283**, 10707-10715 (2008).
143. Bao, Y. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits endothelin-1-induced cardiac hypertrophy via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Mol. Cell Biochem.* **317**, 189-196 (2008).
144. Ye, P., Yang, W., Wu, S.M. & Sheng, L. Effect of pioglitazone on the expression of inflammatory cytokines in attenuating rat cardiomyocyte hypertrophy. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **28**, 691-696 (2006).
145. Belanger, A.J. *et al.* Hypoxia up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: role of hypoxia inducible factor 1alpha. *J. Mol. Cell Cardiol.* **34**, 765-774 (2002).
146. Festuccia, W.T. *et al.* Rosiglitazone-induced heart remodelling is associated with enhanced turnover of myofibrillar protein and mTOR activation. *J. Mol. Cell Cardiol.* **47**, 85-95 (2009).
147. Sena, S. *et al.* Cardiac hypertrophy caused by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist treatment occurs independently of changes in myocardial insulin signaling. *Endocrinology* **148**, 6047-6053 (2007).
148. Bohensky, J., Leshinsky, S., Srinivas, V. & Shapiro, I.M. Chondrocyte autophagy is stimulated by HIF-1 dependent AMPK activation and mTOR suppression. *Pediatr. Nephrol.* **25**, 633-642 (2010).

149. Hamacher-Brady,A., Brady,N.R. & Gottlieb,R.A. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **281**, 29776-29787 (2006).
150. Han,S. & Roman,J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 430-437 (2006).
151. Xiang,X., Saha,A.K., Wen,R., Ruderman,N.B. & Luo,Z. AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 161-167 (2004).
152. Fryer,L.G., Parbu-Patel,A. & Carling,D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **277**, 25226-25232 (2002).
153. Kimura,N. *et al.* A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 65-79 (2003).
154. Cho,D.H. *et al.* Troglitazone acutely inhibits protein synthesis in endothelial cells via a novel mechanism involving protein phosphatase 2A-dependent p70 S6 kinase inhibition. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **291**, C317-C326 (2006).
155. d'Abramo,C., Ricciarelli,R., Pronzato,M.A. & Davies,P. Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, decreases tau phosphorylation in CHOtau4R cells. *J. Neurochem.* **98**, 1068-1077 (2006).
156. Kumar,A., Takada,Y., Boriek,A.M. & Aggarwal,B.B. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* **82**, 434-448 (2004).
157. Djavaheri-Mergny,M. *et al.* NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J. Biol. Chem.* **281**, 30373-30382 (2006).
158. Fabre,C. *et al.* NF-kappaB inhibition sensitizes to starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* **26**, 4071-4083 (2007).
159. Lovekamp-Swan,T. & Chaffin,C.L. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces apoptosis and p53 in rat granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **233**, 15-24 (2005).
160. Boitier,E., Gautier,J.C. & Roberts,R. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol.* **2**, 3 (2003).

161. Christensen,J.G. *et al.* Altered bcl-2 family expression during non-genotoxic hepatocarcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* **20**, 1583-1590 (1999).
162. Lim,S.Y. *et al.* 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J(2) protects against nitrosative PC12 cell death through up-regulation of intracellular glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 46263-46270 (2004).
163. Butts,B.D., Tran,N.L. & Briehl,M.M. Identification of a functional peroxisome proliferator activated receptor response element in the 3' untranslated region of the human bcl-2 gene. *Int. J. Oncol.* **24**, 1305-1310 (2004).
164. Barak,Y. *et al.* PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585-595 (1999).
165. Diradourian,C., Girard,J. & Pegorier,J.P. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* **87**, 33-38 (2005).
166. Juge-Aubry,C.E. *et al.* Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 10505-10510 (1999).
167. Cosulich,S., James,N. & Roberts,R. Role of MAP kinase signalling pathways in the mode of action of peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* **21**, 579-584 (2000).
168. Khandoudi,N. *et al.* Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* **51**, 1507-1514 (2002).

10. ANEXO

10.1. Efecto de rosiglitazona en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico.

Nuestro laboratorio ha mostrado que el estrés hiperosmótico induce la muerte en el cardiomiocito de forma rápida y potente^{54,55}. De acuerdo con estos antecedentes, sabemos que el porcentaje de cardiomiocitos muertos alcanza un 70% tras su exposición por 8 h a sorbitol 600 mOsm, (300 mM). Se determinó si la activación de PPAR γ por 24, 48 y 72 h con el ligando rosiglitazona (1-100 μ M) tenía algún efecto en la muerte del cardiomiocito inducida por el estrés hiperosmótico, Rosiglitazona no previno la muerte del cardiomiocito en ninguno de los tiempos o concentraciones ensayadas (Fig. Anexo 1).

10.2. Efecto del pretratamiento con gemfibrozilo sobre la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico

Para investigar si la activación del PPAR α tiene un efecto protector en el cardiomiocito, estas células fueron previamente tratadas por 1, 12 ó 24 h con gemfibrozilo 100 μ M, seguido de una exposición por 16 h a estrés hiperosmótico con sorbitol 600 mOsm. Similar a lo observado con rosiglitazona, gemfibrozilo no aumentó la viabilidad del cardiomiocito expuesto a estrés hiperosmótico, independiente del tiempo de pretratamiento (Fig. Anexo 2A). Dado que los PPARs son factores transcripcionales y la potencia y rapidez con que el estrés hiperosmótico induce la muerte del cardiomiocito, se probaron tiempos más prolongados de pretratamiento con gemfibrozilo seguido de tiempos más cortos de estrés hiperosmótico. Se puede observar que con 8 h de estrés hiperosmótico la viabilidad del cardiomiocito disminuyó significativamente un 80%, y que el pretratamiento con gemfibrozilo por 24 o 72 h no fue capaz de prevenirlo (Fig. Anexo 2B-C). Como era de esperar, la exposición del cardiomiocito al estrés hiperosmótico por 4 h indujo un 48% de muerte. Incluso en estas condiciones, gemfibrozilo no previno la muerte del cardiomiocito (Fig Anexo 2D).

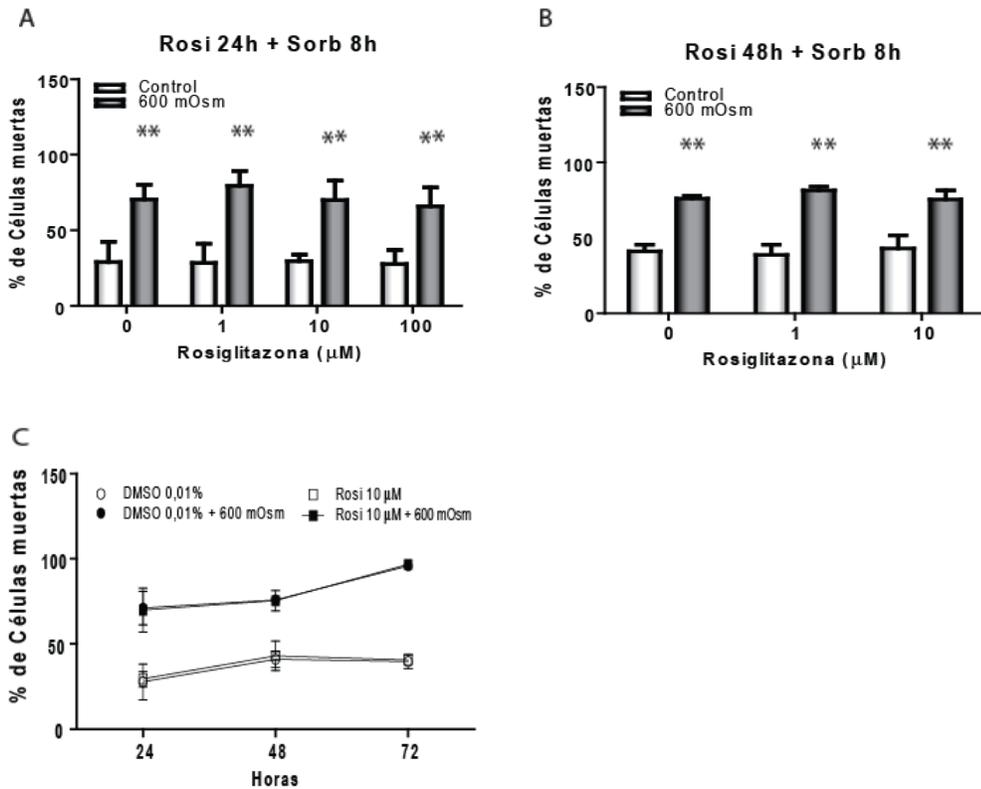


Figura Anexo 1: Efecto del pretratamiento con rosiglitazona sobre la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico. Las células se trataron con Rosi a las concentraciones indicadas por 24 h (A) o 48 h (B) seguido de una exposición a estrés hiperosmótico con sorbitol (600 mOsm) por 8 h. (C) Pretratamiento por 24, 48 y 72 h con rosiglitazona 10 mM seguido por 8 h estrés hiperosmótico. En todos los casos la viabilidad se determinó por el método de exclusión al azul tripán. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de células muertas \pm DS (n=3 en duplicado). **p<0,01; ***p<0,001 vs control por ANOVA.

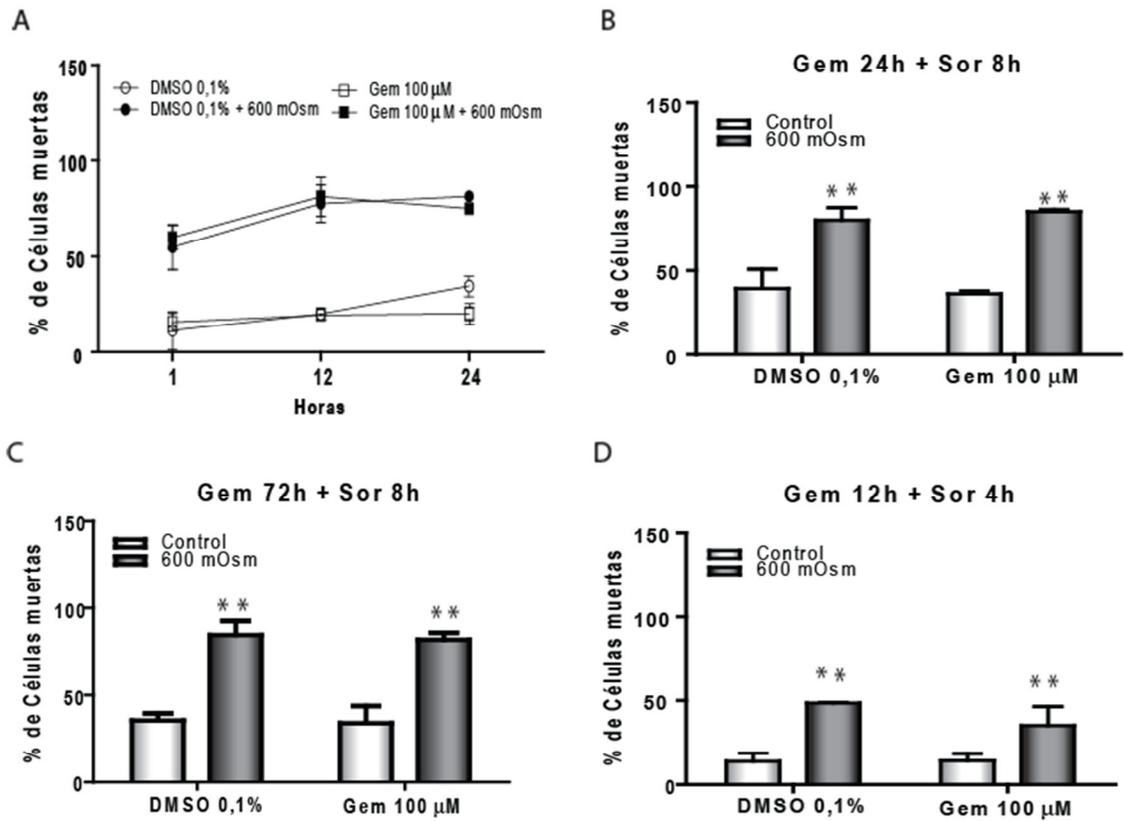


Figura Anexo 27: Efecto del gemfibrozilo sobre la muerte del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico. Cardiomiocitos se trataron con gemfibrozilo (Gem) 100 μ M por distintos tiempos, seguidos de una exposición a distintos tiempos a estrés hiperosmótico con sorbitol 300 mM (600 mOsm). (A) Células pretratadas con Gem por 1, 12 y 24 h, seguido por 16 h estrés hiperosmótico. (B) Pretratamiento por 24 h seguido por 8 h estrés hiperosmótico. (C) Pretratamiento por 72 h seguido por 8 h estrés hiperosmótico. (D) Pretratamiento por 12 h seguido por 4 h estrés hiperosmótico. En todos los casos mostrados se usó como vehículo DMSO 0,1%. La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión al azul tripán. Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de células muertas \pm DS (n=3) *p<0,01 vs control por ANOVA.

10.3. Rosiglitazona y Gemfibrozilo no protegen al cardiomiocito de la apoptosis inducida por sorbitol

Se ha descrito que el estrés hiperosmótico induce muerte del cardiomiocito por apoptosis y recientemente se ha mostrado la participación de PPAR γ y PPAR α en la modulación de la apoptosis en este tipo celular¹²⁷⁻¹³⁰. Sin embargo, los resultados mostrados previamente en esta tesis indican que la activación de PPAR α y PPAR γ no afecta la viabilidad de estas células. Con el propósito de dilucidar si PPAR α y PPAR γ realmente modulan la apoptosis se analizó este proceso en cardiomiocitos mediante la incorporación de yoduro de propidio en células fijadas y permeabilizadas con metanol y se evaluó la población Sub-G1, indicativo de la condensación del DNA. Similar a lo obtenido anteriormente por nuestro laboratorio, observamos que la exposición por 8 h a estrés hiperosmótico indujo un aumento significativo de la apoptosis. Consecuente con los resultados mostrados anteriormente en esta tesis, pretratamientos por 24 y 48 h con rosiglitazona (1-100 μ M; Fig. Anexo 3) o por 24 y 72 h con gemfibrozilo 100 μ M (Fig. Anexo 4) no protegieron al cardiomiocito de la apoptosis inducida por el estrés hiperosmótico. Estos resultados fueron además corroborados por la determinación de caída de potencial mitocondrial de cardiomiocitos al medir el decaimiento de la fluorescencia relativa por citometría de flujo. La Figura Anexo 5 muestra que el estrés hiperosmótico produjo una caída de la fluorescencia relativa de la tetrametilrodamina (TMRM) comparado con las células sin estimular. El tratamiento previo por 24 h con rosiglitazona 10 μ M no afectó la caída de potencial mitocondrial inducida por el estrés hiperosmótico.

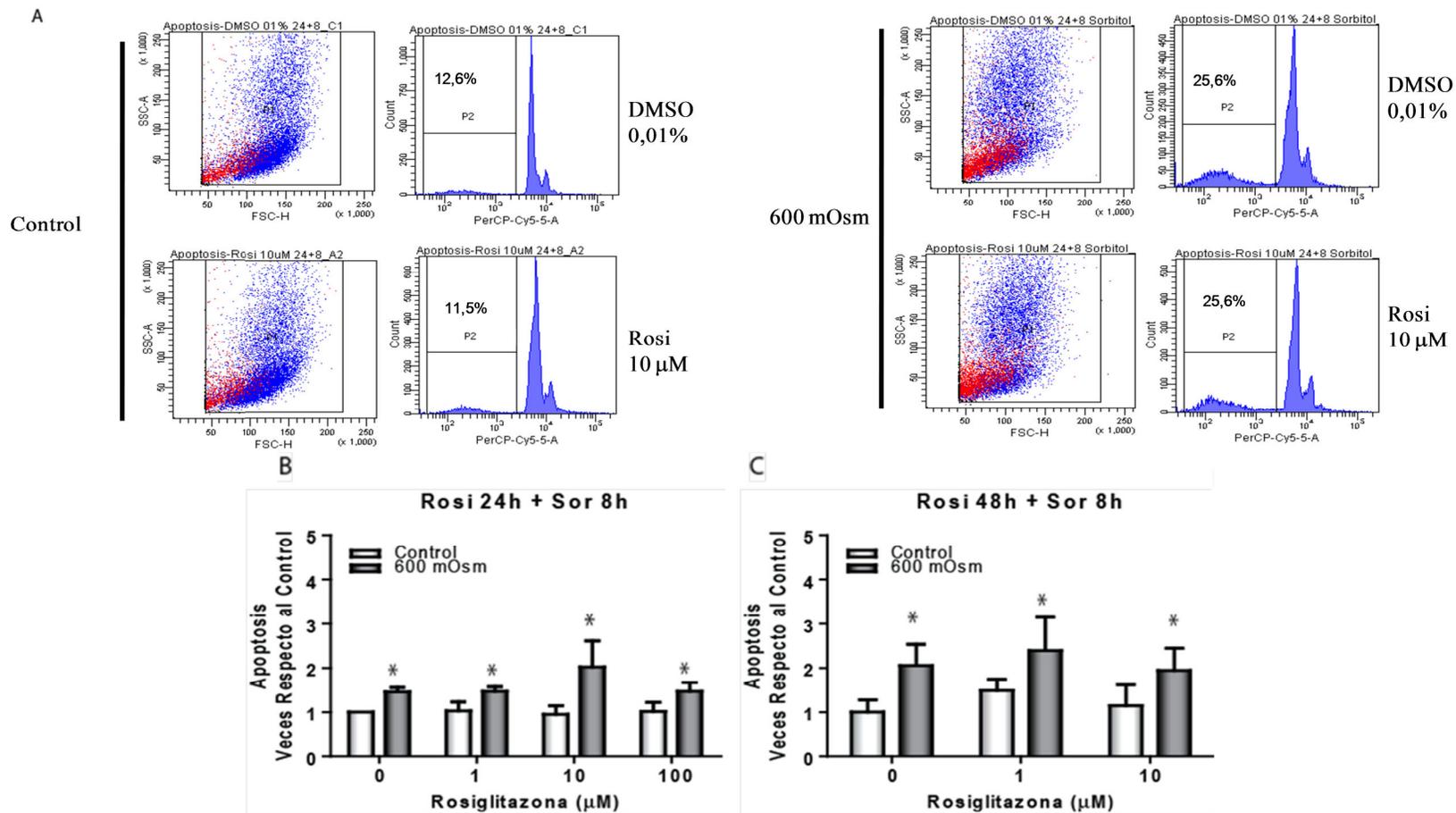


Figura Anexo 3: El pretratamiento con rosiglitazona no previene la fragmentación del DNA inducida por sorbitol en cardiomiocitos. Las células se trataron por 24 h con Rosi (10 μ M) y posteriormente expuestas a 600 mOsm por 8 h. La fragmentación del DNA se determinó por incorporación del yoduro de propidio (PI) por citometría de flujo (A). Cuantificación de la cantidad de células apoptóticas en cardiomiocitos sometidos a 8 h de Sor. 600 mOsm previamente estimulados con Rosi (1, 10 y 100 mM) por 24 h (B) y 48 h (C). Los valores graficados corresponden al promedio de las veces de aumento respecto al control \pm DE (n=3, en duplicado). *p<0,05 vs control; ***p<0,001 vs control.

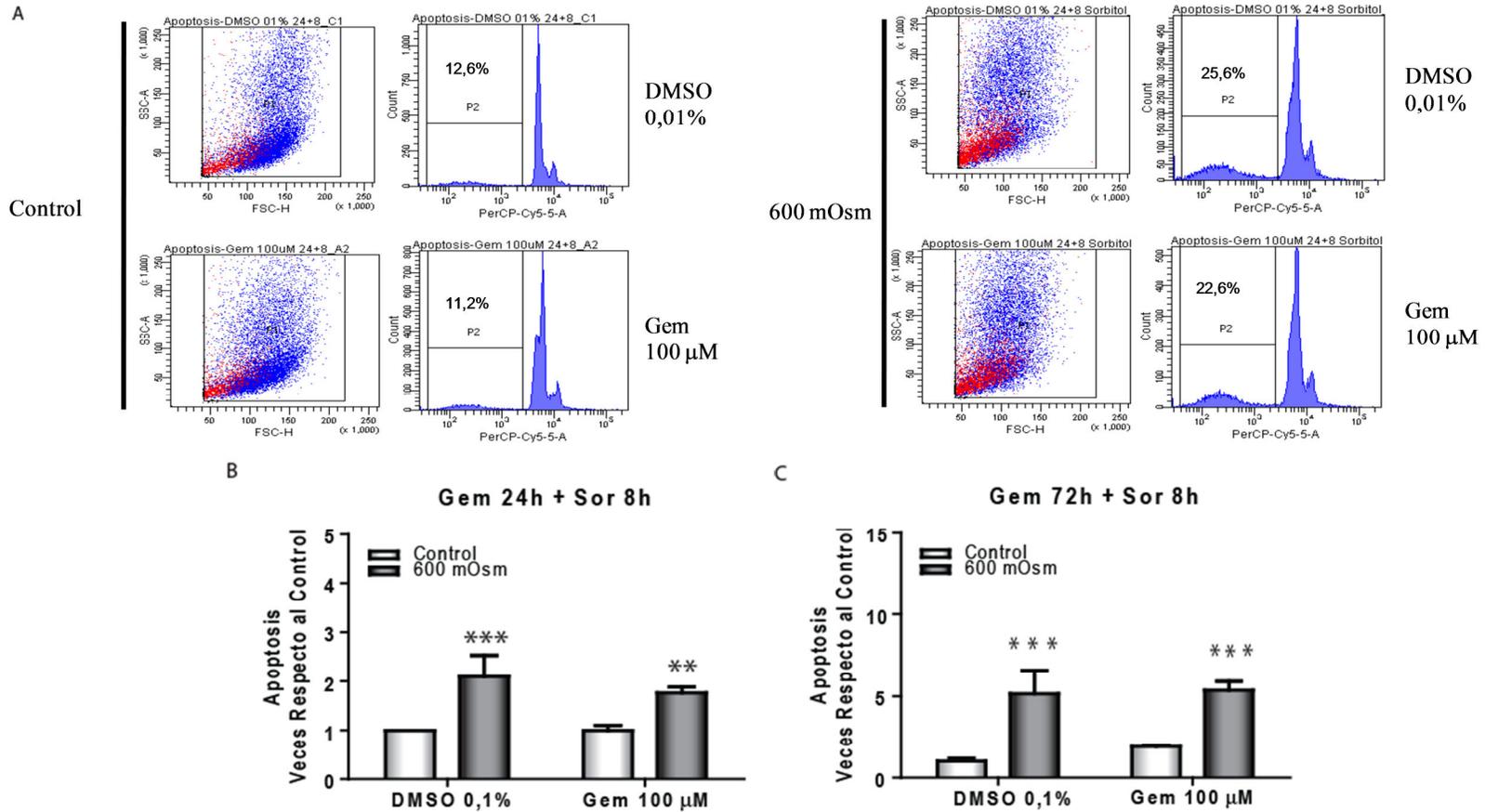


Figura Anexo 4: Gemfibrozilo no previene la fragmentación del DNA inducida por sorbitol en el cardiomiocito. Las células se trataron por 24 h con Gem (100 μM) y posteriormente expuestas a 600 mOsm por 8 h. La fragmentación del DNA se determinó por incorporación de yoduro de propidio (PI) por citometría de flujo (A). Cuantificación de la cantidad de células apoptóticas en cardiomiocitos sometidos a 8 h de Sor. 600 mOsm previamente estimulados con Gem (100 μM) por 24 (B) y 72 h (C). Los valores graficados corresponden al promedio de las veces de aumento respecto al control \pm DE (n=3, en duplicado). * $p < 0,05$ vs control; *** $p < 0,001$ vs control.

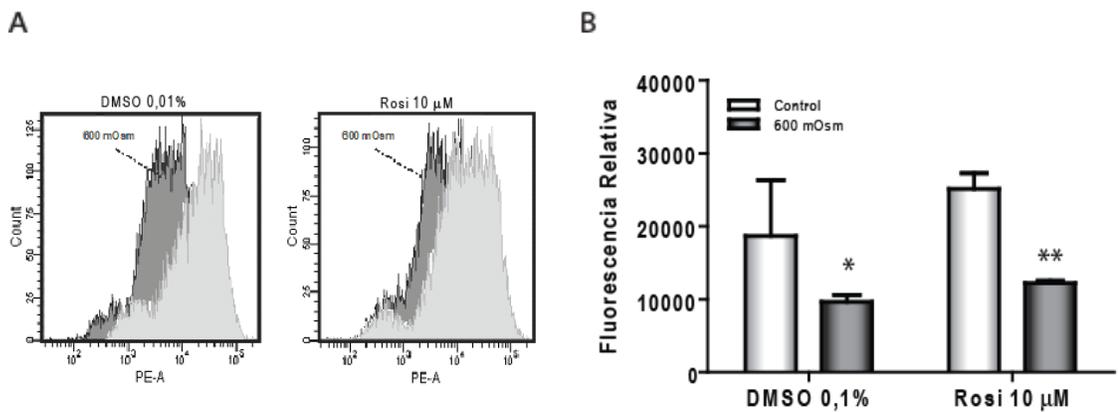


Figura Anexo 5: Efecto de rosiglitazona sobre el decaimiento del potencial de membrana mitocondrial inducido por sorbitol. El decaimiento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se determinó en cardiomiocitos tratados con Rosi (10 mM) por 24 h y luego cargados con tetrametilrodamina (TMRM). (A) Fluorescencia determinada por microscopía confocal. Las células se estimularon con sorbitol 600 mOsm, adicionado al tiempo indicado (primera flecha) y por los tiempos indicados. CCCP: carbonil cianida-m-clorofenilhidrazona. (B) Fluorescencia determinada por citometría de flujo en células estimuladas por 4 h con sorbitol 600 mOsm. (C) Cuantificación de la fluorescencia relativa observada en (B). Los valores corresponden al promedio de la fluorescencia \pm DE (en triplicado). * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,01$ vs control.

10.4. Efecto de Rosiglitazona en la necrosis del cardiomiocito inducida por estrés hiperosmótico

Existe bastante evidencia en la literatura que indica que el cardiomiocito puede morir por apoptosis o necrosis⁴¹⁻⁴³. Para completar los resultados anteriormente descritos, se estudió si rosiglitazona (1-100 μM) causaba un efecto en la necrosis en respuesta al estrés hiperosmótico. Los resultados indican que el pretratamiento con este agonista no modifica la necrosis inducida por sorbitol, lo que se determinó mediante incorporación de yoduro de propidio (PI) en células vivas no permeabilizadas (Fig. Anexo 6A) y mediante actividad de LDH en el sobrenadante del medio de cultivo (Fig. Anexo 6B).

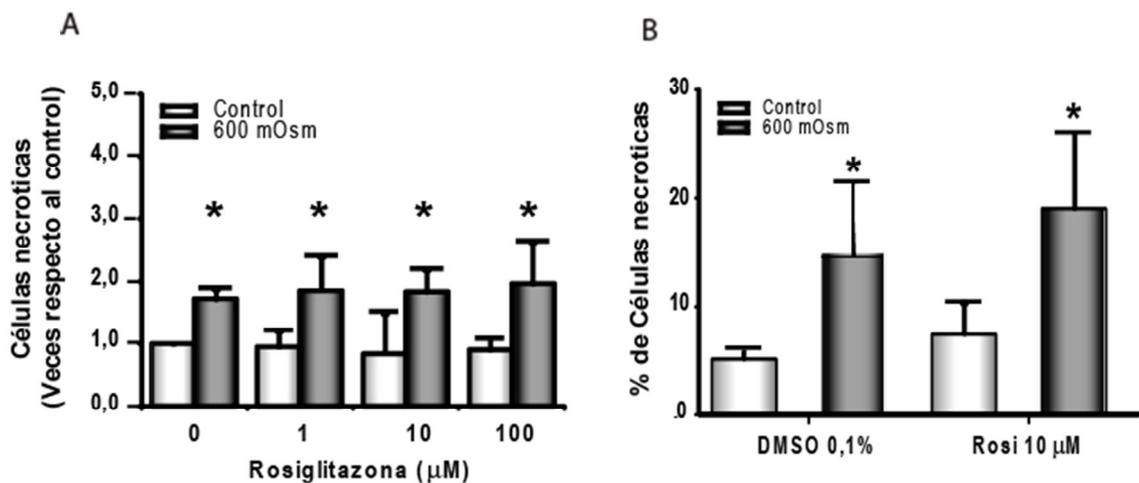


Figura Anexo 28: Efecto de rosiglitazona sobre la necrosis del cardiomiocito inducida por sorbitol. Cardiomiocitos se privaron de suero por 24 h, luego se pretrataron por 24 h con rosiglitazona 10 μM seguido de una exposición por 8 h a estrés hiperosmótico con sorbitol 300 mM. (A) El número de células necróticas se determinó por la incorporación del yoduro de propidio al DNA de células no permeabilizadas y se cuantificó por citometría de flujo. (B) La actividad de LDH en el sobrenadante se determinó enzimáticamente y se expresó como el porcentaje de células necróticas. Los valores graficados corresponden al promedio de las veces de inducción respecto al control \pm DS (n=3, en duplicado). *p < 0,01 vs DMSO 0,01%. por análisis de ANOVA.

10.5. Efecto de la isquemia/reperfusión simulada en la viabilidad del cardiomiocito

La Figura Anexo 7A muestra que la viabilidad del cardiomiocito no se afecta cuando éstos son sometidos a 2 y 4 h de isquemia. Lo mismo ocurre al exponerlos a 4 h de isquemia seguida de reperfusión por 2 a 48 h (Fig. Anexo 7B). Sin embargo, cuando las células son expuestas a 6 h de isquemia, la mortalidad aumenta significativamente (Figura Anexo 7A) pero contrario a lo esperado, la reperfusión no aumentó la mortalidad inducida por la isquemia (Fig. Anexo 7C).

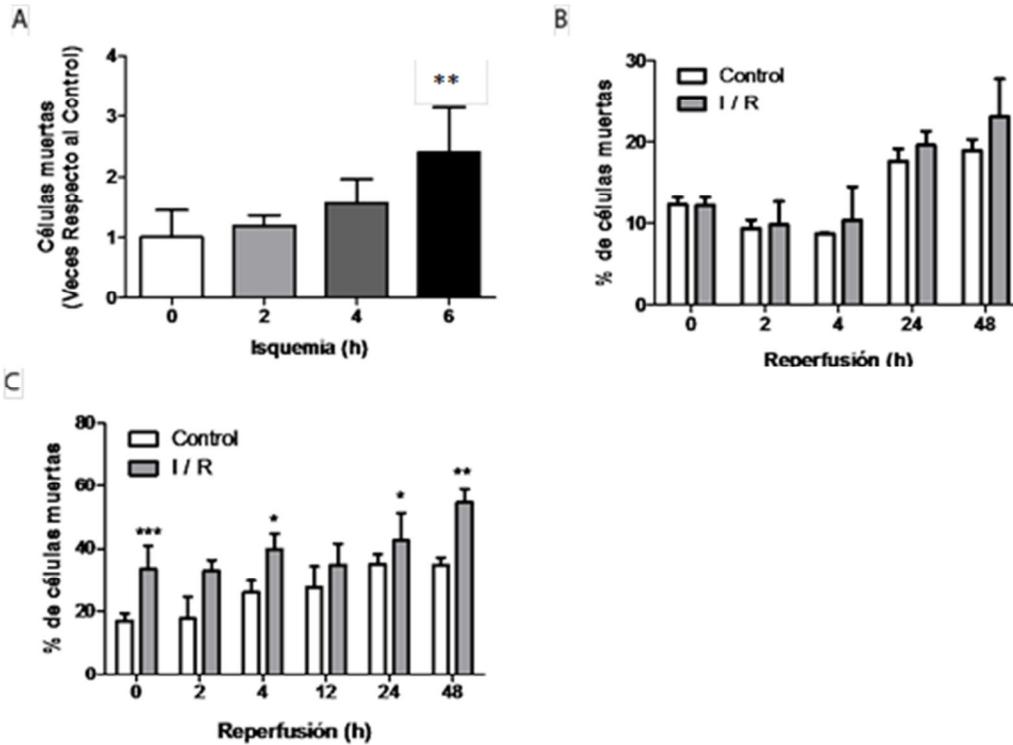


Figura Anexo 7: Efecto de la Isquemia y reperusión simulada sobre la viabilidad de los cardiomiocitos. Las células se privaron de suero por 24 h, posteriormente se expusieron a un proceso de isquemia simulada por tiempos de 2, 4 y 6 h, incubándolos en un medio “isquémico” (NaCl 137 mM; KCl 12mM; MgCl₂ 0,49 mM; CaCl₂ 0,9 mM; HEPES 4 mM; desoxiglucosa 10 mM; lactato de Na 20 mM) y bajo condiciones de hipoxia. Como control se utilizaron cardiomiocitos mantenidos en un medio control (NaCl 137 mM; KCl 3,8 mM; MgCl₂ 0,49 mM; CaCl₂ 0,9 mM; HEPES 4 mM; glucosa 10 mM). La determinación del porcentaje de células muertas se obtuvo al cuantificar las células permeables al azul tripán. (A). (B-C) Las células se sometieron al mismo procedimiento que en (A), con la diferencia, que una vez terminado el tiempo de isquemia, el medio “isquémico” se reemplazó por medio de cultivo completo por 2, 4, 12, 24 y 48 h y condición de normoxia. Los tiempos de isquemia fueron 4 (B) y 6 h (C) El número de células necróticas se determinó por incorporación de yoduro de propidio al DNA de células no permeabilizadas sometidas al mismo procedimiento que en (A). Los valores corresponden al promedio de los porcentajes de células muertas ± DS (en triplicado). *p<0,01 vs control por ANOVA.