

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO  
CARDIACO POR INSULINA Y SU RELACIÓN CON LA FUSIÓN  
Y FISIÓN MITOCONDRIAL”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:**

**VALENTINA MARÍA PARRA ORTIZ**

**Directores de Tesis**

**Dr. Sergio Lavandero González**

**Dr. Antonio Zorzano Olarte**

**SANTIAGO- CHILE**

**2011**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

**VALENTINA MARÍA PARRA ORTIZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_\_.

**Directores de Tesis:**

Dr. Sergio Lavandero

\_\_\_\_\_

Dr. Antonio Zorzano

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. Margarita Vega (Presidenta)

\_\_\_\_\_

Dra. Ilona Concha

\_\_\_\_\_

Dr. Jorge Ferreira

\_\_\_\_\_

Dr. Juan Carlos Sáez

\_\_\_\_\_

*Dedicada a mi hermano.  
Porque soñar nuevos mundos contigo,  
me inspira día a día.*

Esta tesis de doctorado se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, el cual pertenece al Centro FONDAF de Estudios Moleculares de la Célula, en las Facultades de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Medicina de la Universidad de Chile. Los estudios en el modelo animal se realizaron en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular Humana, del Departamento de Medicina Interna en la Universidad de Utah, EEUU. Este último, bajo la dirección del Profesor E. Dale Abel.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT 2007 - 2010 (VP)
- Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral, CONICYT 24090058, año 2009 - 2010 (VP)
- Beca Bicentenario de Pasantías Doctorales en el Extranjero, Becas Chile 75090017, año 2009 (VP)
- Beca FWIS L'Oréal Chile – UNESCO, 2009 (VP)
- Proyecto FONDAF 15010006 (SL)
- Proyecto FONDECYT 1080436 (SL)
- Proyecto MECESUP UCH0606 (SL)

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis, así como las metodologías desarrolladas para su realización, han sido publicadas y presentadas en diversos congresos nacionales e Internacionales. Las publicaciones y presentaciones más importantes, se citan a continuación.

### Publicaciones

Chiong M\*, **Parra V\***, Eisner V, Ibarra C, Maldonado C, Criollo A, Bravo R, Quiroga C, Contreras A, Vicencio JM, Cea P, Bucarey JL, Molgó J, Jaimovich E, Hidalgo C, Kroemer G, Lavandero S. Parallel activation of Ca(2+)-induced survival and death pathways in cardiomyocytes by sorbitol-induced hyperosmotic stress. **Apoptosis**. 15:887-903, 2010. \*Both authors contributed equally to this work.

Contreras-Ferrat AE, Toro B, Bravo R, **Parra V**, Vásquez C, Ibarra C, Mears D, Chiong M, Jaimovich E, Klip A, Lavandero S. An inositol 1,4,5 triphosphate-IP3R pathway is required for insulin stimulated GLUT4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. **Endocrinology**. 151:4665-4677, 2010.

Eisner V, **Parra V**, Lavandero S, Hidalgo C, Jaimovich E. Mitochondria fine-tune the slow Ca(2+) transients induced by electrical stimulation of skeletal myotubes. **Cell Calcium**. 48:358–370, 2010.

**Parra V**, Verdejo H, Del Campo A, Penanen C, Kuzmicic J, Iglewski M, Hill JA, Rothermel BA, Lavandero S. The complex interplay between mitochondrial dynamics and cardiac metabolism. **J Bioenerg Biomembr**. 43:47-51, 2011.

Bravo R, Vicencio JM, **Parra V**, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, Quiroga C, Rodriguez AE, Verdejo HE, Ferreira J, Iglewski M, Chiong M, Simmen T, Zorzano A, Hill JA, Rothermel BA, Szabadkai G, Lavandero S. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early ER stress. **J Cell Sci**. 124:2143-2152, 2011.

Kuzmicic J, Del Campo A, Lopez-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro PF, Verdejo HE, **Parra V**, Chiong M, Lavandero S. Dinámica y función mitocondrial: un potencial nuevo blanco terapéutico para la insuficiencia cardiaca (Mitochondrial dynamics and function: a potential new therapeutic target for heart failure). **Rev Esp Cardiol**. doi:10.1016/j.recesp.2011.05.018, 2011.

Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, Gatica D, Rodriguez AE, Pedrozo Z, **Parra V**, Chiong M, Quest AF, Lavandero S. Endoplasmic Reticulum: ER stress cooperates with mitochondrial bioenergetics. **Int J Biochem Cell Biol**. Manuscrito enviado, 2011.

Troncoso R, Vicencio JM, **Parra V**, Nemchenko A, Kawashima Y, del Campo A, Toro B, Battiprolu PK, Aránguiz P, Chiong M, Yakar S, Hill JA, Abel ED, LeRoith D, Lavandero S. Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy. **Cardiovasc Res**. Manuscrito en preparación, 2011.

**Parra V**, Verdejo H, Iglewski M, Troncoso R, Jones DL, Kuzmicic J, del Campo A, Pennanen C, López C, Jaña F, Ferreira J, Chiong M, Abel ED, Zorzano A, Hill JA, Rothermel BA, Lavandero S. Insulin signalling increases mitochondrial metabolism by promoting mitochondrial fusion. Manuscrito en preparación, 2011.

### Congresos Internacionales

New role of intracellular  $Ca^{2+}$  in the metabolic actions of insulin in cultured cardiomyocytes. **Parra V**, Contreras AE, Morales C, Klip A, Jaimovich E, Lavandero S. **Keystone Symposia Conference, X6: Mitochondrial Dynamics and Physiology**. TELUS Whistler Conference Centre, Whistler, British Columbia, Canada, 2009.

Regulation of cardiac metabolism by insulin and its relationship with mitochondrial fusion and fission. **Parra V**, Morales C, Eisner V, Zorzano A, Lavandero S. **XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq) and I Latin American Symposium on the Molecular Mechanisms of Skeletal Mineralization**. Convention Center of Rafain Palace Hotel, Foz do Iguacu, Parana, Brazil, 2010. *Invitación y Beca para Asistir al SBBq Conesul Young Scientist Symposium*.

Insulin signaling increases mitochondrial metabolism by promoting mitochondrial fusion. **Parra V**, Jones DL, Verdejo H, Bravo R, Morales C, Eisner V, Zorzano A, Abel ED, Lavandero S. **70th Scientific Sessions of the American Diabetes Association**. Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA, 2010. *Beca de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos en el Extranjero, año 2010, CONICYT, Chile*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible el desarrollo y término de esta tesis:

Al Dr. Sergio Lavandero, por ser un excelente guía en este trabajo que iniciamos hace ya bastante tiempo y del que ahora vemos frutos con los que ni siquiera podríamos haber soñado en un principio. Porque ha sido siempre capaz de escuchar mis ideas, guiarlas y potenciarlas de una forma que sólo la experiencia puede lograr y porque ha sido capaz de entregarme su sabiduría para tomar muchas de las decisiones que actualmente marcan mi vida.

Al Dr. Mario Chiong y a Fidel Albornoz, porque su experiencia diaria hace que trabajar en el laboratorio sea un aprendizaje constante y porque siempre han estado dispuestos a ayudarme en todo momento en que los he necesitado.

A todos mis queridos amigos del “Grupo de Mitocondrias” porque gracias a sus grandes inquietudes e incansable capacidad de trabajo hemos generado un grupo maravilloso, del cual me siento muy orgullosa de formar parte. Porque cada seminario con uds. me desafía a buscar más respuestas y por enseñarme que todos los días son buenos para aprender cosas nuevas. Muchas gracias a todos uds. porque de cada uno he podido aprender una hermosa lección de vida.

Mención aparte y un gran agradecimiento para los grandes amigos con los que compartí en estos casi 5 años de mi vida. Porque sólo uds. hicieron que cada día fuera diferente al anterior y que el diario vivir del laboratorio fuera una experiencia única. Muchas gracias a Hugo y Jovan, porque definitivamente se convirtieron en dos personas imprescindibles con las cuales, y casi sin querer, he compartido algunos de los momentos más importantes que he vivido en este último tiempo. Gracias Hugo por tu sabiduría, consejos y amistad profunda. Gracias Jovan, por el entusiasmo, alegría y la incondicionalidad. Gracias Andrea y Rodrigo por compartir parte de sus vidas conmigo, por ser amigos de esos que están siempre presentes y con los cuales se puede contar para la vida. Gracias Roberto y Christian por ser capaces de alegrar el día sin ni siquiera notarlo, porque una sonrisa nunca está de más.

Y gracias a todas las personas en el laboratorio que hacen al final de cuentas, que éste sea un buen lugar para trabajar.

A los amigos de la vida. A Natalia porque no recuerdo un solo día en que tu amistad no me haya acompañado. A Tomás y Camila, porque como siempre digo, nuestras infancias hicieron las bases de nuestro futuro. A David, Eve, Gabriel, porque conocerlos y compartir con uds. la inocencia de los primeros descubrimientos y que aún sean capaces de sorprenderme con su amistad es algo con que no muchas personas pueden contar. Gracias por crecer y cambiar el mundo conmigo.

A los amigos de la ciencia, a esos que se han unido en esta búsqueda incansable de respuestas. Algunos hace casi 10 años, otros más recientes, pero con los que se comparte la pasión por hacer de los juegos del laboratorio, la pasión más grande de la vida. Gracias a Carlos, Jocelyn, Manuel, Daniel, Panchito, Raúl, Coto y Ginés. Gracias Consu, Andrés y Mauro.

Este agradecimiento no estaría completo, sin el más importante de todos, el agradecimiento a mi familia, sobre todo a mis padres, Francisco y Polonia, porque gracias a ellos soy lo que soy, porque todo lo que tengo y he ganado alguna vez se lo debo a ellos, a su paciencia y enseñanza. Porque me han regalado con una familia hermosa, capaz de apoyarme en todo momento y porque son las personas más importantes de mi vida. A mi hermano, Francisco, porque desde que llegaste al mundo, mi vida no fue nunca más igual, la llenaste con tu capacidad infinita de sorpresa, generosidad y amor. Porque te admiro y sé que contigo en mi vida, nunca estaré sola. A mi abuelita, quien siempre me acompaña, a mi tía Sonia, a mis primos José Luis y Alejandra, a Eduardo y mi queridísimo Ariel.



## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	9
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	12
<b>ABREVIATURAS</b> .....	16
<b>RESUMEN</b> .....	19
<b>SUMMARY</b> .....	22
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	24
1.1. Generalidades del metabolismo cardiaco.....	24
1.2. La hormona insulina .....	26
1.2.1. Receptor de insulina y su sistema de transducción.....	27
1.2.2. Acción de insulina en el corazón de mamíferos .....	29
1.3. Fusión, fisión mitocondrial y regulación del metabolismo.....	30
1.3.1. La maquinaria de la fisión mitocondrial .....	31
1.3.2. La maquinaria de la fusión mitocondrial .....	33
1.4. Papel de proteínas kinasas y fosfatasa en la regulación metabólica a nivel mitocondrial .....	37
1.5. Insulina, metabolismo y morfología mitocondrial.....	38
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	41
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	41
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	41
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	42
5.1. Reactivos.....	42
5.2. Modelos animales.....	43
5.3. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata.....	43
5.4. Modelo experimental celular.....	44
5.5. Tratamiento adenoviral .....	44
5.6. Extracción de RNA, transcripción reversa y PCR en tiempo real (qPCR).....	45
5.7. Medición de la cantidad de DNA mitocondrial mediante qPCR .....	47
5.8. Preparación de extractos celulares totales.....	48
5.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	49

5.10. Electrotransferencia de proteínas.....	49
5.11. Western blot.....	49
5.12. Inmunofluorescencia indirecta.....	50
5.13. Determinación del potencial de membrana y de la masa mitocondrial mediante citometría de flujo.....	51
5.14. Medición de los niveles intracelulares de ATP mediante luminometría.....	51
5.15. Medición de la velocidad del consumo de oxígeno celular mediante oxigrafía de Clark.....	52
5.16. Determinación de los niveles de glicógeno intracelulares.....	53
5.17. Determinación del volumen mitocondrial.....	53
5.18. Análisis digital de las imágenes.....	54
5.19. Microscopía electrónica.....	54
5.20. Modelo experimental animal.....	55
5.21. Preparación de extractos proteicos totales a partir de tejido cardíaco.....	56
5.22. Preparación de fibras musculares cardíacas aisladas.....	57
5.23. Ensayos de respiración y ATP en fibras aisladas.....	59
5.24. Análisis estadístico.....	61
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
6.1. Efecto de insulina en la morfología mitocondrial.....	62
6.2. Efecto de insulina en la distribución subcelular de las proteínas de la fusión y fisión mitocondrial.....	68
6.3. Efecto de insulina sobre diferentes parámetros del metabolismo celular en cardiomiocitos.....	78
6.4. Relación entre el incremento de la fusión y metabolismo mitocondrial inducidos por insulina.....	80
6.5. Efecto del aumento de insulina sobre los niveles de la proteína Opa-1 y el metabolismo mitocondrial en un modelo animal.....	87
6.6. Rol de la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt y del complejo metabólico mTORc1 en los efectos sobre la fusión y función mitocondrial mediados por insulina en el cardiomiocito.....	90
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>101</b>
7.1. Función mitocondrial y su relación con insulina.....	102
7.2. Morfología mitocondrial y su relación con el control del metabolismo en células cardíacas.....	105

7.3. Opa-1 y control metabólico.....	113
7.4. Akt, mitocondria y mTOR.....	115
7.5. mTOR y su rol como regulador de la función y morfología mitocondrial. ....	116
7.5. Modelo final y proyecciones .....	120
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>125</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Características generales de las vías de transducción de insulina .....	28
<b>Figura 2.</b> Dinámica de la red mitocondrial en células de mamíferos .....	35
<b>Figura 3.</b> Esquema general de trabajo .....	40
<b>Figura 4.</b> Modelo experimental animal: clamp euglicémico - hiperInsulinémico .....	56
<b>Figura 5.</b> Preparación de fibras aisladas .....	58
<b>Figura 6.</b> Esquema de un ensayo de respiración en fibras aisladas .....	60
<b>Figura 7.</b> Efecto de insulina sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito .....	65
<b>Figura 8.</b> Efecto de insulina sobre la distribución radial de la red mitocondrial del cardiomiocito.....	66
<b>Figura 9.</b> Efecto de la estimulación con pulsos de insulina sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito .....	67
<b>Figura 10.</b> Características morfológicas ultraestructurales de las mitocondrias de cardiomiocitos estimulados con insulina.....	68
<b>Figura 11.</b> Efecto de insulina sobre la distribución de las proteínas de la fusión mitocondrial Opa-1 y Mfn2 en el cardiomiocito.....	71
<b>Figura 12.</b> Aumento de los niveles totales de Opa-1 inducido por el tratamiento con insulina en el cardiomiocito.....	72

<b>Figura 13.</b> Efecto del tratamiento con insulina y el desacoplante CCCP sobre las diferentes isoformas de la proteína Opa-1 en el cardiomiocito. ....	72
<b>Figura 14.</b> Efecto de insulina sobre los niveles de las proteínas Mfn2 y mtHsp70 en extractos totales de cardiomiocitos de rata .....	73
<b>Figura 15.</b> Efecto de insulina sobre la masa mitocondrial total y DNA mitocondrial en el cardiomiocito.....	74
<b>Figura 16.</b> Efecto de insulina sobre la abundancia relativa del mensajero para la proteína Opa-1.....	76
<b>Figura 17.</b> Efecto del tratamiento con actinomicina D y cicloheximida sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en cardiomiocitos.....	77
<b>Figura 18.</b> Efecto del tratamiento con cicloheximida sobre el incremento en los niveles de Opa-1 inducido por insulina en el cardiomiocito.....	78
<b>Figura 19.</b> Efecto de insulina sobre el $\Psi_{mt}$ , la concentración intracelular de ATP y la velocidad de consumo de oxígeno en el cardiomiocito .....	81
<b>Figura 20.</b> Efecto de insulina sobre los niveles intracelulares de glicógeno en cultivos primarios de cardiomiocitos .....	81
<b>Figura 21.</b> Efecto del AsMfn2 sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocitos de rata.....	82
<b>Figura 22.</b> Efecto de AsMfn2 sobre los incrementos metabólicos inducidos por insulina en el cardiomiocito.....	83
<b>Figura 23.</b> Efecto del microOpa-1 sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito.....	85

<b>Figura 24.</b> Efecto del microOpa-1 sobre los incrementos metabólicos inducidos por insulina en el cardiomiocito.....	86
<b>Figura 25.</b> Efecto del clamp euglicémico-hiperinsulinémico sobre los niveles de la proteína Opa-1 en extractos totales de proteínas cardiacas de ratones WT ...	88
<b>Figura 26.</b> Efecto del clamp euglicémico-hiperinsulinémico sobre los niveles de la proteína Mfn2 y sobre la fosforilación de Akt en extractos totales de proteínas cardiacas de ratones WT .....	89
<b>Figura 27.</b> Efecto del clamp euglicémico-hiperinsulinémico sobre la respiración y síntesis de ATP de fibras cardiacas aisladas de ratones WT.....	89
<b>Figura 28.</b> Efecto de insulina sobre la fosforilación y desensibilización de Akt en el cardiomiocito.....	94
<b>Figura 29.</b> Efecto de insulina sobre la fosforilación de la proteína mTORc1 en el cardiomiocito.....	94
<b>Figura 30.</b> Efecto de la inhibición de Akt y mTORc1 sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en el cardiomiocito .....	95
<b>Figura 31.</b> Efecto de la inhibición del receptor de insulina y de la proteína PI3-K sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en el cardiomiocito .....	96
<b>Figura 32.</b> Efecto de la inhibición de la inhibición conjunta de Akt y mTORc1 sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en el cardiomiocito .....	97
<b>Figura 33.</b> Efecto de la inhibición de la entrada de glucosa a través de los transportadores GLUT-4 sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en el cardiomiocito.....	98
<b>Figura 34.</b> Efecto de la inhibición de Akt y mTORc1 sobre el incremento en los niveles de Opa-1 inducidos por insulina en el cardiomiocito .....	99

<b>Figura 35.</b> Efecto de la inhibición de mTORc1 sobre los incrementos metabólicos inducidos por insulina en el cardiomiocito .....	100
<b>Figura 36.</b> El circuito protónico a través de la membrana interna mitocondrial y su analogía con un circuito eléctrico. ....	103
<b>Figura 37.</b> Niveles de regulación del metabolismo mitocondrial.....	107
<b>Figura 38.</b> Modelo para la regulación de la función mitocondrial a través de la modulación de las proteínas de la maquinaria de la fusión mitocondrial. ....	111
<b>Figura 39.</b> Regulación de las redes de señalización de Akt2 y mTOR.....	120
<b>Figura 40.</b> Modelo final: regulación de la morfología y función mitocondrial por insulina en el cardiomiocito.....	122
<b>Figura 41.</b> Modelo temporal.....	122

## ABREVIATURAS

Acetil-CoA	: Acetil co-enzima A
AdVac	: Adenovirus vacío
AGL	: Ácido graso libre
Akt	: Proteína serina treonina kinasa B o PKB
Akti	: Inhibidor de la proteína Akt VIII
AMP	: Monofosfato de adenosina
AMPK	: Proteína kinasa activada por AMP
ANT	: Translocador de nucleótidos de adenina
APS	: Persulfato de amonio
AsMfn2	: Adenovirus antisentido Mfn2
ATP	: Adenosín trifosfato
ATPs	: ATP sintasa
Ca <sup>+2</sup>	: Ión calcio
CaCl <sub>2</sub>	: Cloruro de calcio
Caf4p	: Proteína de la fisión mitocondrial en levaduras
CCCP	: Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
CK	: Proteína creatina kinasa
CO <sub>2</sub>	: Dióxido de carbono
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DNAc	: Hebra de DNA complementario
DNAmt	: DNA mitocondrial
Dnm1p	: Proteína ortóloga de levaduras de Drp-1
Drp-1	: Proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo-1
DrpK38A	: Mutante en sitio GTPásico de Drp-1
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
FADH <sub>2</sub>	: Forma oxidada del dinucleótido de flavina-adenina
FBS	: Suero fetal bovino
FCS	: Suero fetal de ternera
Fis-1	: Proteína de la fisión mitocondrial en mamíferos



FOXO-1	: Factor de transcripción " <i>Forkhead box</i> "
FZO	: Proteína ortóloga de levaduras de Mfn1/2
GLUT	: Proteína transportadora de glucosa
GTP	: Guanosín trifosfato
GSK-3	: Proteína glicógeno sintasa kinasa tipo-3
Hank's	: Solución salina balanceada
H <sup>+</sup>	: Ión protón
IRS-1	: Proteína sustrato del receptor de insulina tipo-1
Ly	: LY-294002. Inhibidor de la proteína PI3-K
MAPK	: Familia de proteínas kinasas activadas por mitógenos
Mdv1p	: Proteína de la fisión mitocondrial en levaduras
MEC	: Matriz extracelular
Mfn1/2	: Proteína mitofusina 1-2
MgCl <sub>2</sub>	: Cloruro de magnesio
Mgm1p	: Proteína ortóloga de levaduras de Opa-1
microControl	: Adenovirus micro " <i>scrambled</i> " o micro Control
microOpa-1	: Adenovirus micro RNA contra Opa-1
MME	: Membrana mitocondrial externa
MMI	: Membrana mitocondrial interna
mtHsp70	: Proteína " <i>heat shock</i> " -70 de la mitocondria
mTOR	: Proteína " <i>mammalian target of rapamycin</i> "
MOI	: Multiplicidad de infección viral
NaCl	: Cloruro de sodio
NADH	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
NaOH	: Hidróxido de sodio
NDP kinasa	: Nucléosido difosfato kinasa
OMA-1	: Metaloproteasa mitocondrial dependiente de zinc
Opa-1	: Proteína de la atrofia óptica tipo-1
OXPHOS	: Fosforilación oxidativa
O <sub>2</sub>	: Oxígeno molecular
PBS	: Tampón fosfato salino
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PCr	: Fosfocreatina

PDH	: Complejo piruvato deshidrogenasa
PI3-K	: Proteína fosfatidilinositol 3-kinasa
PKC	: Proteína kinasa C
PMSF	: p-fenilmetilsulfonilfluoruro
p-Akt	: Proteína Akt fosforilada
p-mTOR	: Proteína mTOR fosforilada
p70S6kinasa	: Proteína sustrato de 70 kDa de la proteína ribosomal S6K
p85	: Subunidad reguladora de la proteína PI3-K
p110	: Subunidad catalítica de la proteína PI3-K
Q	: Co-enzima ubiquinona
qPCR	: PCR cuantitativo
Rapa	: Rapamicina. Inhibidor del complejo proteico mTORc1
RHEB	: Proteína de unión a GTP, " <i>Ras homolog enriched in brain</i> "
RI	: Receptor de insulina
RNA	: Ácido ribonucleico
RNAi	: RNA de interferencia
RNAm	: RNA mensajero
ROI	: Región óptica de interés
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida desnaturante
SEM	: Error estándar de la media
TBS	: Tampón tris salino
TCA	: Ciclo del ácido cítrico
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
TMRM/TMRE	: Tetrametilrodamina metil éster
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TSC2	: Proteína tuberina o " <i>tuberous sclerosis protein type-2</i> "
Ugo1p	: Proteína de la fusión mitocondrial en levaduras
WT	: Cepa silvestre o " <i>wild type</i> "
Ψ <sub>mt</sub>	: Potencial de membrana mitocondrial
[ATP] <sub>i</sub>	: Niveles intracelulares de ATP

## RESUMEN

Las mitocondrias corresponden a una red organelar altamente dinámica e interconectada, mantenida por eventos frecuentes de fisión y fusión. A través de estos procesos, las mitocondrias adoptan diferentes formas en respuesta a señales internas y externas, así como también presentan diferencias de distribución y forma en los diferentes tejidos de los seres pluricelulares. En las células mamíferas, las principales reguladoras del proceso de fusión mitocondrial, corresponden a la GTPasa Mitofusina (Mfn) y la proteína de la atrofia óptica-1 (Opa-1). Aunque la disrupción de la expresión de cualquiera de ellas, disminuye la función mitocondrial, aún no está claro si la regulación fisiológica del metabolismo involucra directamente cambios en la dinámica de este organelo.

Los cardiomiocitos corresponden a la unidad funcional básica del corazón, los cuales para funcionar adecuadamente necesitan del aporte continuo y elevado de sustratos metabólicos en la forma de ácidos grasos libres (AGL), glucosa y oxígeno. En el corazón, la insulina regula el ingreso de glucosa al compartimento intracelular, la velocidad de la glicólisis, la síntesis del glicógeno, así como el crecimiento, contractibilidad y sobrevivencia de los cardiomiocitos. Sus acciones metabólicas son mediadas por la activación del receptor de insulina (RI) y una serie de otras proteínas de señalización río abajo, entre las que se incluyen a la familia de las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), la proteína fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3-K) y la proteína serina/treonina kinasa Akt.

Dado el papel crítico de insulina en el control metabólico y energético del corazón, el principal objetivo de este trabajo consistió en investigar si insulina modifica el metabolismo mitocondrial a través de la regulación de la dinámica. Trabajos recientes han mostrado alteraciones de la maquinaria proteica reguladora de estos procesos en pacientes obesos e insulino-resistentes, haciendo relevante el estudio de la señalización de insulina y su implicancia en la regulación de la morfología mitocondrial.

Para probar esta hipótesis, cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se trataron con insulina 10 nM por 0 – 24 h y se incubaron con la sonda Mitotracker Green en los últimos 30 min de exposición a la hormona. Posteriormente, las células se visualizaron en un microcopio confocal, la red mitocondrial se reconstruyó tridimensionalmente a partir de las imágenes obtenidas, determinándose el número y volumen promedio de las mitocondrias. Los resultados muestran que insulina indujo fusión de la red mitocondrial a las 3 h de tratamiento, lo cual se evidenció por un aumento del volumen mitocondrial promedio (+156%;  $p < 0,001$ ) y una disminución del número de mitocondrias por célula (-60%;  $p < 0,001$ ). Al mismo tiempo, estos cambios, se asociaron a un aumento en los niveles de la proteína Opa-1 ( $+3,7 \pm 1,5$ ;  $p < 0,05$ ) y su colocalización efectiva con Mfn2. Por medio de microscopía electrónica también se observó la aparición de mitocondrias de gran tamaño en el mismo tiempo descrito anteriormente. Sin embargo, bajo estas mismas condiciones experimentales, tanto los niveles de Mfn2 y de la proteína constitutiva mitocondrial mtHsp70 no se modificaron en relación a los controles.

Con respecto a la regulación del metabolismo energético, insulina aumentó el potencial de la membrana mitocondrial (+21%;  $p < 0,05$ ), los niveles intracelulares de ATP (+28%;  $p < 0,001$ ) y la respiración celular (+19%;  $p < 0,01$ ). Paralelamente, la transducción de los cardiomiocitos con un adenovirus que codifica para un antisentido contra Mfn2 o un micro RNA dirigido a Opa-1 previno todos los incrementos metabólicos y morfológicos inducidos por insulina antes descritos. Para confirmar si estos resultados también ocurrían en un modelo *in vivo*, ratones silvestres C57BL6 se sometieron a un clamp euglicémico - hiperinsulinémico por 2 h, extrayéndose los corazones al término del experimento. Insulina aumentó los niveles totales de Opa-1 en el tejido cardíaco (1,8 veces;  $p < 0,001$ ) respecto a los controles así como la respiración (+38;  $p < 0,05$ ) y síntesis de ATP (+50%;  $p < 0,05$ ) en fibras cardíacas aisladas. Finalmente, el tratamiento previo de cardiomiocitos con inhibidores generales de la vía transduccional RI/PI3-K/Akt y del inhibidor específico del complejo mTORc1, rapamicina, previno la fusión mitocondrial inducida por insulina, Este último inhibidor también previno los incrementos en el metabolismo energético y en los niveles de Opa-1, sugiriendo un papel clave del

complejo mTORc1 en la señalización río abajo activada insulina, en el control de la dinámica mitocondrial.

En conclusión, estos antecedentes colectivamente indican que insulina regula el metabolismo energético en el cardiomiocito a través de un mecanismo dependiente de la fusión mitocondrial y de la vía transduccional Akt/mTORc1.

## **SUMMARY**

### **Insulin regulation of cardiac energy metabolism and its relationship with mitochondrial fusion and fission**

Mitochondria exist as a dynamic network of interconnected organelles that undergo frequent fission and fusion events. Through these processes mitochondria may adopt different shapes in response to internal and external signals and also display particular morphologies and distributions in the many different cell types of higher eukaryotes. In mammalian cells, the main regulators of mitochondrial fusion are the dynamin-related GTPase mitofusin (Mfn) and optic atrophy protein 1 (Opa-1). Although a disruption in the expression of these proteins impairs mitochondrial function, it is not clear if the physiological regulation of mitochondrial metabolism directly involves changes in mitochondrial dynamics.

Cardiomyocytes are the basic functional unit of the heart and in order to function properly, they require a constantly high supply of metabolic substrates in the form of free fatty acids (FFA), glucose and oxygen. In the heart, insulin regulates glucose transport inside the cell, glycolysis rate, glycogen synthesis, growth, cardiomyocyte contractility and survival. The metabolic actions of insulin are mediated through the activation of the insulin receptor (IR) and a series of downstream associated proteins, including the insulin receptor substrate family proteins (IRS-1 and IRS-2), the phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) and the serine/threonine kinase Akt.

Given the critical role of insulin in the metabolic and energetic control of heart, the goal of this study was to determine if insulin regulates mitochondrial metabolism affecting mitochondrial dynamics. Previous work from other groups had shown that obese and insulin-resistant patients have alterations in the protein machinery of mitochondrial dynamics, further implying insulin signaling in the control of mitochondrial morphology.

To prove our hypothesis, cultured rat neonatal ventricular cardiomyocytes were treated with 10 nM of insulin for 0 - 24 h and three-dimensional images of cells were obtained using the mitochondrial dye Mitotracker Green and confocal microscopy. Three hours of insulin treatment promoted mitochondrial fusion as evidenced by an increase in the mean mitochondrial volume (+156%;  $p < 0.001$ ) and a reduction in the mitochondrial number (-60%;  $p < 0.001$ ). These changes were associated with both an increase in the levels of Opa-1 protein ( $+3.7 \pm 1.5$ ;  $p < 0.05$ ) and in its effective colocalization with the protein Mfn2. By means of electronic microscopy we also observed the apparition of giant mitochondria at 3 hours of treatment. However, at these same conditions, we did not find any change in the total levels of Mfn2 or in the constitutive mitochondrial protein, mtHsp70, ruling out mitochondrial biogenesis or degradative processes.

Regarding the control of metabolism, the treatment with insulin increased mitochondrial membrane potential (+21%;  $p < 0.05$ ), intracellular levels of ATP (+28%;  $p < 0.001$ ) and oxygen consumption rate (+19%;  $p < 0.01$ ). Transduction of cardiomyocytes with an adenovirus harboring an antisense Mfn2 oligonucleotide or a micro RNA against Opa-1 prevented all the insulin-induced changes in mitochondrial morphology and function. To confirm that these changes also occur in an *in vivo* model, C57BL6 mice were subjected to hyperinsulinemic-euglycemic clamps for 2 h, at the end of which, hearts were harvested. Relative to controls, insulin increased the total levels of Opa-1 protein by  $1.8 \pm 0.1$ - fold; ( $p < 0.001$ ), the ADP-stimulated respiration rate (+38;  $p < 0.05$ ) and ATP synthesis (+50%;  $p < 0.05$ ) evaluated in saponin-permeabilized fibers. Finally, the pre-treatment of cardiomyocytes with general inhibitors of the insulin transduction pathway RI/PI3-K/Akt avoided the insulin induced fusion, while rapamycin, a specific inhibitor of the mTORc1 protein, inhibited fusion and also also prevented the metabolic boost and the Opa-1 protein increase observed after insulin treatment, suggesting an active role for mTORc1, downstream the canonical insulin route in the control of mitochondrial dynamics.

These data indicate for first time that insulin acutely regulates mitochondrial metabolism through a mechanism that is dependent upon increased mitochondrial fusion.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades del metabolismo cardiaco

El corazón está formado principalmente por dos tipos celulares estrechamente vinculados. Los cardiomiocitos dan cuenta de la función contráctil de este órgano y corresponden al 33% del número total de células mientras que los fibroblastos actúan modelando la matriz extracelular (MEC) cardiaca y dan cuenta del 66% restante de las células totales **(Weber y Brilla, 1993)**. Los cardiomiocitos son células altamente especializadas que cesan de dividirse inmediatamente después del nacimiento, experimentando una diferenciación acelerada que concluye en aproximadamente 10 días **(Chien y cols., 1991)**. Los fibroblastos proliferan en respuesta a estímulos tróficos, mecánicos y de estrés tisular y sintetizan los componentes de la MEC tales como colágeno, fibronectina y laminina, entre otros **(Manabe y cols., 2002)**.

A nivel funcional, el corazón posee una elevada actividad metabólica, lo que requiere de un suministro continuo y abundante de ATP para realizar el trabajo mecánico que sustenta su contracción. En el adulto normal, este órgano sintetiza diariamente alrededor de 70 veces su peso en ATP, lo cual es equivalente a unos 30 kg **(Taegtmeyer, 1994)**. De esta manera, cualquier alteración en este delicado balance termina promoviendo el desarrollo y progresión de diversas patologías cardíacas.

En el corazón humano adulto, el 95% de la producción de ATP ocurre mediante fosforilación oxidativa mitocondrial, mientras que el 5% remanente, deriva de la glicólisis y del GTP formado en el ciclo de Krebs **(Detmer y Chan, 2007)**. El contenido de ATP cardiaco es relativamente bajo (5  $\mu\text{mol/g}$ ) y su tasa de hidrólisis muy elevada ( $\sim 30 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  en reposo), por lo que los niveles de ATP miocárdico se renuevan completamente cada 10 s **(Neely y Morgan, 1974)**. Con el fin de suplir esta alta demanda energética, los cardiomiocitos utilizan una amplia variedad de sustratos metabólicos. Así, en el corazón adulto humano, alrededor del 70% del ATP proviene de los ácidos grasos libres (AGL) **(Neely y Morgan, 1974)**.



Los metabolitos generados en la  $\beta$ -oxidación y en la glicólisis son incorporados al ciclo de Krebs, generando NADH y FADH<sub>2</sub>. Estas moléculas reductoras son posteriormente oxidadas en la mitocondria por la cadena transportadora de electrones, generando ATP. Este último es luego transferido a la molécula creatina por fosforilación, reacción catalizada por la creatina quinasa mitocondrial (CK). La fosfocreatina es una molécula de menor tamaño que el ATP, lo que facilita su difusión a través del aparato contráctil de la célula, en donde cede su fosfato al ADP, regenerando ATP en el mismo sitio de su utilización. Finalmente, la creatina regresa a la mitocondria, reiniciándose así, un nuevo ciclo (**Bessman y Geiger, 1981; Walliman y cols., 1992**). En condiciones de alta demanda energética, el ciclo de la creatina permite generar ATP a una tasa 10 veces mayor en comparación con la máxima capacidad de la fosforilación oxidativa (**Bittl y Ingwall, 1985**).

Los cambios metabólicos que experimenta el corazón insuficiente, han sido caracterizados tanto en estudios clínicos (**Zhang y cols., 1996; Zhang y cols., 1997**), como en modelos animales (**Remondino y cols., 2000**) y, entre ellos se incluyen alteraciones en el manejo de sustrato, la producción de ATP y el ciclo de la creatina. Los primeros estudios publicados describieron reducciones significativas en el contenido cardiaco de fosfocreatina (Pcr) en biopsias de pacientes con insuficiencia cardiaca (**Herrmann y Decherd, 1939**), lo que posteriormente, fue confirmado utilizando mediciones espectroscópicas *in vivo* (**Neubauer, 2007**). Este estado de depleción energética que caracteriza a la insuficiencia, se correlaciona directamente con la progresión clínica de la enfermedad, lo que ha motivado el interés por el estudio de la modulación metabólica como futuro blanco terapéutico. Más aún, en humanos, la evidencia clínica indica que el metabolismo energético mitocondrial desempeña un papel crítico en el desarrollo de diversas patologías cardiacas. Numerosas mutaciones asociadas a defectos específicos de genes que codifican para proteínas mitocondriales como el del translocador de nucleótidos de adenina (ANT), subunidades de los complejos respiratorios, enzimas participantes de la oxidación de los AGLs y moléculas relacionadas con el ensamblaje del complejo IV, entre otras, han sido detectadas en individuos con formas familiares de miocardiopatía dilatada (**Marín-García y Goldenthal, 2002**). Por otro lado, en biopsias de pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática se ha descrito la presencia de mitocondrias gigantes con una menor densidad de la matriz, lo cual

también se asocia a un aumento en su número (**Baandrup y cols., 1981**). Resultados similares se han observado en modelos de hipoxia experimental en ratas (**Sun y cols., 1969**), todo lo cual sugiere una gran plasticidad y dinámica de la red mitocondrial del cardiomiocito adulto, así como la participación activa de su remodelamiento en el desarrollo de diversas patologías.

## **1.2. La hormona insulina**

La insulina es una hormona peptídica esencial para la regulación de la homeostasis de la glucosa (**Levine y cols., 1949; Banting y Best, 1992**). Se sintetiza por las células -  $\beta$  del páncreas endocrino y secreta a la circulación en respuesta a aumentos en los niveles de glucosa circulante, a través de un mecanismo que involucra el transportador de glucosa GLUT-2, la razón ATP/ADP,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , entre otros múltiples factores (**Ohara-Imauzumi y Nagamatsu, 2006**). El RNAm de la insulina se traduce en el retículo endoplásmico de las células -  $\beta$  pancreáticas como pre-proinsulina y durante su tránsito por el aparato de Golgi se procesa en su extremo amino-terminal, generando proinsulina. Finalmente, se almacena insulina y péptido C en cantidades equimolares en las vesículas de secreción.

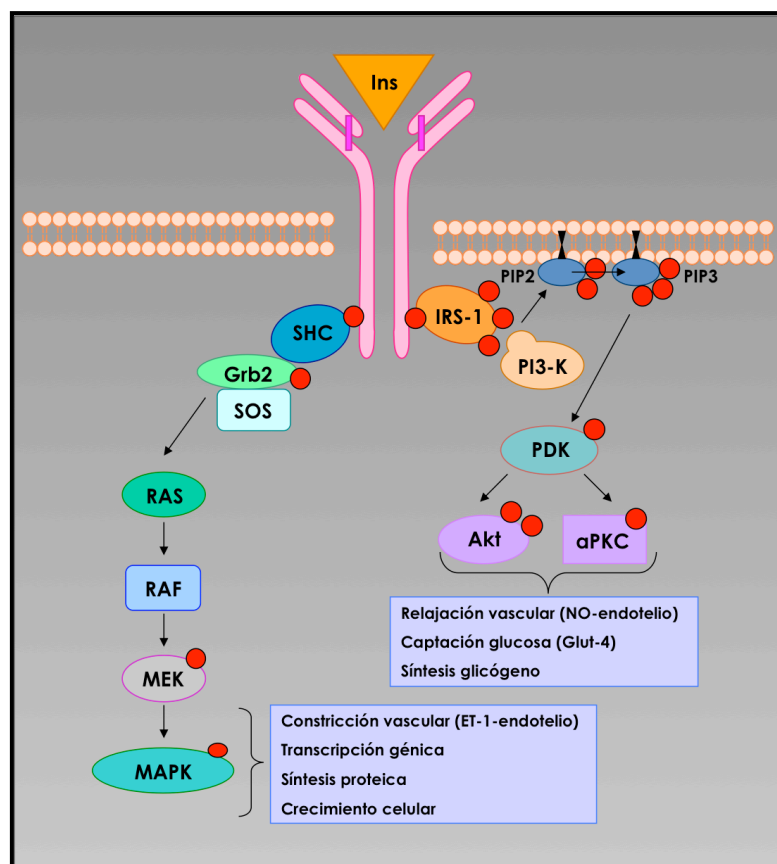
La insulina biológicamente activa consta de dos cadenas peptídicas unidas por tres puentes disulfuro. Así, las cadenas A y B, de 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente, están unidas por dos de estos puentes, mientras que las cisteínas 6 y 11 de la cadena A están unidas por el tercero, formando una estructura final de 51 aminoácidos con una masa molecular de 5,8 kDa y presentando una concentración plasmática que varía entre 0,01 y 12 nM, dependiendo si la determinación se efectúa antes o después de la ingesta de alimentos (**McDonald y cols., 2005**). La insulina posee una vida media de 5 min, lo cual permite un efectivo control de su concentración plasmática y una fina regulación de su bioactividad en diferentes tejidos y tipos celulares (**Wang y Chien, 1996**), siendo su acción mediada por receptores de membrana específicos (**Kahn y cols., 1974**). Estos receptores se expresan en casi todas las células del organismo y su clonamiento molecular en 1985 (**Ebina y cols., 1985; Ullrich y cols., 1985**), permitió el desarrollo de investigaciones concernientes a los mecanismos de transducción de

señales que dan origen a las acciones de la hormona en los diferentes contextos celulares y fisiológicos.

**1.2.1. Receptor de insulina y su sistema de transducción.** El receptor de insulina (RI) pertenece a la superfamilia de receptores de transmembrana con actividad tirosina kinasa intrínseca (**Yip y Ottensmeyer, 2003**). A diferencia de los otros integrantes monoméricos de esta familia, el receptor de insulina es un heterodímero de la forma  $(\alpha\beta)_2$ , unido por puentes disulfuro. La subunidad  $\alpha$ , de 135 kDa, está orientada hacia el espacio extracelular y censa los niveles circulantes de insulina. En cambio la subunidad  $\beta$ , de 95 kDa, contiene una porción extracelular, una región de transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina kinasa (**Yip y Ottensmeyer, 2003**). La unión de insulina a su receptor, induce un cambio conformacional en éste, permitiendo la autofosforilación de las subunidades  $\beta$ , proporcionándoles la actividad tirosina kinasa intrínseca y produciendo finalmente la activación de su cascada de transducción de señales (**Hwang y Frost, 1999**).

Una vez activada, la tirosina kinasa de la subunidad  $\beta$  del RI transfosforila sustratos intracelulares entre los que se incluyen la familia de proteínas IRS (del inglés, "*insulin receptor substrates*") y la proteína Shc, los cuales actúan como proteínas adaptadoras para otras moléculas señalizadoras río abajo en la transducción mediada por el receptor (**White, 2002**). La fosforilación en múltiples residuos de tirosina de las proteínas IRS genera motivos de reconocimiento para proteínas que contienen dominios del tipo SH2 (dominios de homología con la proteína Src del tipo 2), los cuales son reconocidos por diversos efectores, entre los que se incluyen la proteína fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3-K) y Grb-2. La proteína PI3-K es un heterodímero compuesto por las subunidades reguladora p85 y catalítica p110. Las proteínas PI3-Ks se subdividen en tres clases, siendo la clase IA la que señala río abajo de proteínas tirosina kinasa como el RI (**Engelman y cols., 2006**). Cuando los dominios SH2 de la subunidad p85 se unen a los motivos fosforilados de IRS-1, ésta activa alostéricamente a la subunidad catalítica preasociada p110, generando el producto lipídico fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>] a partir del sustrato fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (**Cantley, 2002**). Posteriormente, el lípido PI(3,4,5)P<sub>3</sub> se une al dominio con homología a pleckstrina de la proteína kinasa dependiente de 3-fosfoinositidos (PDK-1), lo que lleva a su

activación por fosforilación y la consiguiente activación de otras serina-treonina kinasas, entre las que se incluyen Akt (también denominada proteína quinasa B o PKB) y diferentes isoformas atípicas de la proteína quinasa C (PKC) (Alessi y cols., 1997; Vanhaesebroeck y Alessi, 2000). Finalmente, esta vía transduccional dependiente de PI3-K, culmina con una cascada de fosforilaciones de proteínas serina-treonina kinasas río abajo de PDK-1, las que median la mayoría de las acciones metabólicas de insulina (Muniyappa y cols., 2007) (Figura 1). Cabe destacar, que de las tres isoformas de la proteína Akt descritas hasta la fecha (Akt1, Akt2 y Akt3), sólo Akt2 ha sido vinculada con el control del metabolismo celular (Cho y cols., 2001; Bae y cols., 2003). Por consiguiente, desde este punto en adelante, todas las alusiones a la proteína, se refieren a la segunda isoforma, a menos que se especifique lo contrario.



**Figura 1. Características generales de las vías de transducción de insulina (Ins)**

La vía transduccional de la proteína PI3-K regula el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado, mientras que la vía que involucra a las proteínas MAPK, generalmente regula procesos de crecimiento y mitogénesis celular, así como la secreción de ET-1 en el endotelio vascular. Ins, insulina; PI3-K, fosfatidilinositol 3-quinasa; Akt, proteína quinasa B; SOS, factor de intercambio de GTP; MAPK, proteínas kinasas activadas por mitógenos (Adaptado de Muniyappa y cols., 2007).

Una segunda vía transduccional del receptor de insulina, se inicia con el reconocimiento de IRS-1 por los dominios SH2 de la proteína Grb-2, lo que resulta en la activación del factor preasociado de intercambio de GTP, SOS (**Gustafson y cols., 1995; Nystrom y Quon, 1999**). Este factor activa a la GTPasa pequeña Ras, la cual inicia una cascada de fosforilaciones que involucra a la proteína Raf y a la familia de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) (**Reusch y cols., 1995; Nystrom y Quon, 1999**). Esta segunda vía de señalización, generalmente da cuenta de las acciones biológicas de insulina que se relacionan con el crecimiento, mitogénesis y diferenciación celular (**Figura 1**). Como puede observarse, las vías transduccionales dependientes de insulina, se organizan como complejas redes que incluyen múltiples circuitos de retroalimentación, conversaciones cruzadas entre vías principales y entre las rutas reguladas por receptores heterólogos, todo lo cual contribuye finalmente a la especificidad y regulación fina de la acción hormonal (**Taniguchi y cols., 2006; Vinciguerra y Foti, 2006; Muniyappa y cols., 2007**) (**Figura 1**).

**1.2.2. Acción de insulina en el corazón de mamíferos.** Las patologías cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad y morbilidad en nuestro país, por lo que actualmente, existe un gran interés en investigarlas, con la finalidad de conocer sus mecanismos fisiopatológicos y encontrar nuevos y mejores blancos terapéuticos. Debido a que el corazón es una bomba que está en constante funcionamiento, que posee una gran demanda energética de ácidos grasos y glucosa y que, presenta una cantidad importante de mitocondrias que efectúan el metabolismo oxidativo aerobio, movilizándolo el  $\text{Ca}^{2+}$  constantemente para su actividad contráctil, se hace necesario determinar con exactitud el papel de insulina en el control metabólico mitocondrial de este órgano.

Actualmente sabemos que en el corazón, insulina regula el metabolismo modulando el transporte de glucosa, la glicólisis, la síntesis del glicógeno, el crecimiento, la contractibilidad y la apoptosis de los cardiomiocitos (**Brownsey y cols., 1997; Abel 2005**). Todas estas acciones son mediadas por la activación de los RIs, los cuales se expresan en niveles que se encuentran entre los 10.000 y 100.000 receptores por célula (**Abel, 2004**). La oxidación de ácidos grasos proporciona aproximadamente el 70% de la energía necesaria para el

funcionamiento del corazón, mientras que la glucosa y el lactato dan cuenta del 30% restante. En los cardiomiocitos, el ingreso de glucosa dependiente de insulina se lleva a cabo principalmente por el transportador GLUT-4. Sin embargo, también existe adicionalmente, una captación de glucosa basal que depende del transportador GLUT-1. La translocación al sarcolema del GLUT-4 mediada por la contracción, también contribuye significativamente a la captación de glucosa por parte del miocardio **(Abel, 2004)**. Como en otros tejidos sensibles a la glucosa, la señalización de insulina por la vía PI3-K/Akt juega un papel fundamental en los procesos de captación. Paralelamente, y a nivel metabólico, la activación de Akt también promueve la acumulación cardiaca de glicógeno por medio de la inhibición simultánea de la glicógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3 $\beta$ ) y de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) **(Brownsey y cols., 1997; Kovacic y cols., 2003)**, la fosforilación del factor de transcripción FOXO-1, conocido modulador del metabolismo lipídico y glucolítico **(Ouwens y cols., 2005)** y del complejo mTORc1 (del inglés, "*mammalian target of rapamycin*"), punto de convergencia evolutivamente conservado, que regula la sensibilidad celular frente a la disponibilidad de nutrientes y el crecimiento celular **(Moschella y cols., 2007; Sharma y cols., 2007)**, sugiriendo una conexión entre las acciones anabólicas y metabólicas de la insulina en el corazón.

### **1.3. Fusión, fisión mitocondrial y regulación del metabolismo**

Las mitocondrias juegan un papel esencial en la mantención de la homeostasis metabólica de las células eucariontes, proveyendo a las células de abundante energía, la cual se genera a través de la fosforilación oxidativa. Además de ser el compartimiento para numerosas otras reacciones esenciales en el metabolismo y jugar un papel importante en la muerte y envejecimiento celular **(Shcheffler, 2001; Kuzmicic y cols., 2011)**.

Las mitocondrias corresponden a organelos complejos, rodeados por una doble membrana, con una morfología y distribución intracelular característica para cada tipo celular. En las fotografías clásicas de microscopía electrónica, aparecen como organelos individuales, debido a que estas imágenes sólo muestran una sección individual a través de la célula. Sin embargo, esta visión está sobresimplificada dado que las mitocondrias constituyen un complejo retículo, es

decir, una red interconectada y altamente dinámica, mantenida por eventos permanentes, opuestos y balanceados de fusión y fisión (**Westerman, 2002**). Por lo tanto, el número de túbulos, sus conexiones, y la completa morfología del organelo, así como su distribución subcelular está dinámicamente controlada. Evidencias recientes muestran que la maquinaria que gobierna la morfología y dinámica mitocondrial también participa en la regulación temporal del metabolismo (**Hackenbrock, 1966; Scalettar y cols., 1991**). Estos hallazgos no deberían sorprender dado que la estructura de las crestas mitocondriales y la condensación de la matriz observadas por microscopía electrónica, se han considerado clásicamente como un reflejo del estado metabólico mitocondrial (**Hackenbrock, 1966; Scalettar y cols., 1991**). Así, los cambios morfológicos también coinciden con un amplio número de procesos fisiológicos, siendo un excelente ejemplo de ello, las transiciones entre diferentes estados respiratorios y el remodelado de las crestas mitocondriales observadas durante la apoptosis (**Mannella y cols., 1994; Scorrano y cols., 2002; Germain y cols., 2005**). Coherentemente, la pérdida o mutación de algunas proteínas de la membrana interna mitocondrial (MMI), afecta directamente la morfología de las crestas, lo que lleva finalmente a una disminución de la respiración celular. Así, la delección de la GTPasa de la membrana interna mitocondrial Opa-1, implicada en procesos de fusión del organelo, causa vesiculación de la red, alteraciones en el metabolismo y una mayor susceptibilidad a la muerte por apoptosis (**Paumard y cols., 2002; Olichon y cols., 2003; Arselin y cols., 2004; Griparic y cols., 2004; Chen y cols., 2005; John y cols., 2005; Bornhovd y cols., 2006**).

**1.3.1. La maquinaria de la fisión mitocondrial.** La fisión mitocondrial en las células mamíferas está regulada, entre otras, por la proteína GTPasa relacionada con la familia de las dinaminas (Drp-1). La secuencia aminoacídica de Drp-1 comparte una similitud importante con las dinaminas, las cuales son GTPasas que regulan el tráfico vesicular y la endocitosis. La función molecular precisa de las dinaminas y de Drp-1 aún no está completamente aclarada; sin embargo, uno de los modelos más aceptados postula que las dinaminas y Drp-1 actúan como mecanoenzimas que participan activamente en la constricción de membranas y su corte (**Bossy-Wetzel y cols., 2003**).

La caracterización estructural y cinética de la proteína Dnm1, el equivalente de Drp-1 en levaduras, mostró que esta proteína aumenta su actividad y oligomeriza formando espirales en función de la concentración de GTP. Estos resultados indican que el ensamblaje de Dnm1 se regula positivamente por este nucleótido, el cual funcionaría como un activador conformacional **(Ingerman y cols., 2005)**. Mutaciones en el dominio de unión a GTP de Dnm1 bloquean la capacidad de la proteína de auto-ensamblarse y formar espirales *in vitro*, así como de estimular *in vivo* la división mitocondrial **(Naylor y cols., 2006)**. A diferencia de Dnm1, Drp-1 también oligomeriza *in vitro* tras la unión de GTP, pero con una eficiencia menor que su homóloga de levaduras, sólo como anillos simples y no formando espirales extendidos **(Yoon y cols., 2001)**.

Drp-1 reside en el citoplasma celular, pero también se acumula en fosas de la membrana mitocondrial externa (MME) que representan futuros sitios de fisión. Drp-1 carece de una secuencia de destinación mitocondrial y por ello se recluta a la membrana por medio de Fis-1, una pequeña proteína adaptadora que participa en el ensamblaje de complejos de fisión de alta masa molecular **(Bossy-Wetzel y cols., 2003)**. Sin embargo, la reducción de los niveles de Fis-1 mediante un RNA de interferencia (RNAi) no altera la translocación de Drp-1 hacia la mitocondria **(Lee y cols., 2004)**. Actualmente sólo se ha mostrado una leve, pero directa interacción entre Fis-1 y Drp-1 en modelos de proteínas recombinantes, pero esta asociación aún no se ha descrito *in vivo* **(Yoon y cols., 2003)**. En contraste, en levaduras mutantes para Fis-1, la localización mitocondrial de Dnm1p se pierde completamente. Fis1p recluta a Dnm1p hacia la mitocondria a través de dos adaptadores moleculares, Mdv1p y Caf4p **(Griffin y cols., 2005)**. Adicionalmente Mdv1p juega también un papel en la activación post reclutamiento de Dnm1p **(Tieu y cols., 2002; Cervený and Jensen, 2003; Griffin y cols., 2005)**, sin embargo, aún no se ha probado la existencia de estas proteínas en mamíferos **(Figura 2)**.

Diferentes estudios han mostrado que la morfología mitocondrial cambia durante la apoptosis, dando como resultado mitocondrias pequeñas, esféricas y más numerosas **(Mancini y cols., 1997; Desagher y Martinou, 2000; Frank y cols., 2001; Pinton y cols., 2001; Jagasia y cols., 2005)**; por lo que se ha propuesto una asociación, aún muy discutida, entre la activación de la maquinaria de la fisión

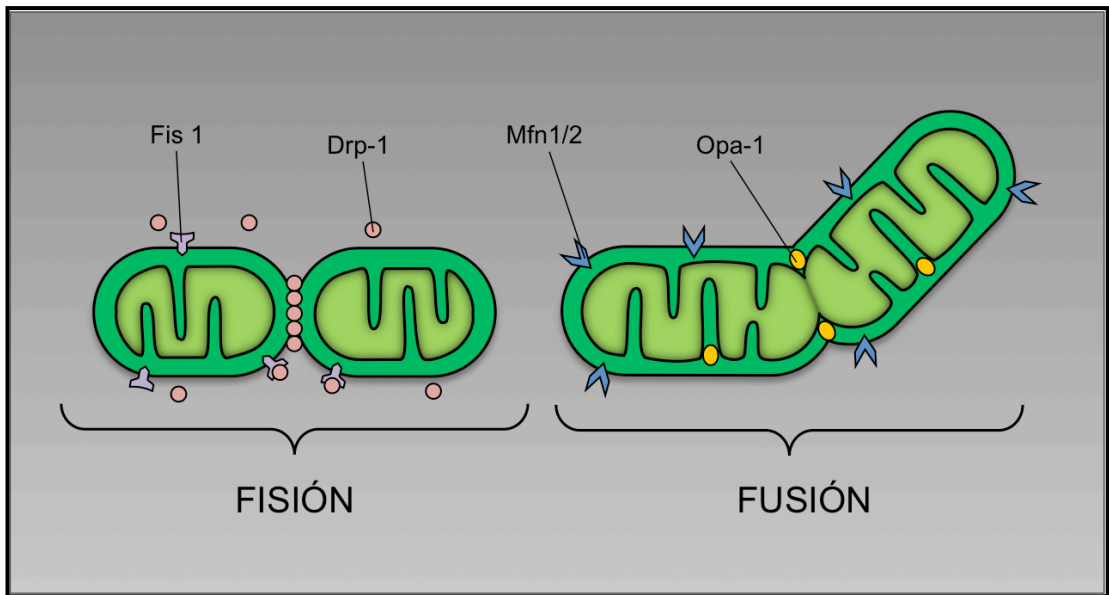


mitocondrial y este proceso de muerte celular (**Lee y cols., 2004; Youle y Karbowski, 2005; Martinou y Youle, 2006; Arnoult 2007**). Bajo condiciones específicas se observa que Drp-1 interactúa con Bax en sitios que marcarán el inicio de la fragmentación de la membrana mitocondrial, siendo este proceso un prerrequisito para la permeabilización de la membrana externa del organelo y la liberación del citocromo C (**Martinou y Youle, 2006**). Sin embargo, en otros modelos, la fragmentación y la apoptosis, serían eventos independientes. Gran parte de estos estudios se han realizado en líneas celulares, existiendo muy pocos en cultivos primarios. Esto último, nos llevó a investigar, hace ya más de 5 años, la relación entre la muerte celular programada inducida por ceramidas y la dinámica mitocondrial en cardiomiocitos de rata neonata (**Parra y cols., 2008**). En este trabajo mostramos, por primera vez, la presencia de la maquinaria de la fisión mitocondrial en el cardiomiocito y su relación con eventos tempranos de la apoptosis, así como se logró la implementación y el desarrollo de una serie de procedimientos experimentales para el estudio de la dinámica mitocondrial en este modelo (**Parra y cols., 2008**).

**1.3.2. La maquinaria de la fusión mitocondrial.** Las proteínas Mitofusina 1 y 2 (Mfn1, Mfn2) y Opa-1 son esenciales en el proceso de fusión mitocondrial (**Chen y cols., 2003; Eura y cols., 2003; Ishihara y cols., 2003; Cipolat y cols., 2004; Chen y cols., 2005**). Las tres proteínas corresponden a GTPasas de alta masa molecular localizadas en la mitocondria. Mfn1 y Mfn2 comparten un 81% de homología y topologías similares (**Santel y Fuller, 2001; Legros y cols., 2002; Rojo y cols., 2002; Chen y cols., 2003; Santel y cols., 2003**). Ambas residen en la MME y su estructura posee dos dominios, uno amino-terminal con actividad GTPásica, relacionado con la familia de las dinaminas, y otro carboxilo-terminal homólogo a la proteína Fzo de levaduras (**Jaroszewski y Godzik, 2002; Rojo y cols., 2002**). Por su parte Opa-1, la segunda proteína implicada en la fusión mitocondrial, también corresponde a una GTPasa. Su estructura ha revelado una secuencia de destinación mitocondrial en el dominio amino-terminal, un dominio transmembrana, un dominio central GTPásico relacionado con la familia de las dinaminas y un dominio C-terminal helicoidal (**Jaroszewski y Godzik, 2002; Bossy-Wetzel y cols., 2003**). Opa-1 es una proteína del espacio transmembrana, íntimamente asociada al espacio interno de la mitocondria (**Olichon y cols., 2002**).

Sin embargo, existen, al menos, 8 isoformas generadas por corte y empalme alternativo (**Delettre y cols., 2001**), algunas de las cuales muestran localizaciones diferenciales. La fusión de la MME y de la MMI parecen ser y funcionar como dos eventos independientes y separados: la fusión de la membrana externa requiere bajos niveles de hidrólisis de GTP, mientras que la de la membrana interna requiere altos niveles de hidrólisis y depende de la existencia de un potencial de membrana mitocondrial intacto ( $\Psi_{mt}$ ) y, por lo tanto, de una alta síntesis de ATP (**Malka y cols., 2005**).

Presumiblemente, ambas Mfns y Opa-1 actúan en forma conjunta, promoviendo la fusión mitocondrial. En concordancia con esta idea, se ha sugerido que Opa-1 estimula la tubulación mitocondrial, un proceso dependiente de Mfn-1 (**Cipolat y cols., 2004**). Mfn1 y Mfn2 pueden formar homo u heterodímeros (**Chen y cols., 2003**), pero aún no se ha demostrado una interacción directa entre Mfns y Opa-1 en células mamíferas. En levaduras, estudios de inmunoprecipitación han mostrado asociaciones débiles, pero reproducibles entre Fzo1 y Mgm1p, los análogos a Mfn y Opa-1, respectivamente (**Sesaki y cols., 2003; Wong y cols., 2003**), y Ugo1p, otra proteína necesaria para la fusión y que interactuaría con este complejo, pero de la cual aún no se encuentran homólogos en mamíferos (**Chen and Chan, 2005**) (**Figura 2**).



### Figura 2. Dinámica de la red mitocondrial en células de mamíferos

Durante la fisión, la proteína Fis1 recluta a la GTPasa Drp-1 (*"dynamain-related protein 1"*), a sitios definidos de la membrana mitocondrial externa; mientras que en la fusión, dos mitocondrias se acoplan a través de las proteínas Mfn1 y 2 por interacciones de dominios cola-cola, las cuales se encuentran localizadas en la membrana externa mitocondrial. Posteriormente, la proteína Opa-1, parcialmente anclada a la membrana interna mitocondrial, es la encargada de llevar a cabo en forma activa el proceso de fusión mitocondrial (Adaptado de Kuzmicic y cols., 2011).

Por medio del marcaje selectivo *in vivo* con mtPA-GFP de grupos de mitocondrias y su observación temporal, se han identificado mitocondrias que son incapaces de realizar procesos de fusión por su inhabilidad de diluir la marca de mtPA-GFP. El co-marcaje con TMRE (sonda sensible al  $\Psi_{mt}$ ) o con un anticuerpo anti Opa-1 ha revelado que estas mitocondrias poseen un potencial más bajo y un 50% menos de Opa-1 en comparación con el resto de la red mitocondrial (Twig y cols., 2008). Sin embargo, los mecanismos bioquímicos que relacionan el procesamiento de Opa-1 con los parámetros bioenergéticos celulares han sido estudiados sólo por un número limitado de grupos. Así, Herlan y cols. mostraron que la proteína Mgm1 de levaduras, experimenta procesos de corte y empalme dando una isosforma pequeña (c) y otra mayor (l) en un proceso dependiente de ATP (Herlan y cols., 2004). Por otra parte, los estudios en mamíferos han revelado que la isoforma-l de Opa-1 se proteoliza (o degrada) bajo condiciones que depolarizan la membrana mitocondrial o causan depleción de ATP (Duvezin-Caubet y cols., 2006; Ishihara y cols., 2006; Griparic y cols., 2007; Song y

**cols., 2007**). Debido a que ambas isoformas, c y l, se requieren para la fusión mitocondrial (**Song y cols., 2007**), una disminución en la síntesis de ATP desencadena la fragmentación de la red mitocondrial al regular los niveles de las isoformas de Opa-1, sin embargo, la naturaleza de la regulación de estos procesos se mantuvo elusiva hasta el año 2009, cuando la proteasa de la membrana interna mitocondrial OMA-1 fue caracterizada en dos trabajos independientes (**Ehses y cols., 2009; Head y cols., 2009**). Ambos estudios demostraron que la disminución de OMA-1 por silenciamiento, inhibe completamente la proteólisis de la proteína Opa-1 (**Ehses y cols., 2009; Head y cols., 2009**), actuando entonces como un regulador primario de los procesos de fusión. OMA-1 es una metaloproteasa dependiente de zinc, inserta en la MMI (**Kaser y cols., 2003**). Actualmente, se encuentra bien caracterizada en modelos de levaduras, sin embargo, su ortóloga humana (MPRP-1) se localizó original y erróneamente, en el retículo endoplásmico, en donde pasó prácticamente desapercibida hasta el año 2003 (**Bao y cols., 2003**). Estudios más recientes han mostrado, ineludiblemente, la casi exclusiva localización de sus dos formas en la mitocondria, una primera forma de 40 kDa y otra de 60 kDa, siendo esta última la forma activa, la cual se acumula en la mitocondria durante eventos de disipación del  $\Psi_{mt}$ , lo que lleva finalmente a la proteólisis de Opa-1 (**Ehses y cols., 2009; Head y cols., 2009**). La regulación de este proceso, el que finalmente conecta la regulación de la morfología mitocondrial, con el funcionamiento del organelo, es un tema de incesante estudio en la actualidad.

Paralelamente, evidencias adicionales también han sugerido que la fusión mitocondrial regula directamente el metabolismo mitocondrial (**Chen y cols., 2005**). De esta forma, la disminución de los niveles de la proteína Opa-1 o de cualquiera de las dos Mfns por medio de RNAi, lleva a la formación de mitocondrias fragmentadas con menor consumo de oxígeno y con un menor potencial electroquímico (**Chen y cols., 2005**). Aunque estas tres GTPasas son conocidas participantes de los procesos de fusión y remodelado mitocondrial, no se sabe cuál es su relación específica con la maquinaria metabólica de la célula. Siendo aún una incógnita, el porqué la pérdida de alguna de ellas interfiere directamente con la respiración celular. Este efecto, es específico para la pérdida de proteínas de la fusión, más que con transiciones morfológicas individuales, ya que la fragmentación

inducida por la estimulación de la fisión, no interfiere con el metabolismo (**Chen y cols., 2005**). La disfunción metabólica que caracteriza a este tipo de mitocondrias podría entonces, ser secundaria a requerimientos de intercambio de metabolitos a lo largo de la red organelar, por ejemplo DNA mitocondrial o  $\text{Ca}^{+2}$ . En concordancia con estos resultados, se ha observado que la sobreexpresión de Mfn2 en cultivos celulares, incrementa los complejos respiratorios, la oxidación mitocondrial y la utilización de glucosa por parte de las células (**Bach y cols., 2003; Pich y cols., 2005**). Adicionalmente, el RNAm y la expresión proteica de Mfn2 se encuentran disminuidos en modelos de ratas Zucker obesas (**Bach y cols., 2003; Pich y cols., 2005**) y en pacientes obesos y diabéticos (**Bach y cols., 2005**), lo que destaca la importancia patológica de las alteraciones en la dinámica mitocondrial.

#### **1.4. Papel de proteínas kinasas y fosfatasas en la regulación metabólica a nivel mitocondrial**

Dado que no existe una relación directa entre la fusión/fisión mitocondrial y los complejos proteicos que regulan la función mitocondrial, la pregunta obvia que surge es cómo la regulación morfológica se traduce en variaciones en el metabolismo, o viceversa. Una posibilidad es que la maquinaria que regula la morfología pudiese estar integrada en vías que regulen modificaciones post-traduccionales de los complejos metabólicos. Experimentos realizados hace ya más de 40 años, mostraron que la fosforilación del complejo proteico de la matriz mitocondrial, piruvato deshidrogenasa (PDH) inhibe la conversión de piruvato a acetil-CoA, el primer paso en el ciclo de Krebs (**Linn y cols., 1969**). De forma interesante, un mecanismo para la regulación rápida de la PDH y que complementa la actividad de las kinasas clásicas de esta proteína, se ha relacionado con insulina. Esta hormona gatilla la activación de Akt por medio de PI3-K (**Taniguchi y cols., 2006**). Akt controla un amplio número de vías metabólicas y se transloca hacia la matriz mitocondrial en respuesta a insulina (**Bijur y Jope, 2003a**). Un blanco conocido de la Akt activada es la proteína GSK-3 $\beta$  (**Cross y cols., 1998**) y aunque su localización mayoritaria es citosólica, también se encuentra en la mitocondria (**Bijur y Jope, 2003b**). La forma no fosforilada de GSK-3 $\beta$  es una kinasa activa que, entre otros sustratos, tiene como blanco a PDH, disminuyendo la actividad metabólica (**Hoshi y cols., 1996**). La fosforilación de GSK-3 $\beta$  por Akt, inhibe su actividad kinasa, causando la desfosforilación y activación de PDH y un incremento

del metabolismo mitocondrial. Aunque todos estos datos requieren de mayor confirmación, representan un mecanismo de regulación de componentes del metabolismo por estímulos extracelulares, los cuales también pudiesen estar regulando a proteínas implicadas en el remodelado de la morfología mitocondrial. El cómo estas proteínas se integran en la regulación de estas vías es un tema que requiere ser estudiado.

El complejo proteico mTORc1 es otro actor molecular importante en las rutas transduccionales activadas por insulina, el cual es fosforilado tras la activación de la proteína Akt en el corazón (**Moschella y cols., 2007; Sharma y cols., 2007**). Dos estudios han involucrado a este complejo en la directa regulación de la función mitocondrial, así como de la tasa respiratoria basal y desacoplada de las células mamíferas, jugando así un importante papel en la determinación del balance relativo entre las fuentes mitocondriales y no mitocondriales para la obtención de ATP (**Schiecke y cols., 2006; Ramanathan y Schreiber, 2009**). Asimismo, también se ha demostrado que mTORc1 colocaliza con la membrana externa mitocondrial (**Desai y cols., 2002**), proponiéndose a la proteína AMPK como una probable reguladora de este proceso (**Corradetti y cols., 2004**), sin embargo, el mecanismo específico se desconoce (**Ramanathan y Schreiber, 2009**). Todas estas interrogantes, además del importante papel que juega este complejo como punto crítico de regulación, tanto para las vías anabólicas y metabólicas de la insulina, lo hacen un blanco interesante y altamente novedoso en el estudio de la relación entre la morfología y la función mitocondrial, siendo éste el primer trabajo a la fecha, que ha propuesto tal relación.

### **1.5. Insulina, metabolismo y morfología mitocondrial**

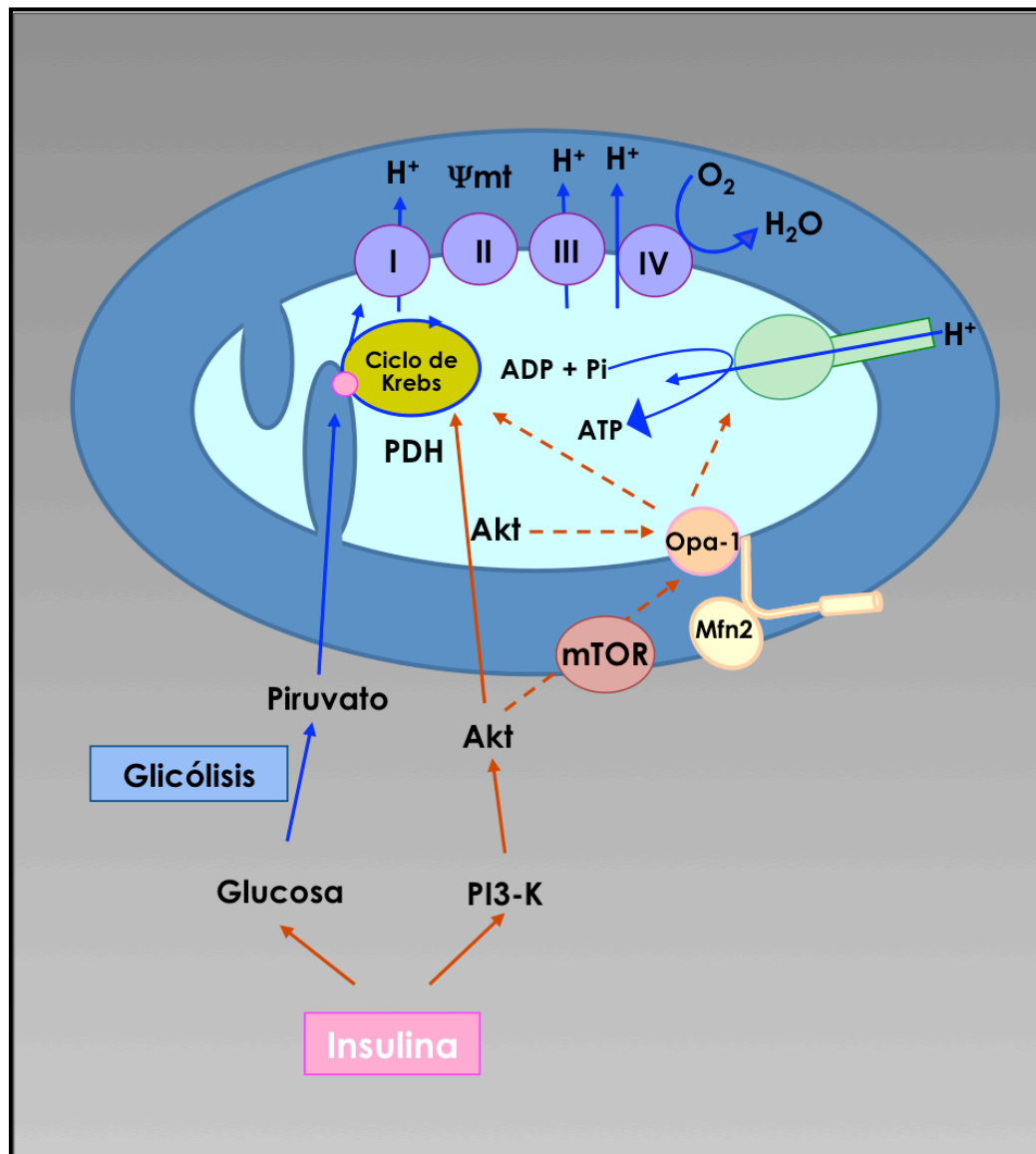
De acuerdo a todos los antecedentes bibliográficos planteados, y puesto que insulina regula el estado de fosforilación de enzimas claves del metabolismo energético a través de la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt, se propone que esta misma hormona también controle la morfología mitocondrial, lo cual establecería por primera vez, una relación directa entre la morfología y la función de este organelo. Si esta idea es correcta, se explicaría en parte el hecho de porqué tanto en pacientes obesos, como insulino-resistentes, existen alteraciones en proteínas de la maquinaria de la fusión y fisión mitocondrial (**Bach y cols., 2003**;

**Walder y cols., 2005**). Adicionalmente, y apoyando esta misma idea, nuevas evidencias sugieren que el balance entre ambos procesos es importante para la regulación de la energética mitocondrial en mamíferos (**Civitarese y Ravussin, 2008**). Así, dos estudios de grupos paralelos han observado que en estados de resistencia a insulina, se producen reducciones importantes de los niveles de dos proteínas involucradas en los procesos de fusión mitocondrial (Mfn2 y PARL) (**Bach y cols., 2003; Walder y cols., 2005**), lo cual sugiere que una disminución neta en el proceso de fusión mitocondrial sería un factor etiológico importante en el desarrollo de obesidad, resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo-2 y enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Esta disminución en la fusión, daría como resultado una disminución en el contenido mitocondrial y, por lo tanto, una disminución en la capacidad oxidativa de la célula, llevando a una regulación defectuosa de la homeostasis y de la energética celular (**Civitarese y Ravussin, 2008**). Sin embargo, hasta la fecha, las vías implicadas en este tipo de regulación continúan siendo desconocidas.

Todos estos antecedentes más el hecho de que tanto la diabetes, como la obesidad aumentan el riesgo de los accidentes cardiovasculares, hacen que el estudio de la modulación de la morfología mitocondrial por insulina en el corazón, así como el de las vías transduccionales implicadas en esta regulación, sean un blanco de vital importancia para el estudio de patologías relacionadas con el metabolismo energético celular. Bajo este contexto, planteamos las siguientes preguntas:

- ¿Cambia insulina la morfología mitocondrial en el cardiomiocito?
- ¿Dichos cambios morfológicos están asociados con el metabolismo mitocondrial?
- ¿La intervención genética de proteínas que participan en la fusión mitocondrial, altera la respuesta metabólica del cardiomiocito a insulina?
- ¿Qué vías transduccionales clásicas, activadas por insulina mediarían eventualmente estos efectos?

De esta forma, las preguntas previamente descritas, así como la relación que se tratará de establecer entre insulina, morfología y función mitocondrial, pueden observarse gráficamente en el esquema que se presenta a continuación, así como también en la hipótesis que se ha establecido como eje central para el desarrollo de esta tesis (**Figura 3**).



**Figura 3. Esquema general de trabajo**

En esta tesis se tratará de definir si insulina regula el metabolismo mitocondrial a través de procesos que involucran procesos de fusión o fisión mitocondrial, los cuales a su vez son regulados por la ruta transcripcional RI/IRS-1/PI3-K/Akt/mTORc1.



## **2. HIPÓTESIS**

“Insulina incrementa el metabolismo del cardiomiocito a través de un aumento de la fusión mitocondrial dependiente de la vía transduccional: receptor de insulina (RI), proteína sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1), fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3-K), proteína kinasa Akt y complejo mTORc1”.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar parámetros del metabolismo energético y de la morfología mitocondrial en cardiomiocitos expuestos a insulina y la relación que existe entre ambos procesos.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar los cambios morfológicos mitocondriales asociados a los procesos de fisión y/o fusión mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina.
- Evaluar los efectos de insulina sobre diferentes parámetros del metabolismo energético en cultivos primarios de cardiomiocitos, su relación con la morfología mitocondrial y cómo se alteran estos parámetros al modificar el balance entre los procesos de fusión y fisión mitocondriales.
- Estudiar si la vía transduccional activada por insulina: RI/IRS-1/PI3-K/Akt y el complejo mTORc1, participan en la regulación de la fusión y fisión mitocondrial en el cardiomiocito.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio Hank's, medio DME, medio 199, pancreatina, gelatina, triton X-100, 5-bromo-2'-deoxiuridina, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), rapamicina, actinomicina D, cicloheximida, citocalasina B, anticuerpo anti  $\beta$ -actina (A5441) y anti  $\beta$ -tubulina (T4026). En BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, EEUU) se adquirió el anticuerpo anti Drp-1 (611112). El anticuerpo anti Fis-1 (ALX-210-907) se obtuvo de Alexis Biochemicals (San Diego, CA, EEUU) y el anticuerpo anti mtHsp70 (MA3-028) en ABR-Affinity Bioreagents (Gloster, CO, EEUU). Los anticuerpos anti Opa-1 (anticuerpo monoclonal producido en ratón; ab55772 y el anticuerpo policlonal producido en conejo; ab42364) y anti Mfn2, se compraron en Abcam (Cambridge, MA, EEUU). En Cell Signalling (Danvers, MA, EEUU), se adquirieron los anticuerpos anti Akt (9272), anti fosfo-Akt (Ser473, cat. 9271), anti mTOR (2983) y anti fosfo-mTOR (Ser2448, cat. 2971). De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron: colagenasa tipo II, suero fetal bovino (FBS) y suero de ternera (FCS). Mitotracker Green-FM (M7514), tetrametilrodamina metil éster perclorato (TMRM, T-668) y los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexas anti ratón y conejo (A-11036, A-11034, A-11031 y A-11029) se compraron en Molecular Probes - Invitrogen (Eugene, OR, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU), así como los siguientes inhibidores: Inhibidor específico de Akt VIII (Akti, cat. 124018), Genisteína y LY294002 (Ly). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot ECL se adquirió en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a no ser que se especifique lo contrario. El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU). Finalmente, los adenovirus AsMfn2, Drp-1 DN K38A, así como los adenovirus codificantes para el micro RNA contra la proteína Opa-1 (microOpa-1) y su micro RNA control scrambled (microControl) fueron facilitados por el Dr. Antonio Zorzano (Institute of Research in Biomedicine, Barcelona Science Park, Universitat de Barcelona, España).

## **5.2. Modelos animales**

En la realización de esta tesis se utilizaron dos modelos experimentales, un primer modelo celular y uno segundo, animal. Para la realización del primero, se utilizaron cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata, los cuales se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Para el segundo modelo, se utilizaron ratones “*wild type*” (WT) de la cepa C57BL6 de 10 - 12 semanas con un peso de 20 – 25 g, los cuales se sometieron a una cirugía menor con la finalidad de realizar un clamp euglicémico-hiperinsulinémico, tal como se detallará más adelante en la sección 5.18. *Modelo experimental animal.*

Todos los animales se trataron siguiendo las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de experimentación: Guide for the Use of Laboratory Animals (NIH, Publication No. 85-23, revised 1996), siendo los protocolos experimentales además aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Chile y de la Universidad de Utah, EEUU. Esta tesis adicionalmente contó, para este motivo, con el apoyo de los proyectos: FONDECYT 1080436, MESESUP UCH0802 y del proyecto FONDAP 1501006.

## **5.3. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata**

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, se removieron y lavaron los corazones a 37°C en medio Hank's estéril, se eliminaron las aurículas y finalmente, los corazones se homogenizaron con el fin de iniciar la digestión enzimática, la cual permite obtener las células aisladas. Los ciclos de digestión se realizaron en presencia de colagenasa de tipo II (0,02 g/100 mL Hank's) y pancreatina (0,06 g/100 mL Hank's). Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial a superficies plásticas que presentan los 2 tipos celulares presentes en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos). El producto de la digestión se pre-plaqueó en botellas de cultivo de 250 mL durante 2 h en medio DME:M199 (4:1) 10% FBS. Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron, centrifugaron a 1.000 r.p.m durante 5 min y resuspendieron en 21 mL

de medio DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán, el que permite visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer.

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, sobre placas de cultivo precubiertas con una monocapa de gelatina (2% p/v) y mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de aire (**Gálvez y cols., 2003**).

#### **5.4. Modelo experimental celular**

Se utilizó Insulina Actrapid HM 100 UL/mL (Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca) como estímulo y modelo de estudio en cardiomiocitos de rata neonata, principalmente. Los cardiomiocitos se trataron con una concentración 10 nM de insulina durante los tiempos indicados (0, 0,5, 3, 6 y 24 h, en la mayoría de las series experimentales) y mantenidos en medio DME:M199 (4:1) suplementado con 10% de FBS, dado que la privación de nutrientes, induce la fragmentación de la red mitocondrial por sí sola (**Parra y col., 2008**), pasadas 24 h post-lavado. Todos los inhibidores se utilizaron 0,5 h antes y durante los estímulos a las concentraciones indicadas para cada uno de ellos.

#### **5.5. Tratamiento adenoviral**

Las células se sembraron a distintas densidades, dependiendo de las necesidades experimentales y luego de 24 h, se transdujeron con los adenovirus AsMfn2, Drp-1 DN K38A o microOpa-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.000 partículas virales por célula. Las células se mantuvieron bajo estas condiciones durante 24 h, antes de ser lavarlas y estimuladas con insulina. Como control de transducción se utilizó un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección para el caso de todos los Adenovirus utilizados, a excepción del microOpa-1, para el cual se utilizó el microControl.

## 5.6. Extracción de RNA, transcripción reversa y PCR en tiempo real (qPCR)

Se extrajo y aisló RNA para reacciones de transcripción reversa con la finalidad de:

- Evaluar el papel de insulina en la regulación de los niveles de transcrito primario de la proteína de la fusión mitocondrial Opa-1.

El RNA total se extrajo de cardiomiocitos de rata neonata, previamente estimulados y sembrados a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/placa en placas de 60 mm. Las células se lisaron con 500  $\mu$ L de Trizol (Gibco BRL, Carlsbad, CA, EEUU). Una vez obtenido el lisado, éste se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L de cloroformo a cada muestra, las cuales se mezclaron 20 veces por inversión y 20 s en vórtex, se incubaron a temperatura ambiente por 3 min y luego se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min en una microcentrífuga a 4°C. Luego de centrifugar, se formaron dos fases, la fase superior acuosa se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL para luego precipitar, en 250  $\mu$ L de isopropanol. Para esto, el tubo se invirtió varias veces con la finalidad de mezclar y se incubó a temperatura ambiente durante 5 – 10 min, formándose una pella que contiene el RNA precipitado. Las muestras se volvieron a centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. Posteriormente, la pella se lavó con 500  $\mu$ L de etanol 75% frío y se centrifugó a 12.000 g por 5 min a 4°C, eliminándose nuevamente el sobrenadante. La pella se dejó secar al aire y a temperatura ambiente, para luego ser resuspendida en 40  $\mu$ L de agua - DEPC (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, EEUU).

Para el tratamiento con DNAasa, se utilizó el kit 4368814 de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, EEUU). Para este fin; 300  $\mu$ L de cada una de las muestras de RNA, se traspasaron a tubos de 200  $\mu$ L a los cuales adicionalmente se les agregó 7,3  $\mu$ L de agua, 1  $\mu$ L de tampón 10x DNAsa I y 0,7  $\mu$ L de DNAsa I (2 U/ $\mu$ L). Esta mezcla se incubó por 30 min a 37°C y posteriormente, por 10 min a 65°C en un termociclador Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con el sistema de síntesis para RT-PCR Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU). Para este fin, se utilizaron 0,2  $\mu$ g de RNA totales, junto a

0,5 µL de partidores al azar o "random" a una concentración de 500 µg/mL. Esta mezcla se llevó a un volumen final de 5 µL con agua - DEPC a 65°C por 5 min y luego a 4°C por otros 5 min adicionales. Simultáneamente se preparó una mezcla de reacción que incluyó: 5,75 µL de agua - DEPC, 4 µL de 5x RT Buffer Improm-II (tampón de reacción), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,75 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL de RNAsin y 1 µL de Improm-II RVT, completando así un volumen final de 15 µL. Posteriormente, esta segunda mezcla se agregó a la inicial y se incubó por 5 min a 25°C, luego 60 min a 42°C y por último 15 min a 70°C. El DNAc obtenido se alicuotó y almacenó a -20°C hasta su uso en reacciones de PCR.

Los partidores para Opa-1 y β-actina, se diseñaron a partir de secuencias de RNAm presentes en GENBANK y el uso de softwares disponibles en Internet, como "Primer3" (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Una vez diseñados, se evaluó su especificidad, realizando una búsqueda de sus secuencias en Blast:

Partidores:

- Opa-1 (Rata) Sentido 5' TGACAAACTTAAGGAGGCTGTG 3'
- Opa-1 (Rata) Antisentido 5' CATTGTGCTGAATAACCCTCAA 3'
  
- β-actina (Rata) Sentido 5' CACCCGGCGAGTACAACCTTC 3'
- β-actina (Rata) Antisentido 5' CACCCGGCGAGTACAACCTTC 3'

La reacción de PCR en tiempo real se realizó utilizando el Kit Roche480 Sybre Green – 12203848 (Basel, Suiza) y un termociclador Mx3000P, Stratagene (Santa Clara, CA, EEUU). Mientras que el análisis de datos, se realizó utilizando el software MxPro. Para ello, primeramente se determinó para todas las muestras la abundancia del transcrito de β-actina (transcrito constitutivo) bajo las mismas condiciones en que posteriormente se determinarían los transcritos de interés: H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, tampón de PCR, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq 2U (Kit Taq Polimerasa, Fermentas), partidore sentido 0,5 µM, partidore antisentido 0,5 µM, SYBR Green 1/20.000 (Roche, Basel, Suiza), más 2 µL de templado (curva estándar o muestras). El programa de amplificación para todos los transcritos, consistió en un ciclo de denaturación inicial a 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos

de amplificación que consistieron en: un período de denaturación a 94°C por 20 s, uno de apareamiento a 60°C por 20 s y finalmente, uno de extensión a 72°C por 20 s. La fluorescencia se adquirió al final de la fase de extensión (lectura a 84°C por 7 s al final de cada ciclo). Finalmente, se realizó una curva de denaturación desde 72°C hasta 95°C, manteniendo una lectura continua de la fluorescencia.

La determinación de la abundancia de los transcritos se realizó utilizando una curva estándar en las que se usaron distintas diluciones del producto de PCR de interés a concentraciones finales conocidas. Finalmente, los resultados se expresaron como la razón transcrito de interés/ $\beta$ -actina.

### **5.7. Medición de la cantidad de DNA mitocondrial mediante qPCR**

El DNA total se extrajo de cardiomiocitos de rata neonata, previamente estimulados y sembrados a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/placa en placas de 60 mm. Las células provenientes de cada muestra, se lisaron, homogenizaron y digirieron en 300  $\mu$ L de tampón de lisis (10 mM Tris-Ccl, pH 8, 0,1 mM EDTA, 0,1% SDS y 3  $\mu$ L de proteinasa K proveniente de un stock de 10 mg/mL) desde 3° a 55°C. Posteriormente, se sonicaron 2 veces durante 15 s y se procedió a la extracción de DNA.

Para la extracción de DNA, se agregó el mismo volumen de muestra que de fenol, cloroformo o alcohol isoamílico. Las muestras se agitaron en vórtex y luego se centrifugaron a 14.000 g por 15 min. Una vez centrifugadas, se eliminó la fase acuosa y se volvió a realizar el mismo procedimiento. Se agregó 1/10 del volumen de acetato de sodio y 3 volúmenes de etanol al 100% y se mezcló por inversión. El DNA se dejó precipitar en hielo por 20 min, para posteriormente eliminar el sobrenadante. La pella se lavó con 500  $\mu$ L de etanol frío al 70% y luego se centrifugó a 14.000 g por 5 min. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y, la pella se dejó secar a temperatura ambiente, para luego ser disuelta en 40 – 60  $\mu$ L de agua con grado de PCR. Para cada muestra, se analizó la razón 260 – 280 nm con la finalidad de analizar la contaminación por proteínas y la razón 260 – 270 nm para la contaminación con fenol.

Una vez extraído el DNA nuclear y mitocondrial, se procedió a realizar una reacción de qPCR para la determinación del transcrito de la proteína mitocondrial citocromo b, tal como se describió en la sección 5.6. La determinación de la abundancia del transcrito se realizó utilizando una curva estándar en la que se utilizó distintas diluciones del producto de PCR a concentraciones finales conocidas. Finalmente, los resultados se expresaron como la razón transcrito de citocromo b/ $\beta$ -actina, tomándose así al transcrito para la proteína citocromo b como indicador del total del DNA mitocondrial presente en las muestras.

Partidores

- Citocromo b (Rata) sentido            5' AACATACGAAAAACACACCCATT 3'
- Citocromo b (Rata) antisentido    5' AGTGTATGGCTAAGAAAAGACCTG 3'

### **5.8. Preparación de extractos celulares totales**

Se prepararon extractos de proteínas totales para:

- Evaluar la participación de las proteínas involucradas en los procesos de fusión mitocondrial Mfn2 y Opa-1 en la fusión inducida por insulina en cardiomiocitos.
- Evaluar la participación de las proteínas Akt y mTORc1 en la regulación de la fusión mitocondrial gatillada por insulina.
- Evaluar cambios en proteínas mitocondriales constitutivas tras la estimulación con insulina, con el fin de descartar procesos de bioogénesis o de degradación mitocondrial.

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con solución PBS fría y luego se lisaron con 80  $\mu$ L de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; tritón X-100 1% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM). El homogenizado se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE



4x, para ser almacenado posteriormente a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **5.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, detección de: Opa-1, Mfn2, mtHsp70, Drp-1, Akt, fosfo-Akt (pAkt), mTOR y fosfo-mTOR (p-mTOR); se cargaron alrededor de 30  $\mu\text{g}$  de extracto proteico. El gel concentrador se preparó al 5% y el separador al 12%, sin embargo, para la detección de mTOR y fosfo-mTOR, el gel separador se preparó al 8%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis.

### **5.10. Electrotransferencia de proteínas**

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, EEUU) de 0,45  $\mu\text{m}$  a 0,45 A durante 90 min en tampón de transferencia.

### **5.11. Western blot**

Una vez transferidas, la membranas se trataron con tampón de bloqueo (TBS 1x; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios anti: Opa-1, Mfn2, mtHsp-70, Akt, pAkt, mTOR, p-mTOR (dilución 1:1.000 para todos ellos) o Drp-1 (dilución 1:750) en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  y con agitación suave.

Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, y se incubaron nuevamente, durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario; anti-IgG de ratón o conejo conjugado con peroxidasa, según corresponda, en un título de 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS 1x; Tween-20 al 0,1%.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot ECL y se expusieron en una película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se

digitalizaron y las imágenes se procesaron con la ayuda de los programas computacionales Photoshop 7.0 y USI Scan.

Después de realizar los ensayos de inmunowestern blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos. Posteriormente, para corregir las posibles diferencias de cantidades de proteínas cargadas en el gel, se analizaron los niveles de  $\beta$ -actina o  $\beta$ -tubulina, mediante reacciones de inmunodetección iguales a las descritas anteriormente (1° anticuerpo 1:1.000 y 2° anticuerpo anti-ratón 1:5.000 para ambos anticuerpos).

### **5.12. Inmunofluorescencia indirecta**

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se utilizó para:

- Evaluar la distribución subcelular de las proteínas involucradas en los procesos de fusión mitocondrial Mfn2 y Opa-1 antes y después de la estimulación de cardiomiocitos de rata neonata con Insulina.
- Evaluar la distribución subcelular de las proteínas de la fisión mitocondrial, Drp-1 y Fis-1 antes y después de la estimulación con Insulina.

Posterior al cultivo, los cardiomiocitos de rata neonata se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2%). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS (filtrado) durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos anti: mouse Opa-1 (dilución 1:500), Mfn2 (dilución 1:500), Drp-1 (dilución 1:750) o Fis-1 (dilución 1:1.000) en PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Se lavaron nuevamente con PBS y luego se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz con el anticuerpo secundario Alexa 488 o 568, anti mouse o anti conejo, según corresponda (dilución 1:500). Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje, el cual además retarda el decaimiento de la fluorescencia. Una vez montadas, las inmunofluorescencias se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss Microsystems, Oberkochen,

Alemania). El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (NIH, EEUU), tal como se describirá más adelante.

### **5.13. Determinación del potencial de membrana y de la masa mitocondrial mediante citometría de flujo**

Para estos experimentos, se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo. La sonda TMRM (excitación: 543 nm, emisión: sobre los 560 nm) se utilizó como marcador del potencial de membrana mitocondrial, mientras que Mitotracker Green-FM (excitación: 488 nm, emisión: 515-530 nm) se utilizó como marcador de masa. Ambas sondas se cargaron 30 min antes de la realización de las mediciones, a una concentración final de 200 y 400 nM, respectivamente. Una vez finalizados los estímulos con insulina y la carga de la sonda, se removió el medio y las células se suspendieron utilizando 300  $\mu$ L de una solución de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS durante 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min de tripsinización, la reacción se detuvo utilizando FBS en una proporción 1:10. Posteriormente, las células ya cargadas se traspasaron a tubos BD para citometría y su fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo FACS-SCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU). La disminución en la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la caída del potencial mitocondrial en el caso de la TMRM, así como la fluorescencia de la sonda Mitotracker Green-FM es proporcional a la masa mitocondrial. Para ambos experimentos se utilizó el desacoplante CCCP 50  $\mu$ M durante 30 min como control. Finalmente, los resultados se expresaron como los promedios de mediciones normalizadas con respecto a las células control o sin tratamiento (**Munoz y cols., 2010**).

### **5.14. Medición de los niveles intracelulares de ATP mediante luminometría**

Para el caso de los ensayos que permiten estudiar los niveles relativos de ATP intracelular, se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Una vez finalizados los estímulos con insulina, se removió el medio de las placas y se agregaron 20  $\mu$ L de medio Krebs con  $\text{Ca}^{2+}$  (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.0 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES-Na, 5.6 mM glucosa, pH 7.4). A continuación, se adicionó el tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) en una relación 1:1. La placa se agitó durante 2 min con el fin de completar la reacción. Posteriormente, las células se traspasaron

a una placa opaca de 96 pocillos y se analizaron en un luminómetro TopCountNXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EEUU), siendo la luminiscencia estable por un período de hasta 4 h. Finalmente, los resultados se expresaron como los promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento o control (**Villena y cols., 2008; Marambio y cols., 2010**).

#### **5.15. Medición de la velocidad del consumo de oxígeno celular mediante oxigrafía de Clark**

Para este tipo de ensayos se utilizaron placas de cultivo de 60 mm con una densidad celular de  $3 \times 10^6$  células/placa. Una vez finalizados los estímulos, se procedió a remover el medio y lavar las células tres veces con solución PBS. Posteriormente, las células se soltaron utilizando 1 mL de solución tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS, durante 5 min a 37°C, esta reacción luego se detuvo con FBS en una proporción 1:10. Una vez finalizada la tripsinización, las células se traspasaron a un tubo eppendorf y se centrifugaron por 5 min a 1600 rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de PBS, los cuales se traspasaron a una cámara (volumen final de 600  $\mu$ L) acoplada al sistema de electrodos. La velocidad del consumo de oxígeno se registró en un electrodo de Clark 5331 (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EEUU), acoplado a un sistema de registro digital, mediante la utilización del programa WinDaq Data Acquisition Software (Akron, OH, EEUU) a 25°C. Los datos se guardaron en formato .csv y se analizaron utilizando el programa Origin Pro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU). Una vez que se extrajeron las pendientes de las curvas obtenidas para cada condición, los resultados se expresaron como promedios de las mediciones normalizadas con respecto a las células control o sin tratamiento (**Araya-Maturana y cols., 2002; Araya-Maturana y cols., 2006**).

Adicionalmente, y como un control interno de todos los experimentos realizados, antes de que las células consumieran el 100% del oxígeno presente en la cámara, se evaluó la velocidad de respiración desacoplada (Uncoupled Respiration Ratio, UCR), la cual corresponde al inverso de la denominada tasa de control respiratorio y que nos da cuenta de la capacidad total de la cadena transportadora de electrones en relación a la respiración basal parcialmente acoplada. Para ello, una vez que las

células habían consumido aproximadamente el 75% del oxígeno de la cámara, se les agregó CCCP a una concentración final de 200 nM (**Brand y Nicholls, 2011**).

#### **5.16. Determinación de los niveles de glicógeno intracelulares**

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de  $1,0 \times 10^6$  células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con solución PBS fría y luego se homogenizaron con 80 mL de agua destilada. El homogenizado se centrifugó a 13.000 r.p.m durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo, el cual se almacenó a -80°C hasta su análisis. Este último, se llevó cabo mediante un ensayo colorimétrico utilizando el kit K646-100 de Biovision (Mountain View, CA, EEUU), realizando una curva estándar y siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### **5.17. Determinación del volumen mitocondrial**

Para la obtención de las imágenes de las mitocondrias de cardiomiocitos de rata neonata, las células se precargaron con la sonda Mitotracker Green-FM y posteriormente se visualizaron en un microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5 equipado con una cámara enfriada CCD y un sistema de adquisición de imágenes LSM. Para esto, los cardiomiocitos se trataron con los estímulos usuales de insulina, así como con los diferentes inhibidores que se detallarán más adelante por períodos de 0 a 24 h. Una vez finalizados los diferentes tratamientos, las células se lavaron tres veces con solución tampón Krebs con la finalidad de remover el suero y luego se incubaron por 25 min a 37°C con la sonda preparada en la misma solución, a partir de un stock al 20% en DMSO. Al finalizar este tiempo, los cardiomiocitos nuevamente se lavaron con solución Krebs y se utilizaron dentro de las siguientes 2 h. Los cubreobjetos conteniendo los cardiomiocitos cargados con Mitotracker Green se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500  $\mu$ L de solución y se visualizaron en el microscopio, tras su excitación con un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron como secuencias de profundidad en el eje Z cada 0,5  $\mu$ m, siendo cada secuencia de 10 imágenes. Se utilizó generalmente el lente objetivo de 60x el cual posee una apertura numérica de 1,2. En la mayoría de las secuencias las dimensiones de las imágenes fueron de 1024 x 1024 pixeles (**Parra y cols., 2008**).

### **5.18. Análisis digital de las imágenes**

Para las secuencias de imágenes obtenidas con la sonda Mitotracker Green-FM, la eliminación de la fluorescencia fuera de foco se realizó usando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (Point Spread Function) correspondiente a las condiciones experimentales. Una vez que las imágenes se deconvolucionaron, se contó el número de partículas teñidas con Mitotracker Green-FM, así como su volumen, todo lo cual se realizó utilizando el programa accesorio 3D Object Counter para Image J (**Parra y cols., 2008**).

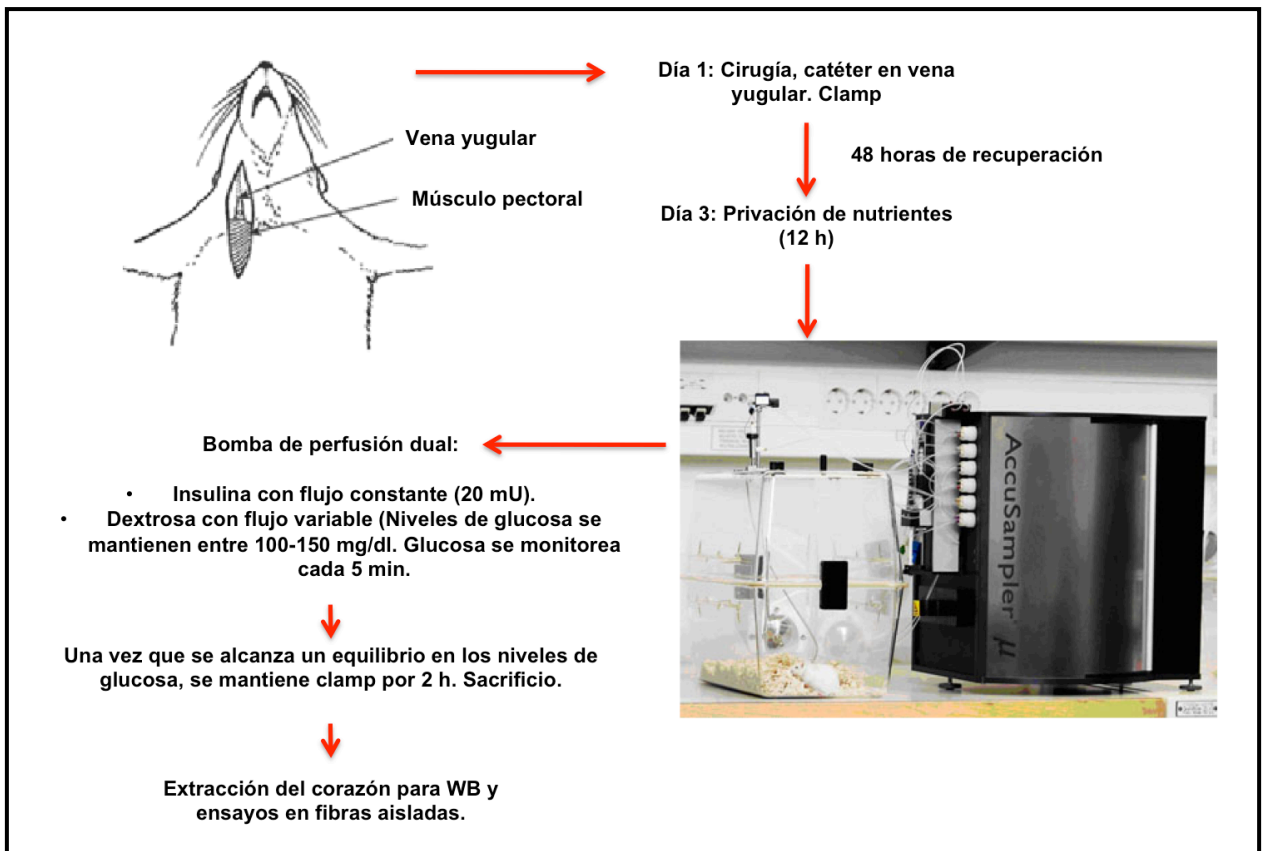
La cuantificación digital de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta se realizó analizando los coeficientes de Manders para cada una de las señales fluorescentes en estudio y asociadas a dos canales diferentes en el microscopio confocal, utilizando el programa accesorio Colocalization Finder para Image J. Previo a este análisis, también se utilizó la eliminación de la fluorescencia fuera de foco usando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (Point Spread Function) correspondiente para cada condición de lente objetivo y fluorescencia utilizada (**Manders y cols., 1993; Costes y cols., 2004; Parra y cols., 2008**).

### **5.19. Microscopía electrónica**

Los cardiomiocitos sembrados en placas de 35 mm a una densidad de  $1 \times 10^6$  células se expusieron a los estímulos de insulina 10 nM por 0 – 24 h. Terminado el estímulo, los cardiomiocitos se lavaron y fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 7,3. Posteriormente, las células se embebieron en una solución de agarosa al 2% y post-fijaron con tetróxido de osmio al 1%, utilizando tinción de uranilo y deshidratación en soluciones seriadas de etanol. Posteriormente, las muestras fueron impregnadas en una resina Epon 812 y cortadas (<3 mm) en un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Wetzlar, Alemania); para ser finalmente visualizadas en un Microscopio electrónico (FEI Tecnai G2 Spirit, Hillsboro, OR, EEUU) equipado con una fuente LaB6 a 120 kV. Estos experimentos se llevaron a cabo en la Electron Microscopy Facility, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA.

## 5.20. Modelo experimental animal

Para investigar si los efectos observados con insulina en la función mitocondrial en cardiomiocitos de rata, también podían ser observados en un modelo *in vivo*, se trataron ratones WT C57BL6 de 10 - 12 semanas de edad y 20 - 25 g de masa corporal, con un clamp euglicémico-hiperinsulinémico. Para este fin, los ratones se sometieron a una cirugía de canulación en la vena aorta, utilizando, un microcáteter de poliuretano especialmente diseñado para el sistema vascular del ratón, el cual reduce el riesgo de aparición de cuadros trombóticos intravasculares (Micro-Renathane® tubing systems, Braintree Scientific Inc., MA, EEUU) y Avertina® (12,5 mg Tribromoetanol/mL, Sanofi – Winthrop, Francia) como anestésico general (200 mg/Kg). Después de un período de recuperación de 48 h, los ratones se sometieron a un ayuno de 12 h, para luego ser perfundidos con una solución de insulina 20 mU (estimulación máxima), a través de un catéter y utilizando una bomba dual, a flujo constante y solución de dextrosa 50% con velocidad de flujo variable, de tal manera de mantener los niveles de glucosa del animal en valores constantes (100 – 150 mg/dL). Para monitorear los niveles de glucosa circulantes, se recolectó sangre de la vena de la cola cada 5 min, la cual se analizó por medio de un glucómetro (Glucometer Elite, Bayer Corp., Tarrytown, NY, EEUU). Un clamp se definió como exitoso, cuando los niveles de glucosa se mantuvieron constantes durante, al menos, 5 mediciones, a partir de las cuales se tomó un tiempo de 2 h totales, período en que se continuaron realizando las mediciones de glucosa cada 5 min (**Huang y cols., 2007**). Para este modelo, se utilizaron como controles, los denominados ratones salinos en los cuales la solución de insulina se reemplazó por suero fisiológico (Solución NaCl 0,9%) (**Figura 4**).



#### Figura 4. Modelo experimental animal: clamp euglicémico - hiperinsulinémico

En el esquema se puede observar el lugar de la localización del catéter en la vena yugular, así como la lógica de funcionamiento de la bomba de perfusión dual.

Una vez finalizadas las 2 h del clamp; el ratón se anestesió, sacrificó y se le extrajo el corazón. Los ventrículos así obtenidos, se dividieron para mediciones metabólicas en fibras cardíacas aisladas y permeabilizadas con saponina y para mediciones de los niveles proteicos en extractos totales, utilizando la técnica de Western blot.

#### 5.21. Preparación de extractos proteicos totales a partir de tejido cardíaco

Se prepararon extractos de proteínas de tejido cardíaco para:

- Evaluar cambios en la masa relativa de las proteínas involucradas en los procesos de fusión mitocondrial Mfn2 y Opa-1 en el corazón de los ratones sometidos a clamps euglicémicos-hiperinsulinémicos.
- Evaluar la actividad de de la proteína Akt en los corazones de los ratones sometidos a los clamps.



Una vez que se sacrificaron los ratones sometidos a los clamps, se les extrajo el corazón, separándose así el ventrículo izquierdo y el ápex. La primera mitad del ventrículo más ápex, se congelaron y almacenaron rápidamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ , mientras que la segunda mitad se procesó inmediatamente para la separación de fibras cardíacas aisladas. El tejido congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se mantuvo almacenado alrededor de una semana, al cabo de la cual se pesó y luego se descongeló lentamente a  $4^{\circ}\text{C}$ . El tejido se colocó en tubos Eppendorf de 1,5 mL, a los cuales se les agregó una bola de acero inoxidable de 3 - 7 mm de diámetro y tampón de lisis de acuerdo a la siguiente proporción: 1 mg tejido = 1.000  $\mu\text{L}$  de tampón. Posteriormente, los tubos Eppendorf previamente preparados, se homogenizaron durante 4 min a velocidad máxima y a  $4^{\circ}\text{C}$  utilizando el sistema automatizado TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Alemania). Luego, el homogenizado se centrifugó a 16.000 rpm durante 20 min a la misma temperatura. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se le determinó la concentración proteica por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay). Finalmente, la muestra se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los procesos de electroforesis, electrotransferencia y Western blot en estas muestras se desarrollaron de la misma forma que para los extractos proteicos a partir de muestras celulares.

## **5.22. Preparación de fibras musculares cardíacas aisladas**

Se prepararon fibras musculares aisladas para:

- Evaluar cambios en los diferentes estados mitocondriales de las fibras musculares cardíacas tras el tratamiento de ratones WT con los clamps euglicémicos-hiperinsulinémicos.
- Evaluar los niveles de ATP y la razón ATP/O en fibras musculares cardíacas de ratones controles salinos y los del grupo clamp.

Una vez finalizados los clamps euglicémicos-hiperinsulinémicos, los corazones se aislaron y se les removieron los diferentes vasos, así como el ventrículo derecho. Por otro lado, el ventrículo izquierdo limpio se colocó en una placa de Petri a  $4^{\circ}\text{C}$  y, con aproximadamente 15 mL de tampón A de separación (ATP 5,3 mM; PCr 15 mM; K-Mes 53,3 mM; taurina 20 mM;  $\text{CaK}_2\text{EGTA}$  2,77 mM;  $\text{K}_2\text{EGTA}$  7,23 mM;  $\text{MgCl}_2$  6,56 mM; imidazol 20 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM; DTT 0,5 mM; pH 7,1). Con la ayuda de un juego de pinzas, se sostuvo el corazón con la zona desde donde se

removió el ventrículo derecho mirando hacia arriba. En esta posición, el corazón se cortó transversalmente en dos trozos de similar tamaño. En los casos donde el septum era visible, éste se removió. Con las mismas pinzas se tomó uno de los trozos y se sostuvo contra el fondo de la placa de Petri tratando de mantenerlo lo más estirado posible, pero sin romper el tejido y manteniendo las pinzas abiertas. Con un segundo par de pinzas cerradas, se introdujo el extremo de ellas por el medio del tejido a través de las puntas de las primeras, tratando de mantener el tejido superior e inferior intactos, pero lo más delgado posible. Una vez que se creó un espacio a través de todo el corazón, el segundo par de pinzas se abrió un poco y se introdujo una de las caras de una pequeña tijera, la cual se usó para cortar el tejido en dos mitades muy delgadas, las cuales se mantuvieron unidas por uno de sus extremos. Este mismo procedimiento se repitió con la otra mitad del tejido.

Para la separación de las fibras, se procedió a trabajar utilizando dos agujas de tuberculina a las cuales se les dobló levemente la punta. Con las agujas se inició la separación de las fibras musculares, separándolas lentamente en sentido perpendicular a la formación observable en el tejido. Se continuó con la separación hasta que el tejido mostró un patrón de tela de araña o acordeón y, hasta que fue posible la observación de fibras individuales (Kuznetov y cols., 2008) (Figura 5).



#### Figura 5. Preparación de fibras aisladas

En el esquema se muestra cómo se debe observar el tejido una vez que se han terminado de separar las fibras musculares cardíacas. En el panel (C) es posible ver el patrón de tela de araña o de acordeón, descrito en la sección 5.22 (Kuznetov y cols., 2008).

Una vez que las fibras estuvieron completamente separadas, se colocaron en un vial de centelleo con 3 mL de tampón A, 50  $\mu\text{g/mL}$  de saponina y agitación suave y en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, las fibras se traspasaron a un segundo vial de centelleo, ahora con 3 mL del tampón de lavado B (K-Mes 100 mM; Taurina 20 mM; BSA 2 mg/mL;  $\text{CaK}_2\text{EGTA}$  2,77 mM;  $\text{K}_2\text{EGTA}$  7,23 mM;  $\text{MgCl}_2$  1,38

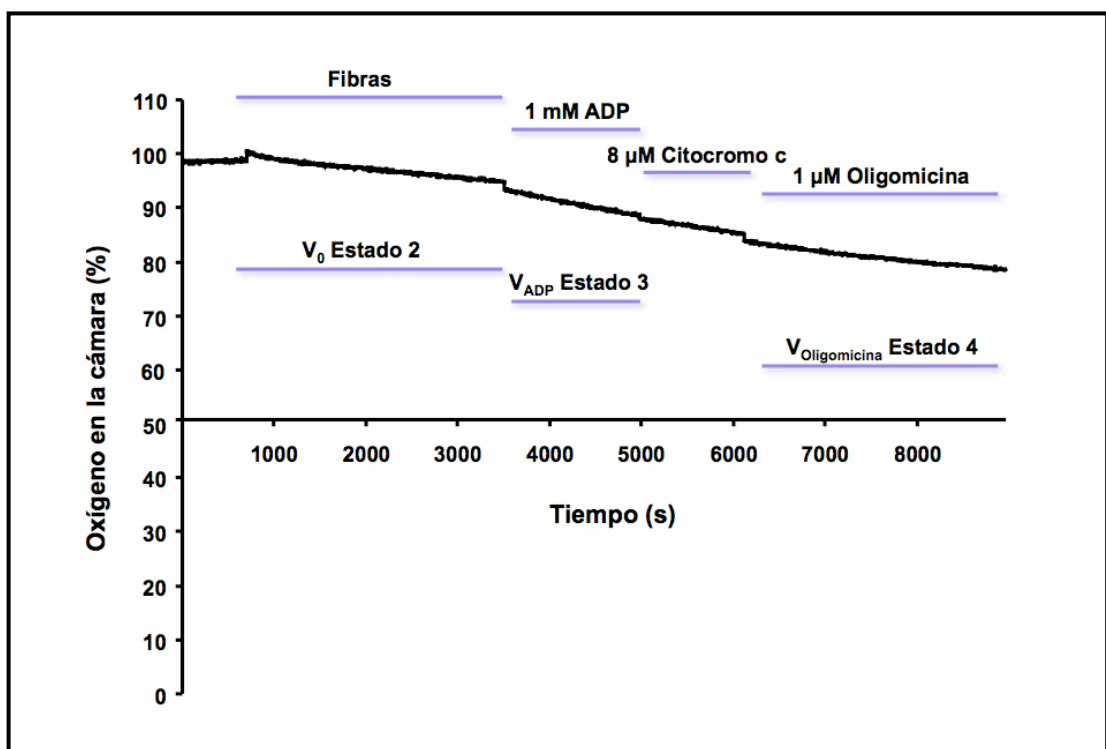
mM; Imidazol 20 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM; DTT 0,5 mM; pH 7,1) y los sustratos palmitoil -carnitina 20  $\mu\text{M}$  y malato 20 mM, estos dos últimos dependientes del experimento que se requiera realizar. De esta manera, si se quieren observar cambios en la velocidad de respiración dependiente del ciclo de Krebs y del flujo de transporte de electrones, se recomienda usar glutamato como sustrato; para el flujo dependiente de carbohidratos, la elección de sustrato correcta es piruvato; mientras que palmitoil- carnitina y malato, son recomendables para el estudio de una tasa respiratoria dependiente del intercambio de carnitina y de la  $\beta$ -oxidación. Las fibras se dejaron en la solución tampón B con agitación y en hielo durante 10 min. Este lavado se repitió una vez más en un tercer vial de centello bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Pasados estos últimos 10 min, se detuvo la agitación y las fibras se consideraron listas para la realización de los estudios metabólicos de respiración y niveles de ATP (**Boudina y cols., 2005; O'Neill y cols., 2007**).

### **5.23. Ensayos de respiración y ATP en fibras aisladas**

Los ensayos de respiración en fibras aisladas se llevaron a cabo utilizando un sensor de oxígeno FOXY-R (Ocean Optics, Inc., Florida, EEUU) o bien un electrodo de Clark, tal como se describió en los ensayos de respiración para células. Las fibras se colocaron en una cámara conectada al sistema de medición, la cual contenía 1 mL de tampón KCl ( $\text{KCl}$  125 mM; HEPES 20 mM; Mg-Acetato 3 mM; EGTA 0,4 mM; BSA 2 mg/mL;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM; DTT 0,3 mM; pH 7,1) más los sustratos palmitoil-carnitina 20  $\mu\text{M}$  y malato 20 mM a 25°C, con agitación constante. Una vez agregadas las fibras, se midió su respiración durante 3 min. Pasado este tiempo, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de ADP (1 mM) y se midió por aproximadamente 2 min adicionales. Posteriormente, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de citocromo C (8  $\mu\text{M}$ ) y se midió por 1,5 min; para finalmente, agregar 5  $\mu\text{L}$  de oligomicina ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y medir por 4 min más. Una vez terminada la medición, las fibras se dejan secar toda la noche y son pesadas al día siguiente.

La solubilidad del oxígeno en el tampón utilizado es de 215 nmol de  $\text{O}_2/\text{mL}$  a 25°C. Bajo estas condiciones el consumo de oxígeno se expresó como nmol de  $\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de fibra}^{-1}$  (peso seco o dw) y los parámetros respiratorios se definieron de la manera siguiente: la respiración basal antes de la adición de ADP

( $V_0$ ) se definió como estado 2. La velocidad de respiración máxima estimulada por ADP ( $V_{ADP}$ ), como estado 3, y la velocidad medida en ausencia de ADP y en presencia de oligomicina ( $V_{oligomicina}$ ) se denominó estado 4 (**Figura 6**). Esta nomenclatura ya ha sido previamente utilizada en otros estudios (**Cadenas y cols., 2002; Dumas y cols., 2004**), pero difiere de aquellos en donde el estado 4 es medido en ausencia de ADP o después de un período en donde se piensa que el ADP ya ha sido completamente depletado (**Boudina y cols., 2005; O'Neill y cols., 2007**).



**Figura 6. Esquema de un ensayo de respiración en fibras aisladas**

En el esquema se muestra un ejemplo de ensayo de respiración en fibras provenientes de ratones WT salinos. Se observa claramente el cambio de pendiente inducido al añadir diferentes sustratos y que dan origen a los denominados estados mitocondriales.

Por otro lado, para la medición de los niveles de ATP, se prepararon previamente 6 tubos Eppendorf con 1.990  $\mu$ L de DMSO, los cuales se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se colocó un trozo de fibra de aproximadamente 1 mg en una cámara con 1 mL de tampón B a  $25^{\circ}\text{C}$  y agitación, se les agregó 5  $\mu$ L de ADP 1 mM y al mismo tiempo se inició una cuenta temporal. Se tomó una muestra de 10  $\mu$ L de solución tampón cada 10 s, los cuales se fueron agregando a los tubos con DMSO preenfriados a

-20°C. Las muestras se guardaron a -80°C. La medición final, se realizó utilizando el reactivo ATP Monitoring Reagent (AMR, Promega Corporation, Madison, WI, EEUU), realizando una curva estándar y siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### **5.24. Análisis estadístico**

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

Para responder el primer objetivo planteado en esta tesis, es decir, evaluar los cambios morfológicos mitocondriales asociados a los procesos de fisión y/o fusión mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina, se procedió a caracterizar la maquinaria de la fusión mitocondrial en el modelo y su respuesta frente a la hormona insulina.

### 6.1. Efecto de insulina en la morfología mitocondrial

Insulina es un regulador clave del metabolismo intermediario del corazón, modulando el transporte de glucosa, la glicólisis, la síntesis del glicógeno, así como el crecimiento, la contractibilidad y apoptosis de los cardiomiocito (**Brownsey y cols., 1997; Abel 2005**). La  $\beta$ -oxidación de AGLs les proporciona aproximadamente el 70% de la energía necesaria para su funcionamiento, mientras que la glucosa y el lactato dan cuenta del 30% restante de la producción total; sin embargo, esta proporción se invierte en cardiomiocitos neonatos o en cardiomiocitos adultos expuestos a diversas condiciones de estrés (**Kodde y cols, 2007**). En el corazón, la insulina a través de la vía PI3-K/Akt aumenta el metabolismo mitocondrial e incrementa los niveles intracelulares de ATP. Estudios recientes señalan que la maquinaria de la fusión mitocondrial es altamente dependiente de los niveles energéticos celulares, siendo promovida bajo condiciones de alta energía. Sin embargo, el mecanismo responsable de regular este proceso se desconoce. Paralelamente, múltiples evidencias sugieren que la fusión mitocondrial controla directamente el metabolismo mitocondrial, de esta forma, una disminución de los niveles de la proteína Opa-1 o de cualquiera de las dos Mfns por medio de RNAi lleva a la formación de mitocondrias fragmentadas con menor consumo de oxígeno y menor potencial electroquímico (**Chen y cols., 2005**).

En este primer objetivo, se evaluaron los cambios morfológicos asociados a la fusión y fisión mitocondrial que podrían ser inducidos por insulina. Para ello, se evaluó el número de células con mitocondrias fusionadas/fisionadas, el volumen mitocondrial promedio y el número de partículas mitocondriales por célula.

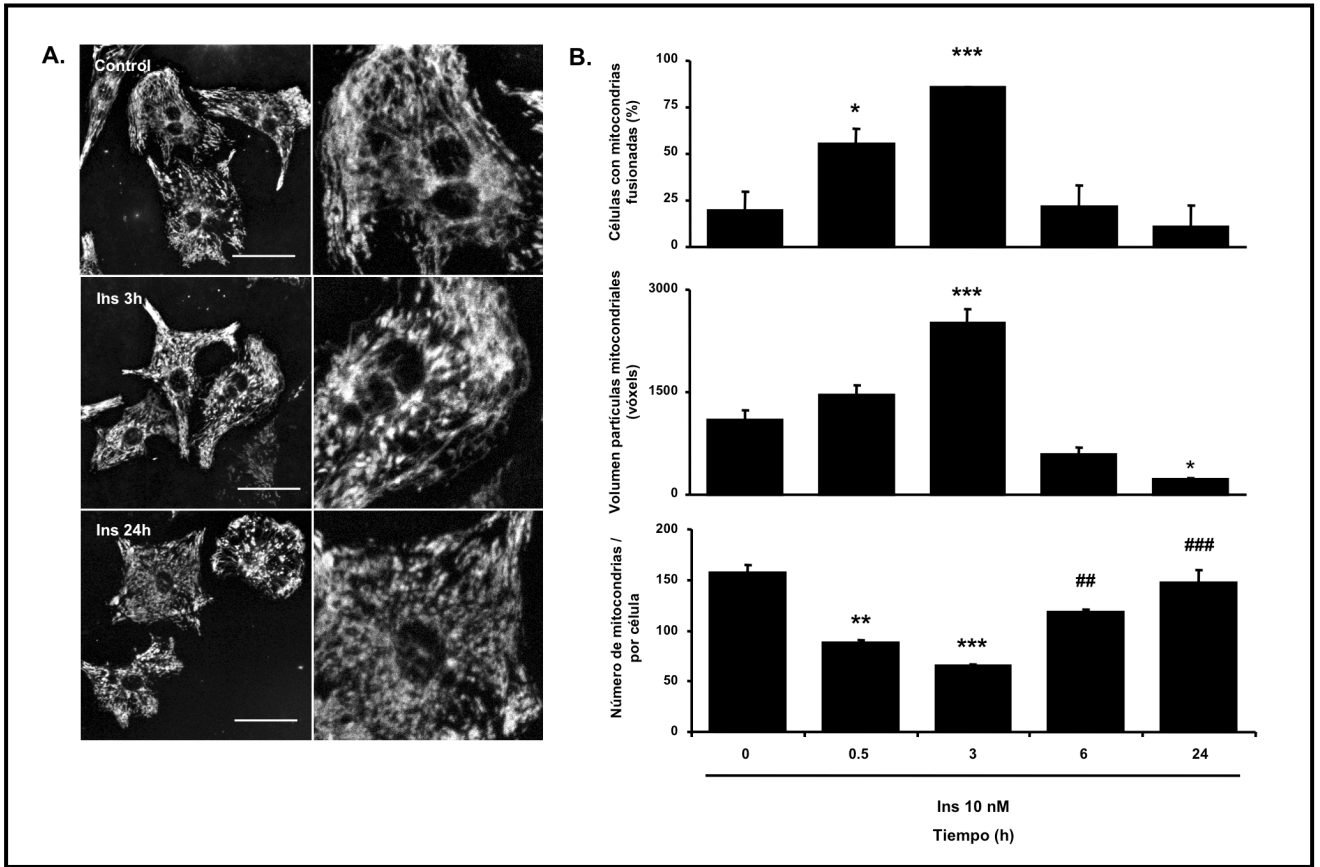
Inicialmente, las células se incubaron con insulina (0 - 10 nM) por diferentes tiempos (0 - 24 h) y se observó la red mitocondrial utilizando la sonda Mitotracker Green-FM y un microscopio confocal Carl Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert 200. En la **Figura 7** se observa que insulina 10 nM induce la aparición de células con mitocondrias fusionadas a partir de la media hora de tratamiento, mientras que induce un aumento significativo del volumen mitocondrial promedio (+156%;  $p < 0,001$ ) y una disminución en el número de mitocondrias por célula (-60%;  $p < 0,001$ ); siendo estos efectos revertidos a las 6 y 24 h. Adicionalmente, a la media y 3 h de tratamiento, se observa que esta aparición de mitocondrias de gran tamaño, se produce preferentemente en la zona perinuclear de la célula, lo cual se hace evidente al realizar un análisis radial de la fluorescencia (**Figura 8**). Este tipo de análisis muestra que a las 3 h de incubación con insulina se produce un aumento de la fluorescencia asociada a las mitocondrias en la zona perinuclear, patrón que es significativamente diferente a la condición control y que también se revierte después de las 24 h.

Una vez caracterizado el efecto de insulina sobre la morfología mitocondrial, se estudió por medio de un experimento de pulso y posterior remoción del medio extracelular con el estímulo de insulina 10 nM, cuál era el tiempo mínimo de estimulación necesario para obtener los cambios a nivel del volumen mitocondrial y del número de mitocondrias, observados a las 3 h de tratamiento. Como se observa en el panel superior de la **Figura 9**, un efecto similar sólo se observa tras un estímulo inicial de insulina durante un periodo de 0,5 h, a pesar de que el efecto ya comienza a ser significativo a los 15 min de estímulo. Un experimento similar al anterior, puede observarse en el panel inferior de la figura, en donde se realizó un estímulo inicial de 30 min con insulina 10 nM y después se estudió su efecto a las 3, 6 y 24 h post estímulo. El objetivo de este experimento fue observar si la caída del volumen y aumento del número de mitocondrias descrito en la **Figura 7** para las 6 y 24 h, se mantenía a pesar de la remoción del estímulo continuo con la hormona, pero tal como puede desprenderse de la **Figura 8** (panel inferior), este efecto de caída en el volumen y el aumento del número de partículas mitocondriales en estas condiciones experimentales, no fue observado. Este hallazgo resulta interesante a la luz del proceso de resistencia a la insulina causado por la continua estimulación con la misma hormona, ya que la fisión observada durante el estímulo continuo,

como en el caso de la **Figura 7** a los tiempos mayores, podría ser un nuevo proceso implicado en la causalidad y desarrollo de los cambios metabólicos observados durante la resistencia a la hormona.

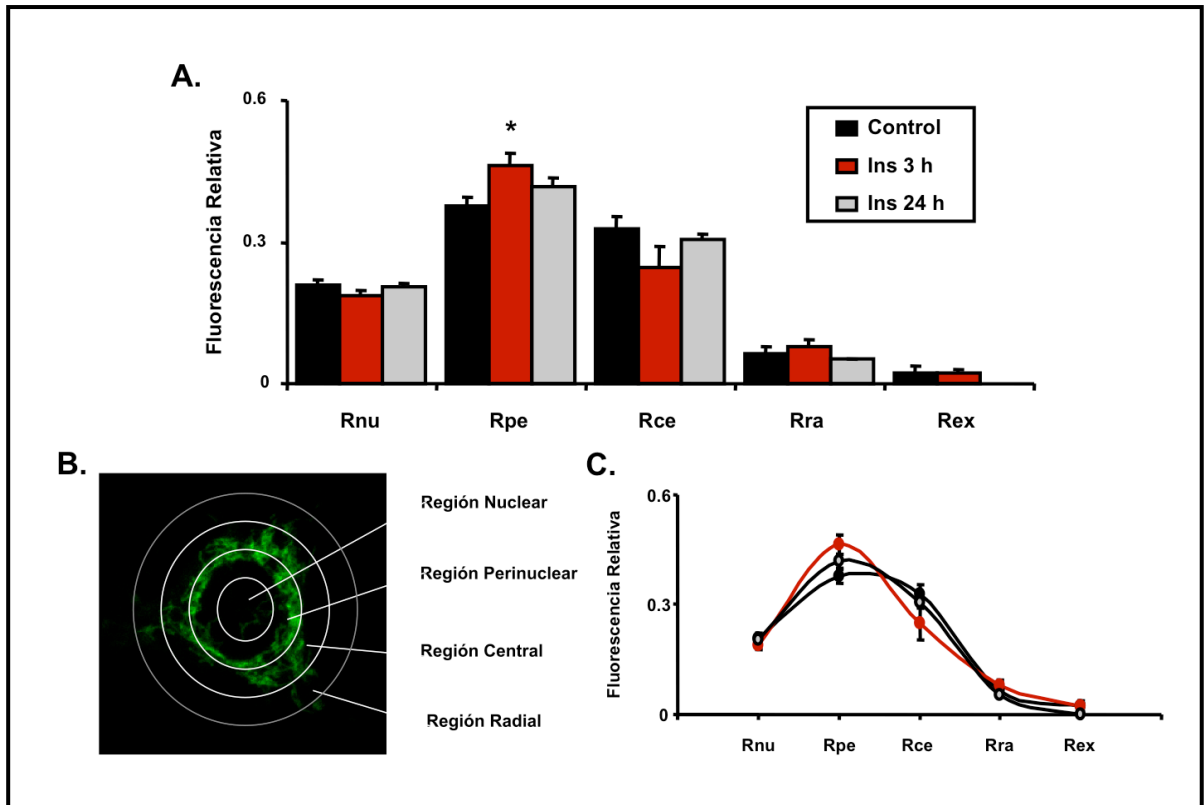
Un segundo criterio utilizado para definir la fusión mitocondrial en los cardiomiocitos neonatos estimulados con insulina 10 nM, fue la microscopía electrónica. Mediante esta técnica y como se observa en la **Figura 10**, detectamos la aparición de mitocondrias de gran tamaño (flechas rojas) en comparación a las células control. Adicionalmente, estas mitocondrias parecen estar altamente condensadas y presentar una alta organización a nivel de la estructuración de las crestas, lo cual hizo evidente y necesario el estudio de la funcionalidad del organelo. Sin embargo, antes de abordar este punto fundamental, se procedió primero a evaluar los cambios en las proteínas de la maquinaria de la fusión asociados a los cambios morfológicos observados en nuestro modelo.





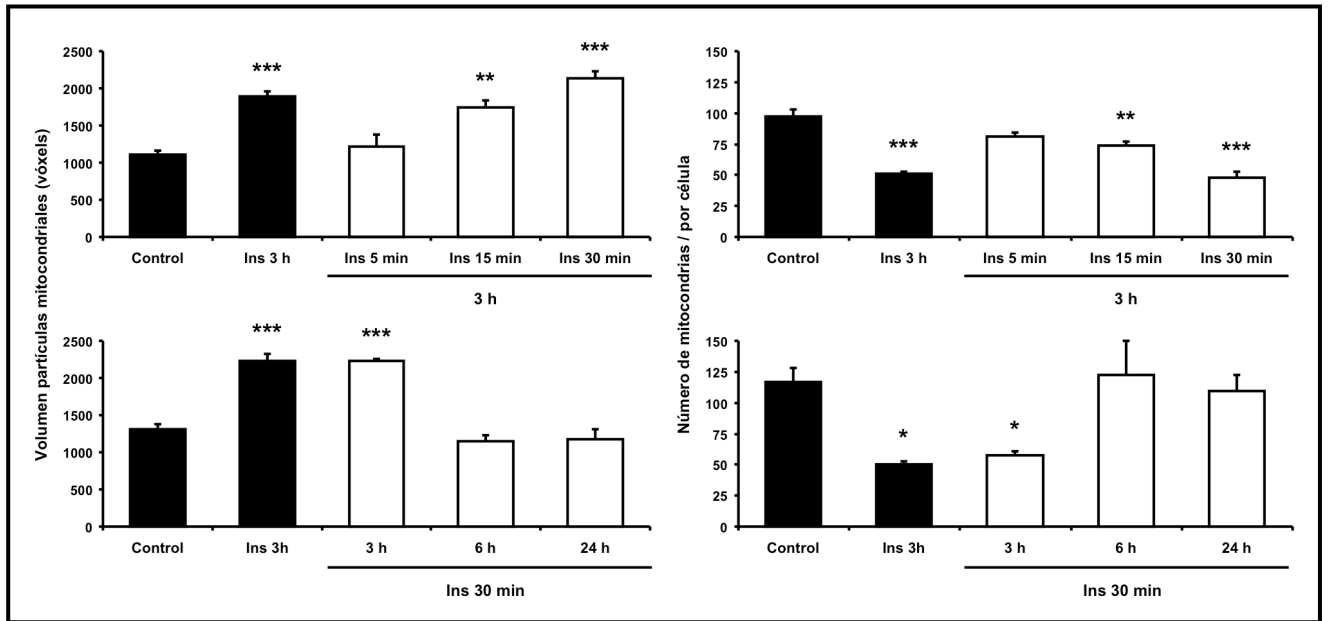
**Figura 7. Efecto de insulina sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito**

(A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM por los tiempos indicados. Las imágenes confocales se obtuvieron de células marcadas con Mitotracker Green. Escala: 20  $\mu$ m. (B) Cuantificación del porcentaje de células con mitocondrias fusionadas, del volumen mitocondrial promedio y del número de mitocondrias por célula (n=4 experimentos independientes), \*p<0,05; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 respecto al control; ##p<0,01 y ###p<0,001 respecto a las 3 h.



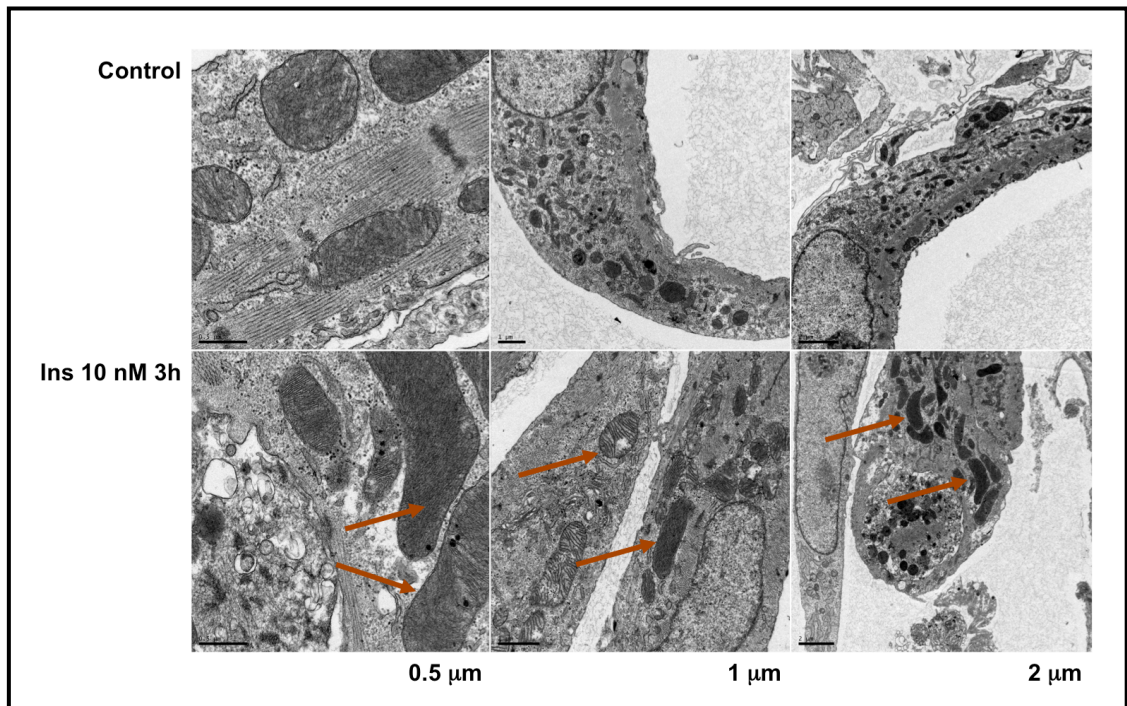
**Figura 8. Efecto de insulina sobre la distribución radial de la red mitocondrial del cardiomiocito**

(A) Distribución de la fluorescencia relativa de la red mitocondrial de cardiomiocitos de rata neonata tratados con insulina (Ins) 10 nM por los tiempos indicados. (B) Perfiles radiales celulares de interés. (C) Perfiles radiales de distribución de la red mitocondrial (n=4 experimentos independientes), \*p<0,05 respecto al control en la región perinuclear (Metodología previamente descrita en Bravo y cols., 2011).



**Figura 9. Efecto de la estimulación con pulsos de insulina sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito**

Cuantificación del volumen mitocondrial y del número de partículas mitocondriales por célula de cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con estímulos consistentes en pulsos de insulina (Ins) 10 nM durante los tiempos indicados. Al término del período de estímulo, se removió la insulina del medio extracelular y las células se observaron y analizaron por microscopía confocal a las 3, 6 y 24 h post-estímulo. La cuantificación se realizó a partir de imágenes confocales obtenidas de células marcadas con Mitotracker Green (n=4 experimentos independientes), \*p<0,05; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 respecto al control.



**Figura 10. Características morfológicas ultraestructurales de las mitocondrias de cardiomiocitos estimulados con insulina**

Para las imágenes de microscopía electrónica, los cardiomiocitos de rata neonata, previamente estimulados con o sin insulina (Ins), se fijaron en glutaraldehído al 2,5%, post-fijaron en 1% de OsO<sub>4</sub> y embebieron en una resina Epon. Cortes ultradelgados de estas muestras fueron posteriormente obtenidos mediante el uso de un ultramicrotomo, los cuales finalmente se tiñeron con acetato de uranilo al 2%. El tamaño de las barras de cada una de las series de imágenes se indica en el extremo inferior izquierdo. Imágenes representativas, n=3. *En colaboración con Myriam Iglewsky, Cardiology Division, Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA.*

## **6.2. Efecto de insulina en la distribución subcelular de las proteínas de la fusión y fisión mitocondrial**

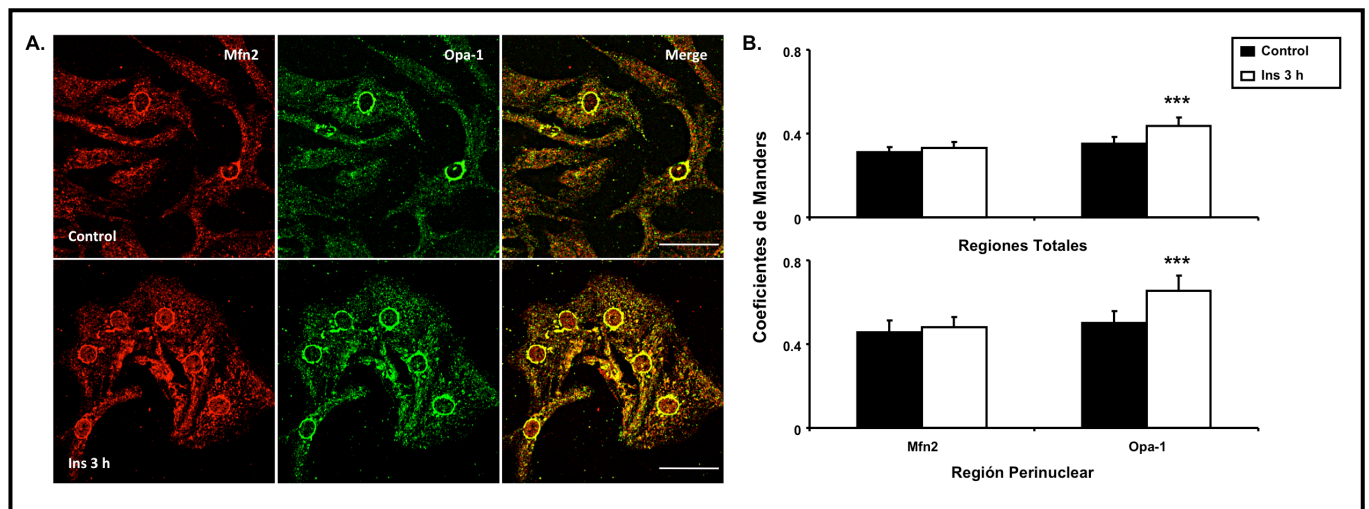
Un criterio adicional a los ya utilizados para definir los procesos de fisión y fusión mitocondrial, es el estudio de los cambios en el estado de equilibrio de los efectores proteicos involucrados en ambos procesos. Así un aumento de la fisión se asocia con un aumento de la colocalización efectiva de Drp-1 con Fis-1 o de la translocación de Drp-1 desde el citosol a las mitocondrias. En el caso de las proteínas de la fusión, se puede utilizar el aumento relativo de la expresión proteica ya sea de Mfn1/2 y Opa-1 en fracciones totales, así como el análisis por inmunofluorescencia indirecta y de la colocalización de estas mismas proteínas (Parra y cols., 2008).

Dado que mediante el análisis y reconstrucción 3D de imágenes obtenidas por microscopía confocal y la sonda Mitotracker Green se observaron procesos de fusión mitocondrial asociados al tratamiento con insulina, se estudió también si los procesos de fusión se veían acompañados de aumentos en la colocalización de las dos principales proteínas efectoras de estos procesos, Mfn2 y Opa-1. Los estudios de colocalización mostraron que mientras no hubo un aumento significativo en el coeficiente de Pearson (**datos no mostrados**), se observó un aumento en el coeficiente de Manders para la proteína Opa-1 a las 3 h de tratamiento con insulina (**Figura 11**). La ausencia de significancia para el coeficiente de Pearson puede explicarse debido a la alta dependencia que posee este coeficiente de la cantidad de elementos presentes en un canal y otro, problema que se soluciona al aplicar los coeficientes de Manders para cada una de las proteínas en forma separada. Los resultados encontrados al realizar este tipo de análisis indican, que es Opa-1 la que colocaliza principalmente con la proteína Mfn2, y no al revés. Adicionalmente, al realizar un análisis radial de los coeficientes de Manders, y coincidentemente con el hecho de que el organelo mitocondrial se posicione preferentemente en la zona perinuclear de la célula frente al tratamiento con insulina 10 nM (3 h), se observó un incremento significativo en el coeficiente de Manders para la proteína Opa-1 en esta misma zona. Este hallazgo podría estar relacionado con una mayor tasa de eventos de fusión asociados principalmente a las mitocondrias perinucleares de la célula y a la presencia de poblaciones diferenciales de mitocondrias, las cuales podrían presentar diferentes estados de actividad metabólica.

Para corroborar los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia indirecta, se procedió a realizar análisis de Western blot, para estudiar aumentos relativos de las proteínas Opa-1 y Mfn2. La **Figura 12** muestra que insulina aumentó la masa de la proteína Opa-1 en cultivos primarios de cardiomiocitos ( $+3,7 \pm 1,5$ ;  $p < 0,05$ ), lo cual refuerza lo observado inicialmente mediante inmunofluorescencia indirecta. Sin embargo, a pesar de que Opa-1 es una proteína para la cual ya han sido descritas alrededor de 8 isoformas diferentes (**Delettre y cols., 2001**), en nuestras condiciones experimentales y con el anticuerpo monoclonal utilizado, sólo observamos la aparición de dos bandas, que de acuerdo al proveedor de este anticuerpo, corresponden a péptidos representativos de las isoformas de alta y baja masa molecular, para la primera y segunda banda, respectivamente. Como el

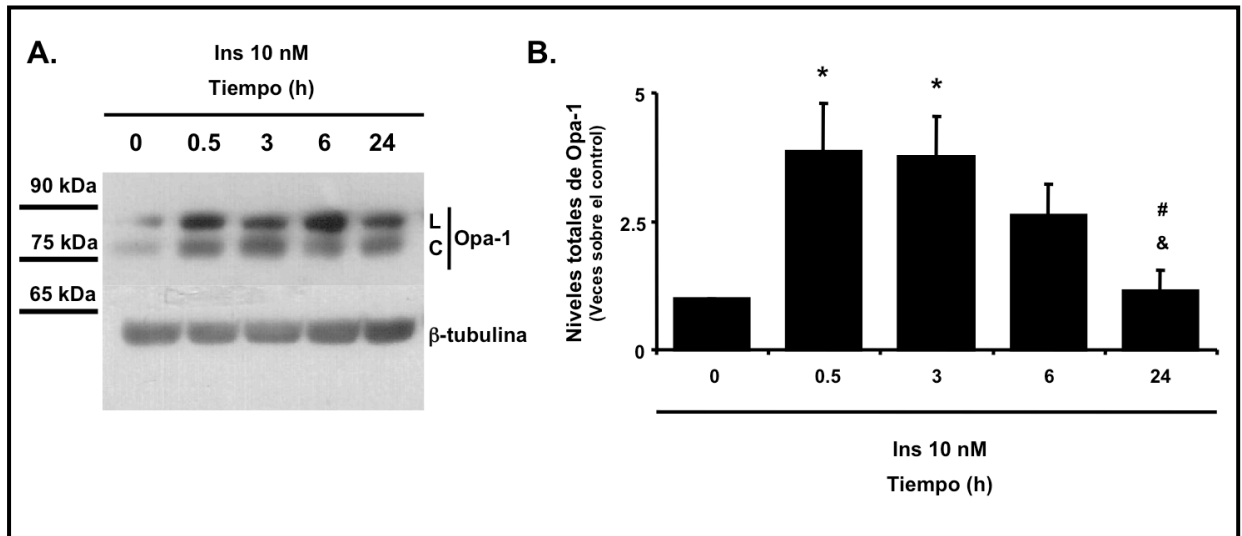
tratamiento con insulina 10 nM induce la aparición de ambas bandas, supusimos que en nuestro sistema se estaba induciendo un incremento total de los niveles de Opa-1, lo que lleva finalmente al aumento de todas las isoformas de la proteína. Estos resultados, concuerdan con los mecanismos propuestos en la literatura para los procesos de fusión, para los cuales se ha establecido, que requieren de la presencia de las isoformas de alta y baja masa, casi en cantidades equimolares (**Song y cols, 2007**). De esta forma, y con la finalidad de corroborar el hallazgo del aumento en los niveles de Opa-1 tras la estimulación con insulina, se realizó un segundo experimento en donde se comparó el efecto de este mismo tratamiento en células control, tratadas con la hormona y con el desacoplante mitocondrial CCCP 200 nM, el cual es un conocido inductor de la proteólisis de las bandas de alta masa molecular de Opa-1 (**Ehses y cols., 2009; Head y cols., 2009**). Para este experimento en particular, se utilizó un segundo anticuerpo contra la proteína, el cual es de reciente aparición comercial, policlonal y que detecta la mayoría de las bandas correspondientes a las diferentes isoformas. Sin embargo, esta misma ventaja de detectar todas las bandas, hace que el proceso del análisis se vuelva bastante más complejo. Para resolver este problema se requiere realizar geles de alta concentración de acrilamida (12%), los cuales deben ser resueltos por 5 - 6 h, ya que sólo con estas condiciones se logra definir bien cada una de las isoformas de la proteína. Como se observa en la **Figura 13**, el tratamiento con insulina 10 nM durante 3 h, nuevamente aumentó los niveles de Opa-1 ( $+2,4 \pm 0,02$ ;  $p < 0,001$ ), lo cual es observado en todas las bandas de la proteína, las de alta y baja masa molecular. Al mismo tiempo, el tratamiento con CCCP 2 nM por 0,5 h, indujo una significativa disminución de los niveles totales de la proteína, efecto que se hace más evidente al observar la primera de las bandas de alta masa molecular, la cual adicionalmente, corresponde a la más definida (segunda banda, cuadro rojo). Corroborando así, el resultado previamente descrito en la **Figura 12**. Por lo tanto, y de manera consecuente, todos los experimentos siguientes en los que se presenten cambios en los niveles de Opa-1, se realizaron utilizando el primer anticuerpo monoclonal anti Opa-1, excepto en los casos en donde se indique explícitamente lo contrario. Cabe destacar, que al utilizar el anticuerpo policlonal, se observa la aparición de una primera banda, de alto peso molecular e inespecífica, que no corresponde a ninguna de las isoformas previamente descritas de Opa-1, ya que no responde al tratamiento con CCCP (**Figura 12**).

Paralelamente, bajo las mismas condiciones previamente descritas en las que se detectó un incremento en los niveles de Opa-1, no se observaron cambios en la masa total de la proteína Mfn2, ni en la proteína mtHsp70 (**Figura 14**). Esto último, nos permitió descartar la influencia de procesos de biogénesis y/o degradación mitocondrial en los procesos de fusión y fisión previamente descritos, ya que es considerada una proteína constitutiva de la mitocondria y parte estructural del complejo TOM20 (**Díaz y Moraes, 2008**), uno de los principales encargados del transporte de proteínas hacia el interior de la mitocondria (**Figura 14**). Con esta misma finalidad, también se llevaron a cabo mediciones del DNA mitocondrial (DNAmt) mediante qPCR y de la masa mitocondrial total, usando la sonda Mitotracker Green y citometría de flujo. La **Figura 15** muestra que con ninguna de estas dos estrategias experimentales observamos algún cambio significativo, lo que sugiere la ausencia de cualquier proceso que altere y/o modifique la cantidad total de mitocondrias en nuestras condiciones. Ambos resultados concuerdan con lo previamente observado al analizar los niveles de la proteína mtHsp70 (**Figura 14**).



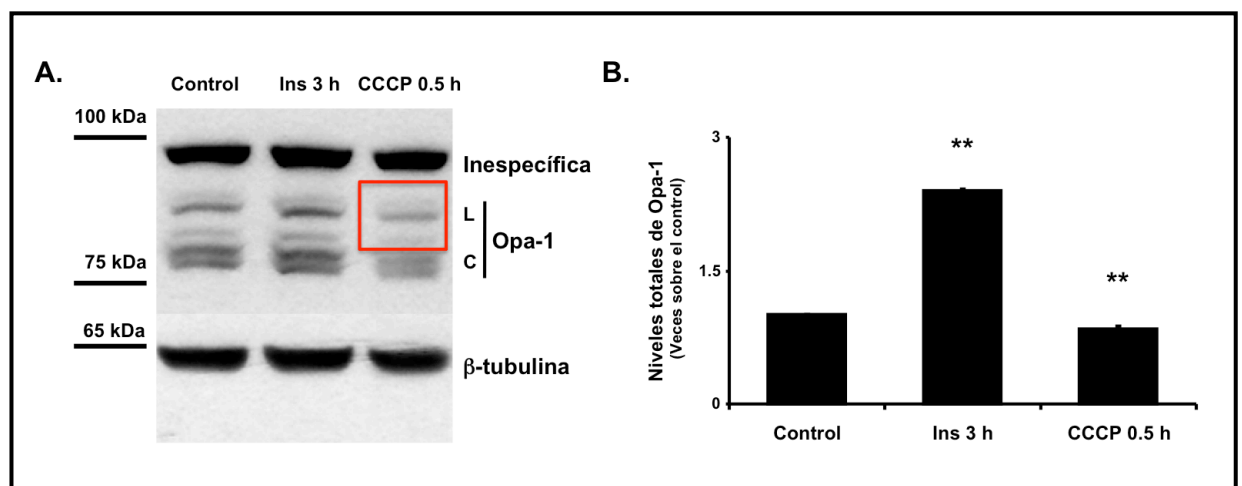
**Figura 11. Efecto de insulina sobre la distribución de las proteínas de la fusión mitocondrial Opa-1 y Mfn2 en el cardiomiocito.**

(A) Inmunofluorescencia indirecta para Opa-1 y Mfn2 en cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM por los tiempos indicados. Escala: 20 μm. (B) Cuantificación de los coeficientes de Manders totales y en el perfil perinuclear de distribución radial para Opa-1 y Mfn2, (n=4 experimentos independientes), \*\*\*p<0,001 respecto al control.



**Figura 12. Aumento de los niveles totales de Opa-1 inducido por el tratamiento con insulina en el cardiomiocito.**

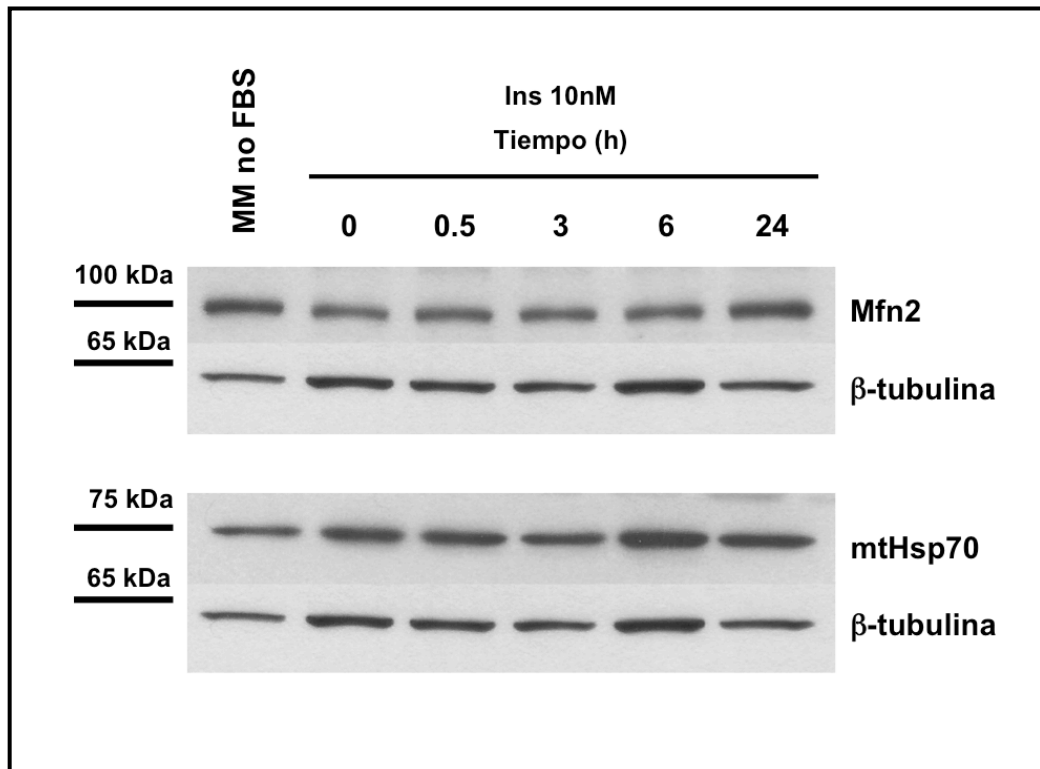
(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con insulina (Ins) 10 nM a los tiempos indicados y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Opa-1 y  $\beta$ -tubulina se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independientes), \*p<0,05 respecto al control; #p<0,05 y &p<0,05 respecto a insulina 0,5 y 3 h, respectivamente.



**Figura 13. Efecto del tratamiento con insulina y el desacoplante CCCP sobre las diferentes isoformas de la proteína Opa-1 en el cardiomiocito.**

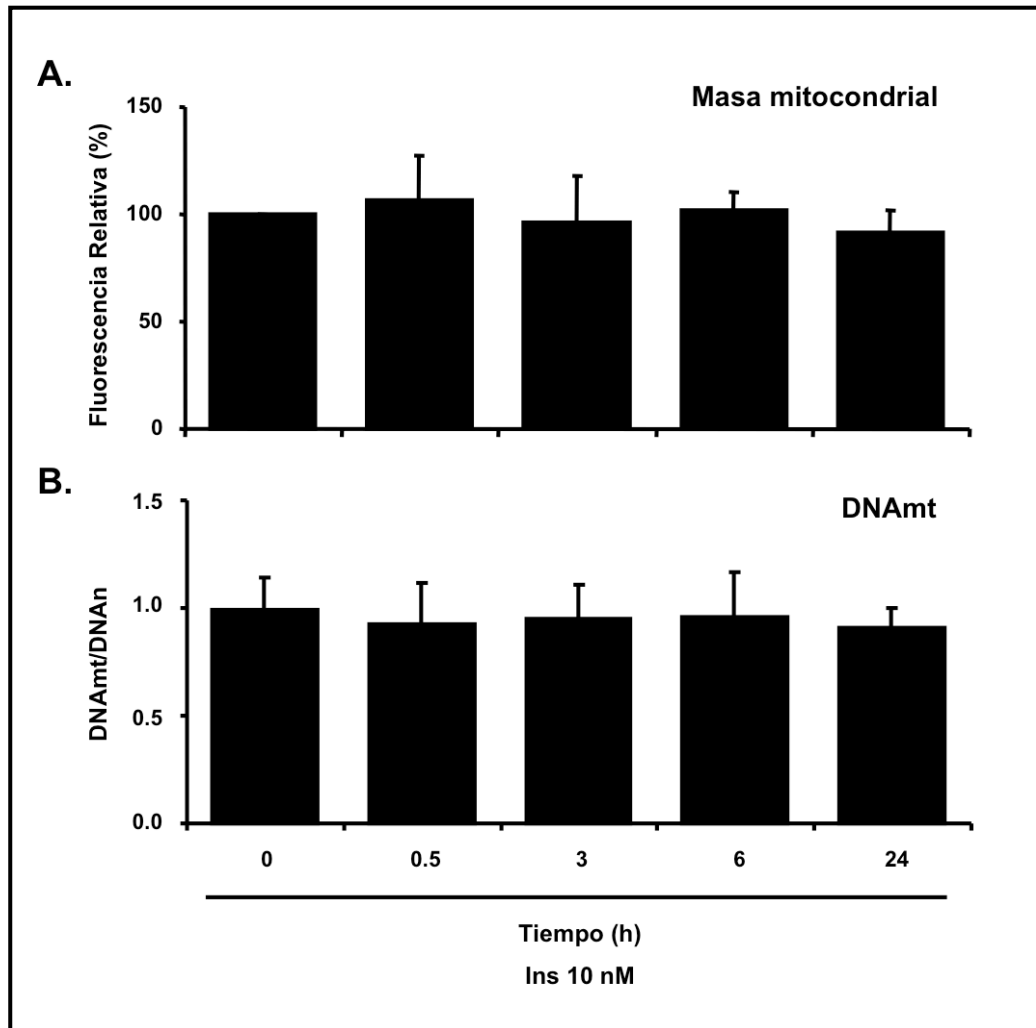
(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con insulina (Ins) 10 nM y CCCP 200 nM a los tiempos indicados y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Opa-1 y  $\beta$ -tubulina se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. Para la detección de la proteína Opa-1 se utilizó un anticuerpo policlonal especialmente manufacturado para la detección de todas las isoformas de la proteína. (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=4 experimentos independientes), \*\*p<0,01 respecto al control.





**Figura 14. Efecto de insulina sobre los niveles de las proteínas Mfn2 y mtHsp70 en extractos totales de cardiomiocitos de rata**

Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con insulina (Ins) 10 nM a los tiempos indicados y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Mfn2, mtHsp70 y  $\beta$ -tubulina en estos extractos se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12% (n=3 experimentos independientes).



**Figura 15. Efecto de insulina sobre la masa mitocondrial total y DNA mitocondrial en el cardiomiocito.** (A) La masa mitocondrial se determinó en una población de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins), utilizando la sonda no sensible al potencial Mitotracker Green y citometría de flujo. (B) Los niveles de DNA mitocondrial (DNAmf) se obtuvieron mediante ensayos de qPCR para el transcrito de la citocromo b mitocondrial relativizados con respecto a los niveles de transcrito de  $\beta$ -actina, como referencia de DNA nuclear (DNAn), n=5 experimentos independientes. *En colaboración con Myriam Iglewsky, Cardiology Division, Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA.*

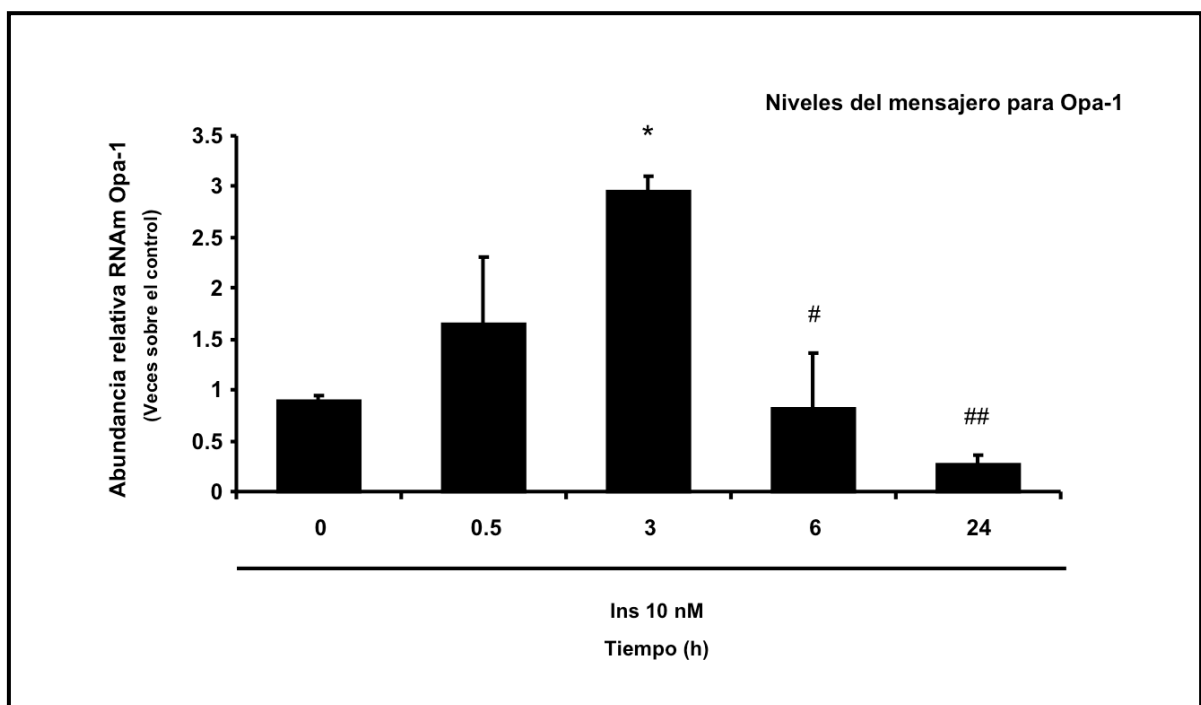
Dado que todos los procesos anteriormente observados son transitorios, también se estudió si el aumento en los eventos de fusión mitocondrial descritos, estaban asociados a una disminución en los procesos de fisión mitocondrial mediante la activación de los efectores de este proceso. Con este fin se realizaron experimentos para evaluar la translocación de la proteína Drp-1 hacia la mitocondria y su colocalización con la proteína Fis1 (**datos no mostrados**). Mediante esta estrategia, se encontró una disminución en el coeficiente total de Pearson a las 0,5

y 3 h de tratamiento con insulina y su aumento a las 24 h, así como una disminución en el coeficiente de Manders para Drp-1 a las 3 h. Sin embargo, es probable que este efecto sólo se deba a la lejanía física de ambas proteínas, inducida por el proceso de fusión mitocondrial, dado que datos preliminares (**no mostrados**) utilizando extractos de proteínas mitocondriales, no detectaron cambios en los niveles de la proteína Drp-1 en este extracto celular. Paralelamente, tampoco se observaron cambios en la respuesta metabólica inducida con insulina, al analizar los parámetros que se describen a continuación, al tratar las células con adenovirus codificantes para la proteína Drp-1 WT o con un dominante negativo de ésta (**datos no mostrados**). Finalmente, el tratamiento con rapamicina 100 nM, inhibidor de mTORc1 y probable mediador principal de los procesos descritos, tampoco induce cambios en la distribución subcelular de Drp-1 o Fis-1 (**Tesis Doctoral en curso Hugo Verdejo, comunicación personal**). En base a todos estos antecedentes, no se continuó con el estudio de la implicancia directa de la maquinaria de la fisión mitocondrial en la respuesta a insulina en cardiomiocitos de rata neonata.

Finalmente, y como una forma de estudiar si los cambios observados para los niveles de la proteína Opa-1 se deben a cambios a nivel de la transcripción en su mensajero, traducción del mismo o cambios a nivel de la regulación post-traduccional de la proteína; se llevaron a cabo dos estrategias experimentales adicionales. En primera instancia, se realizaron ensayos de qPCR para el mensajero de Opa-1, el cual incrementó significativamente sus niveles tras la estimulación con insulina (**Figura 16**). Adicionalmente, también se analizó el efecto del pre-tratamiento (30 min previos y durante el estímulo) con actinomicina D (inhibidor general de la transcripción) y cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica) sobre el proceso de la fusión mitocondrial inducido por insulina 10 nM y el de cicloheximida sobre el incremento en los niveles de la proteína Opa-1 inducidos por este mismo tratamiento.

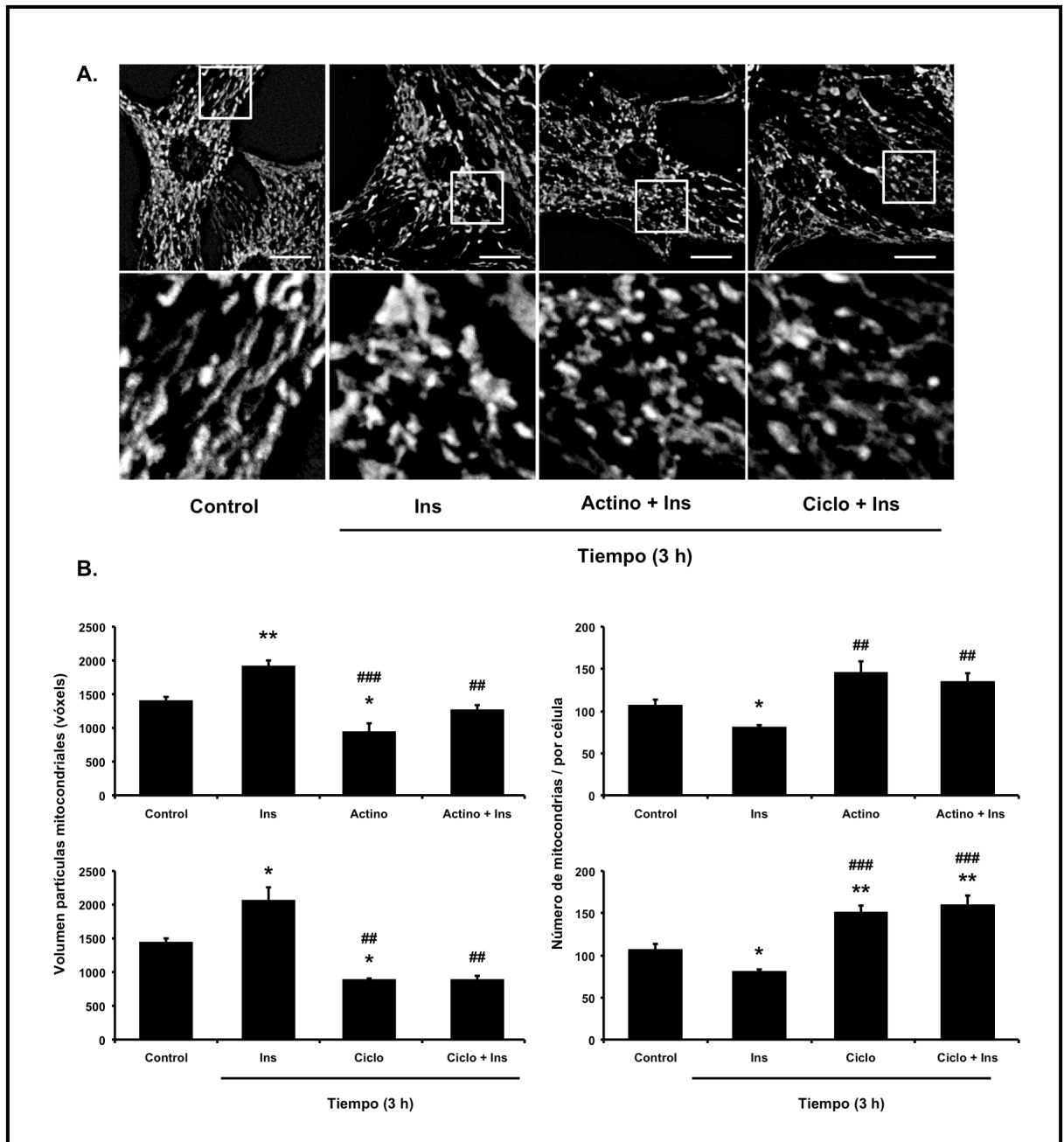
La **Figura 17** muestra que tanto actinomicina, como cicloheximida impidieron el aumento del volumen mitocondrial y disminución del número de mitocondrias inducido por insulina. Más aún, cicloheximida disminuyó el volumen mitocondrial y aumentó el número de mitocondrias por célula en forma significativa, en comparación con el control. Estos resultados indican que la inhibición de la síntesis de proteínas por cicloheximida causa fragmentación o fisión de la red mitocondrial,

la cual tampoco es rescatada por insulina. Por su parte, el tratamiento con cicloheximida (**Figura 18**), también impidió el incremento de los niveles totales de Opa-1 inducidos con el tratamiento, así como aparentemente, también disminuyó los niveles basales de la proteína. Sin embargo, este último efecto no alcanzó a tener significancia estadística bajo nuestras condiciones experimentales, sugiriendo que parte del efecto de insulina sobre la fusión mitocondrial a las 3 h de tratamiento requiere de la transcripción y síntesis de la proteína Opa-1, siendo la rapidez y mecanismo de este efecto una de las grandes preguntas a resolver.



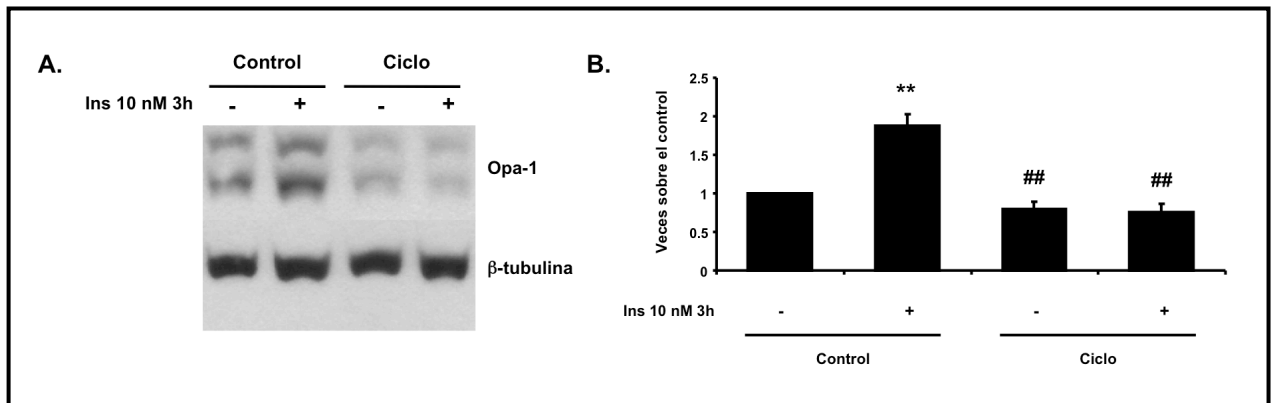
**Figura 16. Efecto de insulina sobre la abundancia relativa del mensajero para la proteína Opa-1**

Los cardiomiocitos se expusieron a insulina (Ins) 10 nM por los tiempos señalados. Las células se centrifugaron, lisaron y homogenizaron con Trizol para extraer el RNA. Este último, se cuantificó y luego se utilizó para la reacción de transcriptasa reversa. El DNAc obtenido, se amplificó con partidores para *opa-1* y  *$\beta$ -actina*. La gráfica muestra la abundancia relativa para el mensajero (ARNm) para Opa-1 con respecto a las condiciones control, previamente normalizadas (n=3 experimentos independientes), \*p<0,05 respecto al control; #p<0,05 y ##p<0,01 respecto a insulina 3 h. *En colaboración con Myriam Iglewsky, Cardiology Division, Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA.*



**Figura 17. Efecto del tratamiento con actinomicina D y cicloheximida sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en cardiomiocitos**

(A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM, actinomicina D (Actino) 2,5  $\mu$ g/mL y cicloheximida (Ciclo) 10  $\mu$ g/mL por los tiempos indicados. Escala: 10  $\mu$ m. Las imágenes confocales se obtuvieron de células marcadas con Mitotracker Green. (B) Cuantificación del volumen mitocondrial y del número de mitocondrias por célula (n=4 experimentos independientes) \*p<0,05; \*\*p<0,01 y #p<0,05 respecto a insulina 3 h.



**Figura 18. Efecto del tratamiento con cicloheximida sobre el incremento en los niveles de Opa-1 inducido por insulina en el cardiomiocito.**

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con insulina (Ins) 10 nM y cicloheximida (Ciclo) 10  $\mu$ g/mL por los tiempos indicados, para preparar extractos de proteínas totales. Los niveles de Opa-1 y  $\beta$ -tubulina se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%, (n=4 experimentos independientes). (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independientes), \*\*p<0,01 respecto al control y ##p<0,01 respecto a insulina 3 h.

Una vez caracterizados los cambios en la morfología mitocondrial y en los efectores proteicos de la fusión inducidos por el tratamiento con insulina, se procedió con el segundo objetivo específico de esta tesis, es decir, evaluar los efectos de insulina sobre diferentes parámetros del metabolismo energético en cultivos primarios de cardiomiocitos y su relación con la morfología mitocondrial. Adicionalmente, también se procedió a estudiar cómo se alteran estos parámetros al modificar el balance entre los procesos de fusión y fisión mitocondriales.

### 6.3. Efecto de insulina sobre diferentes parámetros del metabolismo celular en cardiomiocitos

Dado que insulina modifica las proteínas reguladoras del metabolismo mitocondrial, las cuales se han relacionado en otros modelos con un incremento de la tasa metabólica celular global (Cheng y cols., 2005), se estudió si los cambios morfológicos inducidos por la hormona, alteran los diferentes parámetros del metabolismo mitocondrial en cardiomiocitos. Para este fin, se estudiaron tres marcadores metabólicos en células tratadas con insulina (contenido intracelular de ATP, potencial de membrana mitocondrial [ $\Psi_{mt}$ ] y consumo de oxígeno), los cuales en su conjunto dan cuenta del metabolismo y funcionalidad de la mitocondria en nuestro modelo.

La **Figura 19** muestra que insulina indujo aumentos significativos en los tres parámetros metabólicos anteriormente señalados, siendo estos incrementos significativos a las 3 h de tratamiento. El aumento en estos tres parámetros metabólicos asociados a la función mitocondrial, dan cuenta en su conjunto, de un aumento en la fuerza motriz total de la cadena transportadora de electrones, lo que lleva finalmente a un aumento tanto de los niveles de ATP generados, como a un mayor consumo de oxígeno. Adicionalmente, y como se acaba de mencionar, para todas las mediciones de consumo de oxígeno también se realizó el estudio de la tasa de respiración desacoplada o velocidad respiratoria máxima, concepto meramente experimental y el cual se logró mediante la adición del desacoplante CCCP 200 nM a la cámara de respiración, en cada una de las mediciones realizadas. De esta manera, en la **Figura 19** también se muestra que insulina 10 nM, no sólo aumentó la tasa de respiración basal, sino también la capacidad respiratoria máxima en valores que son incluso mayores a los observados en condiciones basales. Estos resultados indican que insulina, aparte de incrementar la fuerza motriz total de la cadena transportadora de electrones, de alguna manera también incrementa la eficiencia de la misma, por un mecanismo que podría estar relacionado con los cambios morfológicos mitocondriales previamente descritos.

Adicionalmente a los tres parámetros metabólicos recientemente detallados, también se estudiaron los niveles de glicógeno intracelulares. Este ensayo tuvo como objetivo principal establecer si los niveles de glicógeno se modificaban en cardiomiocitos tras la acción de insulina y además, estudiar los niveles absolutos de esta molécula en nuestro modelo celular, dada la inexistencia de datos reproducibles para esto a la fecha. La **Figura 20** muestra que insulina no sólo incrementó los niveles de glicógeno en los cardiomiocitos después de 3 h de estímulo, sino que este aumento se mantuvo significativamente elevado aún hasta las 6 y 24 h de tratamiento, resultado inesperado, ya que los cardiomiocitos no se caracterizan por ser un modelo celular capaz de mantener grandes reservorios energéticos.

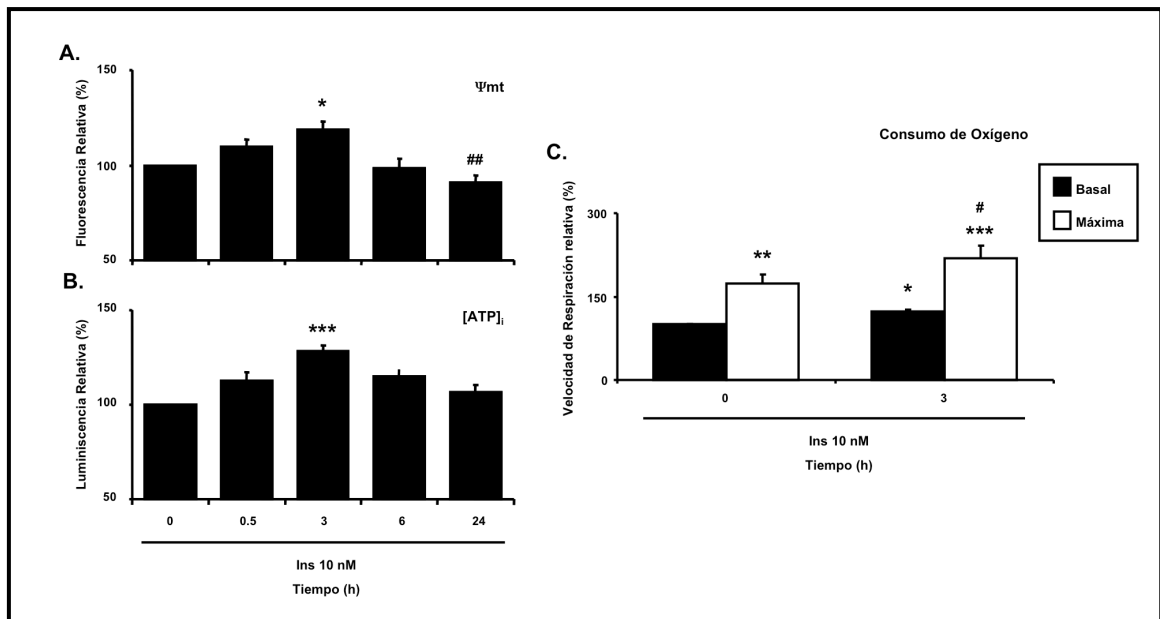
Para estudiar la relación causa efecto entre la morfología mitocondrial y la funcionalidad del organelo, se procedió entonces a investigar, los mismos tres parámetros relacionados con el metabolismo mitocondrial previamente descritos en células transducidas con un adenovirus antisentido contra la proteína Mfn2 o con un

micro RNA contra la proteína Opa-1. Ambos adenovirus impiden la fusión mitocondrial por mecanismos diferentes, lo que nos permitió estudiar si este proceso era necesario para el incremento en el metabolismo mitocondrial observado tras la estimulación con insulina.

#### **6.4. Relación entre el incremento de la fusión y metabolismo mitocondrial inducidos por insulina**

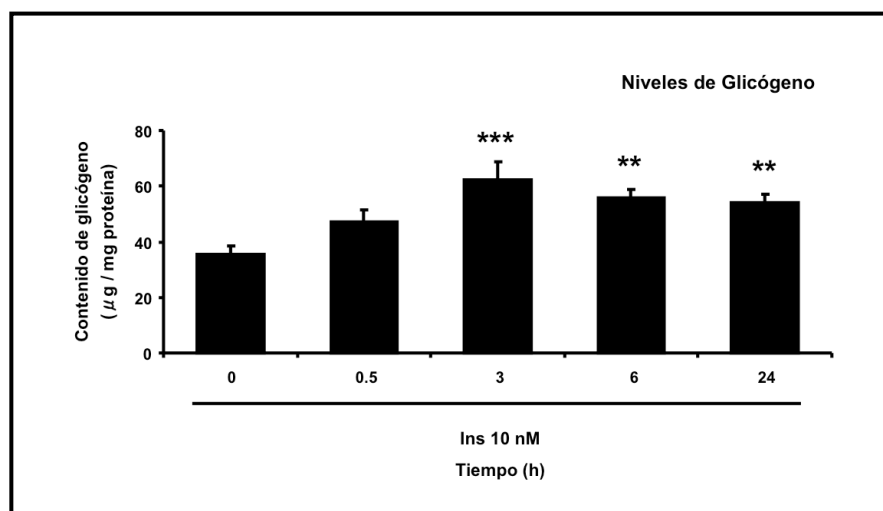
Como se mencionó anteriormente, para establecer la relación causa-efecto entre el papel de las proteínas de la fusión-fisión y el metabolismo, como primera aproximación, procedimos a modificar los niveles de Mfn2 mediante el uso de un adenovirus antisentido (asMfn2). AsMfn causó fragmentación de la red mitocondrial, lo cual se evidenció mediante la cuantificación del porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas, el volumen mitocondrial promedio y el número de mitocondrias por célula; así como por la disminución de los niveles de la proteína Mfn2 en alrededor de un 70% (**Figura 21**). En el caso de las células tratadas con insulina, el AsMfn2 impidió el aumento en los parámetros metabólicos observados frente a este tratamiento, efecto que no fue dependiente de la infección adenoviral, ya que no se observó en los controles tratados con un adenovirus vacío (**Figura 22**). Estos resultados nos sugieren, en primera instancia, que el incremento metabólico inducido por insulina en cardiomiocitos, efectivamente depende de la ocurrencia del proceso de fusión mitocondrial.





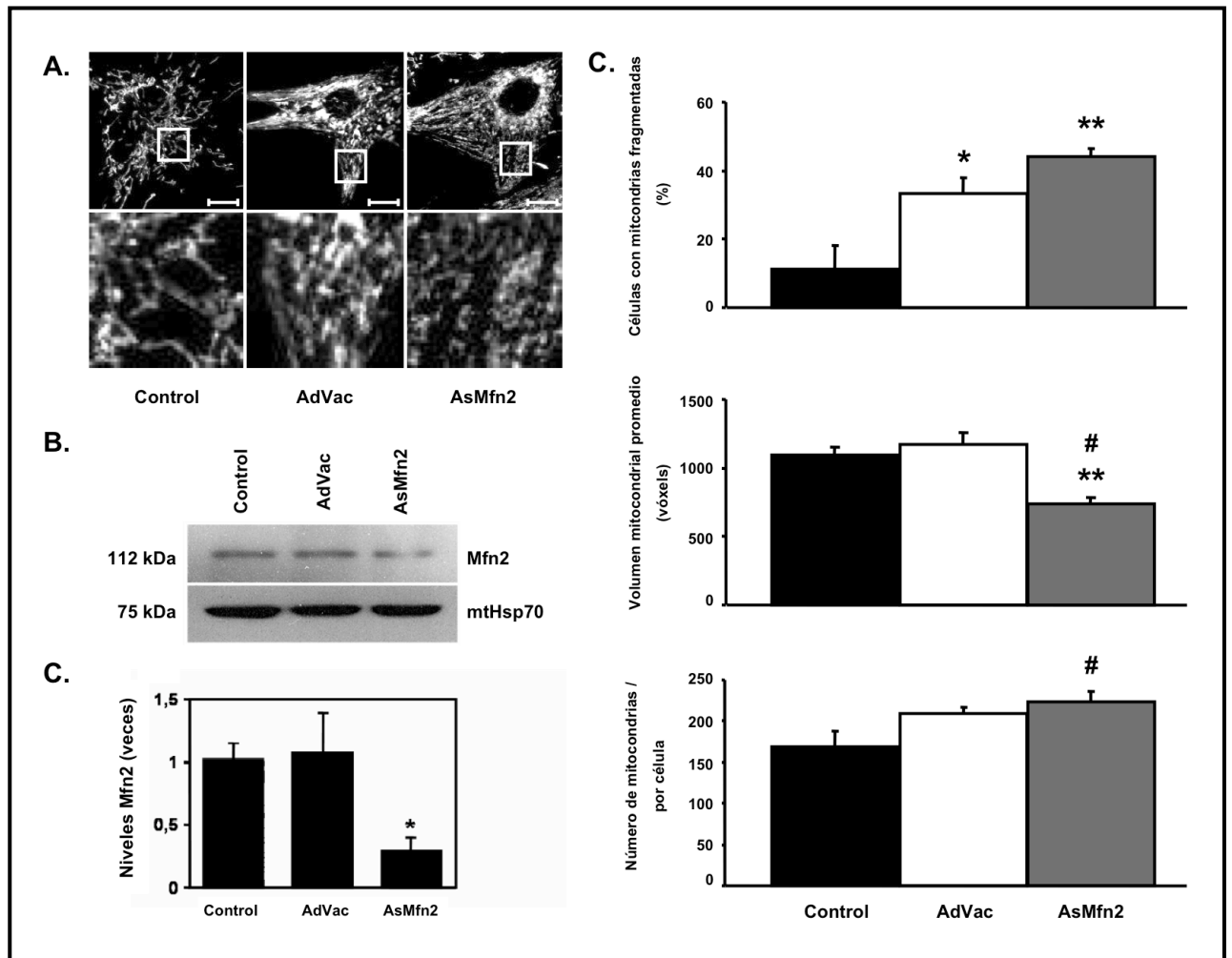
**Figura 19. Efecto de insulina sobre el  $\Psi_{mt}$ , la concentración intracelular de ATP y la velocidad de consumo de oxígeno en el cardiomiocito**

(A) El  $\Psi_{mt}$  se determinó en una población de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins), utilizando la sonda TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante CCCP (n=3 experimentos independientes), \*p<0,05 respecto al control y ##p<0,01 respecto a insulina 3 h. (B) Las concentraciones intracelulares de ATP ([ATP]<sub>i</sub>) se midieron mediante ensayo de luminiscencia (n=5 experimentos independientes), \*\*\*p<0,001 respecto al control. (C) La velocidad de consumo de oxígeno basal y máxima se midió en cardiomiocitos tratados con insulina mediante el uso de un electrodo de Clark (n=4 experimentos independientes), \*\*p<0,05; \*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al control y #p<0,05 respecto a la respiración basal con insulina 3 h.



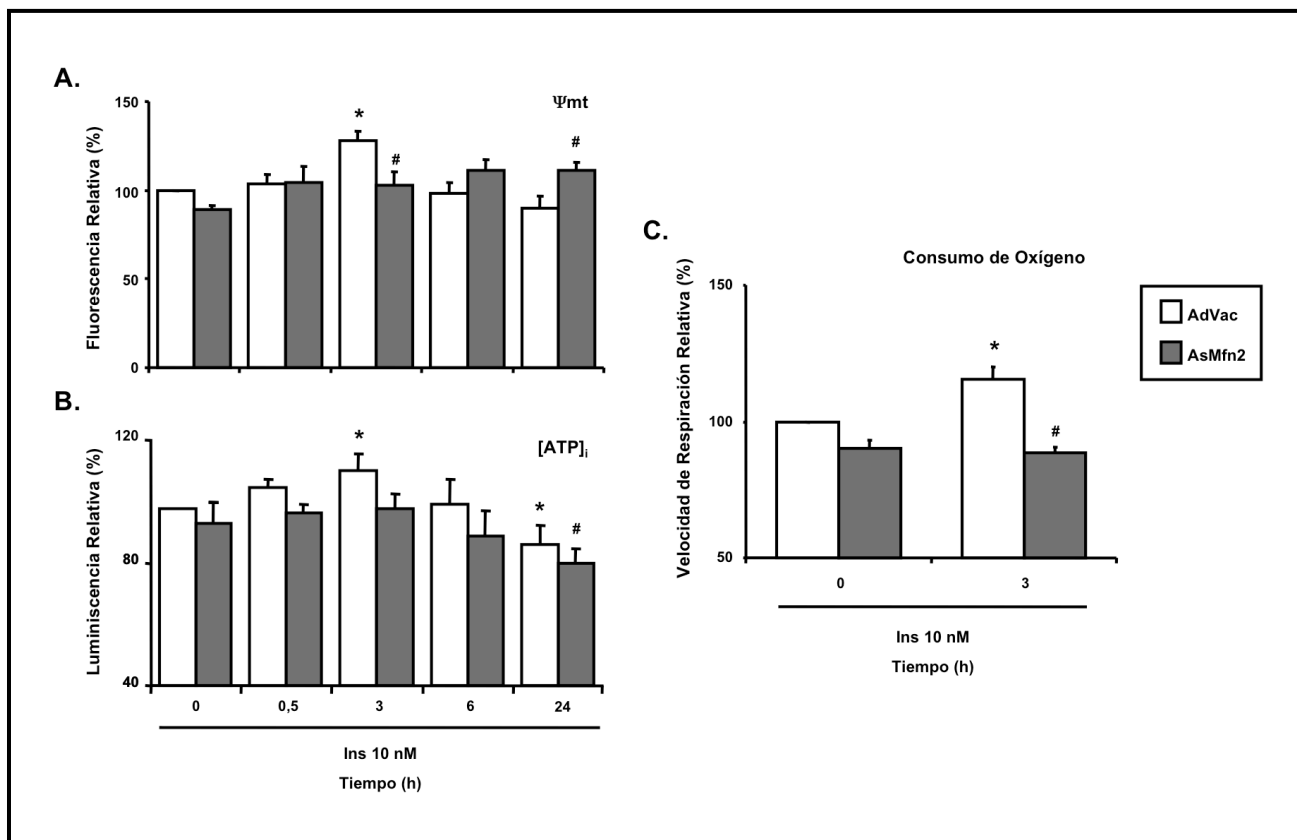
**Figura 20. Efecto de insulina sobre los niveles intracelulares de glicógeno en cultivos primarios de cardiomiocitos.**

(A) Las concentraciones intracelulares de glicógeno se midieron mediante un ensayo colorimétrico en cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM a los tiempos indicados (n=5 experimentos independientes), \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 respecto al control.



**Figura 21. Efecto del AsMfn2 sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocitos de rata.**

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con un adenovirus AsMfn2 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego las células se incubaron con la sonda Mitotracker Green-FM por 20 min a 37°C y se visualizaron por microscopía confocal. Escala: 10  $\mu$ m. (B) Extractos mitocondriales de cardiomiocitos transducidos con AsMfn2. Los niveles de Mfn2 y mtHsp70 se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en gels al 12%. (C) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=4 experimentos independientes), \*p<0,05 respecto al control de transducción con AdVac. (D) Cuantificación del porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas, del volumen mitocondrial promedio y del número de mitocondrias por célula (n=3 experimentos independientes), \*p<0,05; \*\*p<0,01 respecto al control y #p<0,05 respecto al control de transducción con AdVac.



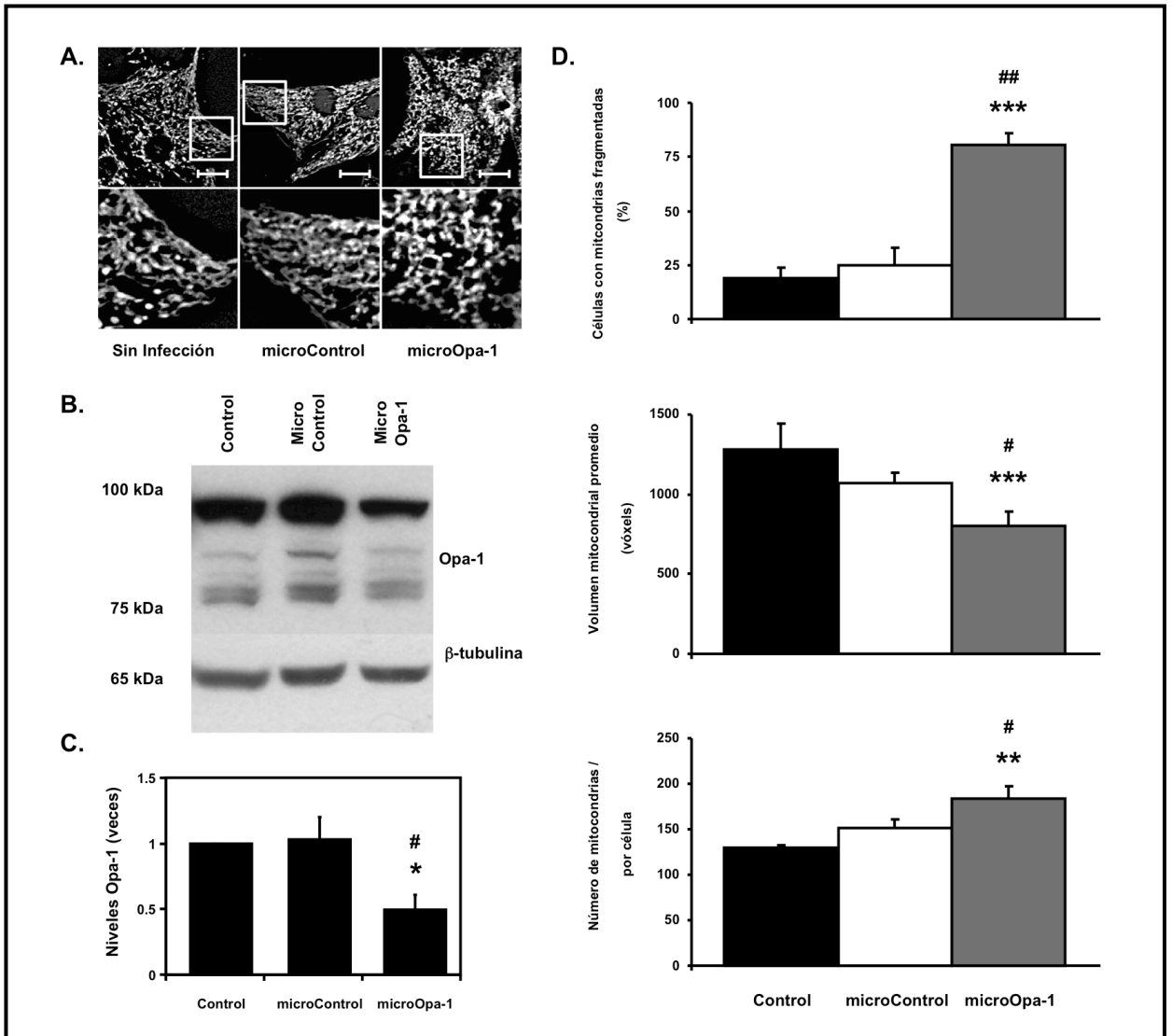
**Figura 22. Efecto de AsMfn2 sobre los incrementos metabólicos inducidos por insulina en el cardiomiocito**

(A) El  $\Psi_{mt}$  se determinó en poblaciones de cardiomiocitos tratados con un adenovirus AsMfn2 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección por 24 h y posteriormente tratados con insulina (Ins) 10 nM durante los tiempos que se indican, utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP (B) Las concentraciones intracelulares de ATP ( $[ATP]_i$ ) se midieron mediante ensayo de luminiscencia (C) La velocidad de consumo de oxígeno se midió en cardiomiocitos tratados con AsMfn2 e insulina 10 nM mediante el uso de un electrodo de Clark (n=4 experimentos independientes), \*p<0,05 respecto al control AdVac 0 h y #p<0,05 respecto al control respectivo del tiempo con el AdVac.

Dado que para la proteína Mfn2, también se ha descrito que controla el metabolismo mitocondrial regulando la expresión de los complejos de la cadena transportadora de electrones a través de señales que son independientes de su rol como proteína de la maquinaria de la fusión mitocondrial (Pich y cols., 2005), se inició el uso de un adenovirus que codifica para un micro RNA dirigido contra la segunda proteína de la fusión mitocondrial, Opa-1 (microOpa-1). Esta nueva estrategia experimental, también se utilizó para estudiar la relación causa-efecto entre la fusión mitocondrial y los efectos metabólicos inducidos por insulina. La **Figura 23** muestra que el microOpa-1, así como el AsMfn2, también produjo una

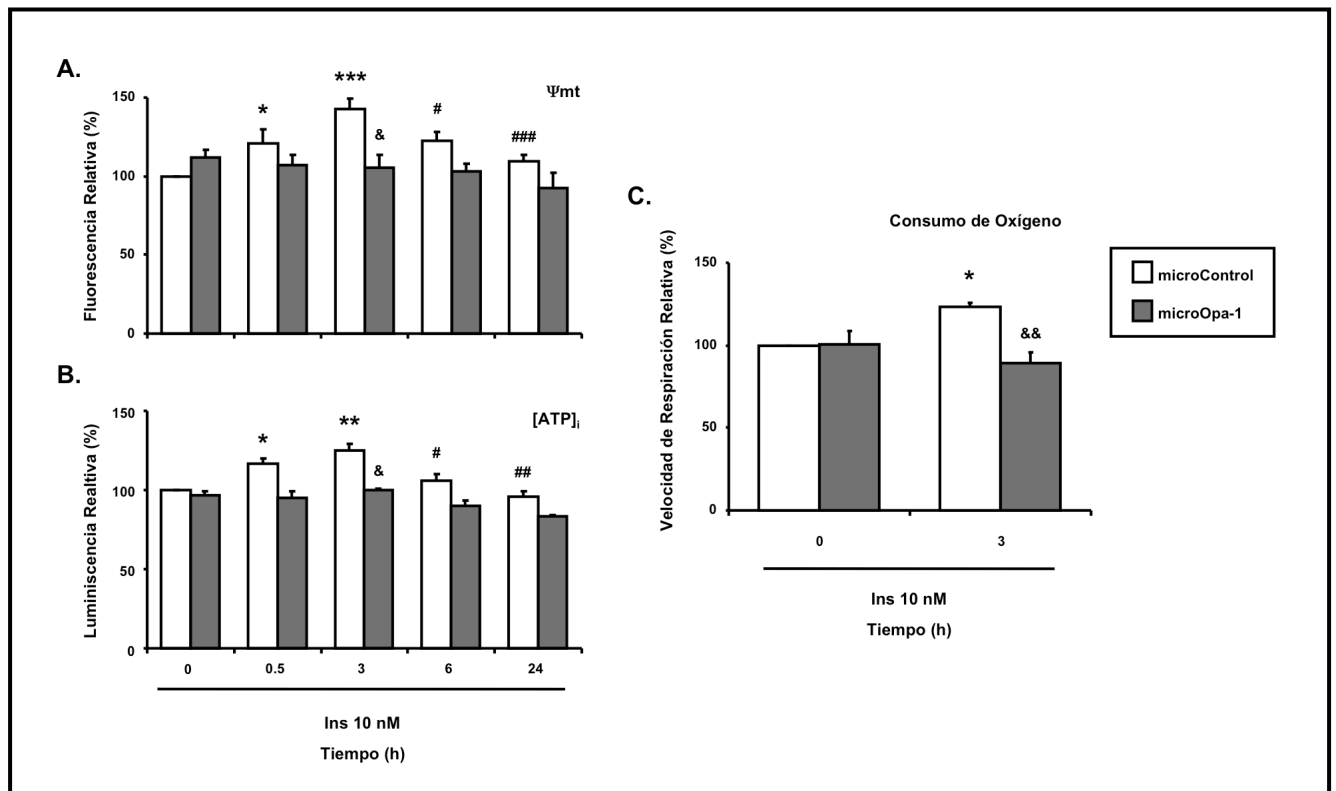
significativa fisión de la red mitocondrial, lo cual se manifestó al cuantificar el número de células que presentan mitocondrias fragmentadas, el volumen mitocondrial promedio y el número de mitocondrias por célula; así como una disminución significativa de los niveles totales de la proteína Opa-1 (aproximadamente 50% de disminución de los niveles proteicos totales), la cual fue medida mediante la utilización del anticuerpo policlonal contra la proteína, ya que el anticuerpo monoclonal solo daba cuenta de una disminución de un 25% de los niveles de Opa-1 (**datos no mostrados**).

Una vez estandarizado el uso del adenovirus microOpa-1, se estudió su efecto sobre las células tratadas con insulina. La **Figura 24** muestra que el microOpa-1 también previno el aumento del potencial de membrana, de los niveles intracelulares de ATP y del consumo de oxígeno inducidos por insulina 10 nM a las 3 h de tratamiento, efecto que tampoco fue dependiente de la transducción adenoviral puesto que no se observó en controles tratados con el adenovirus micro *scrambled* o microControl (**Figura 24**). Estos resultados refuerzan la idea de que el incremento del metabolismo mitocondrial inducido por insulina en cardiomiocitos, requiere del proceso de fusión mitocondrial, el cual es a su vez es dependiente de un incremento de los niveles de Opa-1. Esta última proteína, se constituye así, en una de las principales efectoras del incremento de la fuerza motriz de la cadena transportadora de electrones observado tras el estímulo con insulina, lo cual ocurriría a través de un mecanismo actualmente desconocido.



**Figura 23. Efecto del microOpa-1 sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito.**

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con un adenovirus microOpa-1 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral *scrambled* control (microControl) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego las células se incubaron con la sonda Mitotracker Green-FM por 20 min a 37°C y se visualizaron por microscopía confocal. Escala: 10  $\mu$ m. (B) Extractos totales de cardiomiocitos transducidos con microOpa-1. Los niveles de Opa-1 y  $\beta$ -tubulina se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12% (C) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=4 experimentos independientes), \*\*p<0,01 respecto al control y #p<0,05 respecto al control de transducción con el microControl. (D) Cuantificación del porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas, del volumen mitocondrial promedio y del número de mitocondrias por célula (n=4 experimentos independientes), \*\*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,001 respecto al control; #p<0,05 y ##p<0,01 respecto al control de transducción con el microControl.



**Figura 24. Efecto del microOpa-1 sobre los incrementos metabólicos inducidos por insulina en el cardiomiocito.**

(A) El  $\Psi_{mt}$  se determinó en poblaciones de cardiomiocitos tratados con un adenovirus microOpa-1 (MOI = 1.000) o con un micro *scrambled* (microControl) a la misma multiplicidad de infección por 24 h y posteriormente tratados con insulina (Ins) 10 nM durante los tiempos indicados, utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP (B) Las concentraciones intracelulares de ATP ( $[ATP]_i$ ) se midieron mediante ensayo de luminiscencia (C) La velocidad de consumo de oxígeno se midió en cardiomiocitos tratados con el microOpa-1 e insulina 10 nM mediante el uso de un electrodo de Clark (n=4 experimentos independientes), \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 respecto al microControl 0 h; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 respecto al microControl insulina 3 h; &p<0,05 y &&p<0,01 respecto al control respectivo del tiempo con el microControl.

Debido a que el grado de conectividad y morfología de la red mitocondrial, depende del equilibrio entre los procesos de fusión y fisión (Scheffler, 2001; Westerman, 2002), se procedió también a analizar, tal como se mencionó previamente, el efecto de un adenovirus que codifica para una proteína dominante negativa de la proteína de la fisión Drp-1 (DrpK38A). Esta proteína altera el equilibrio de la dinámica mitocondrial, desplazándolo hacia la fusión de la red al impedir la ocurrencia de los procesos normales de fisión del organelo (Smirnova y cols., 2001). La utilización de este adenovirus produce un incremento significativo

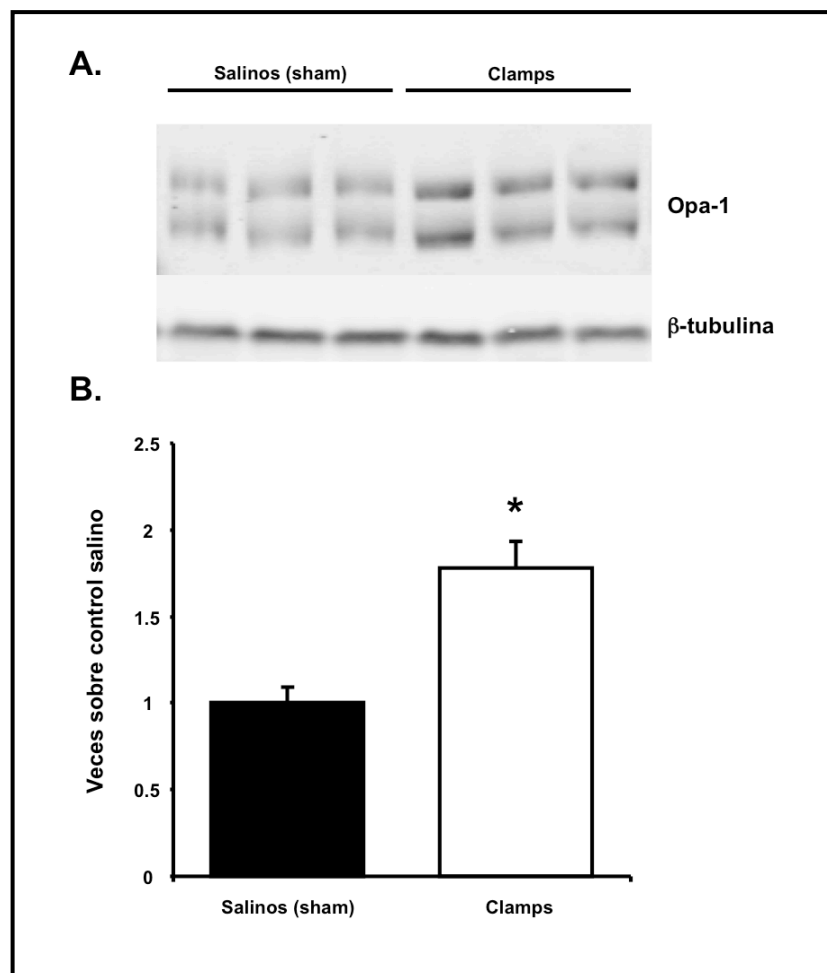
en la aparición de células con mitocondrias fusionadas, así como un aumento del volumen mitocondrial promedio y una disminución en el número de mitocondrias por célula. Sin embargo, y a pesar de la caída significativa que produce basalmente en los niveles de ATP intracelulares y de  $\Psi_{mt}$ , no afecta la respuesta transitoria que presentan los cardiomiocitos frente al tratamiento con insulina al analizar estos mismos parámetros (**datos no mostrados**).

### **6.5. Efecto del aumento de insulina sobre los niveles de la proteína Opa-1 y el metabolismo mitocondrial en un modelo animal**

Como una forma de estudiar si los efectos descritos en los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata también pueden ser observados en un modelo *in vivo*, se trataron ratones WT C57BL6 con un clamp euglicémico-hiperinsulinémico por 2 h, período durante el cual se controlaron los niveles de glucosa circulantes cada 5 min a lo largo de todo el proceso (**Huang y cols., 2007**). Una vez finalizadas las 2 h de tratamiento, se anestesió, sacrificó y extrajo el corazón de los animales, el cual se utilizó para el análisis de proteínas totales cardíacas por Western blot y para el aislamiento de fibras cardíacas permeabilizadas con saponina. La **Figura 25** muestra que el clamp euglicémico-hiperinsulinémico aumentó los niveles totales de la proteína Opa-1 en los ratones WT en comparación con sus respectivos controles salinos ( $1,8 \pm 0,1$ ;  $p < 0,001$ ). Paralelamente, en la **Figura 26**, también se observa que este mismo tratamiento no afectó los niveles totales de la proteína Mfn2, pero sí causó la fosforilación de la proteína Akt, lo cual permitió controlar el correcto funcionamiento del procedimiento realizado.

Para el caso de las fibras, la realización del clamp causó un incremento de la velocidad de respiración en estado 3 (+38;  $p < 0,05$ ) y la síntesis de ATP (+50%;  $p < 0,05$ ) de las fibras cardíacas aisladas, permeabilizadas con saponina y estimuladas con 20  $\mu$ M de palmitoil-carnitina y 5 mM de malato (**Figura 27**). Estos últimos resultados, indican que las fibras tratadas con insulina presentan un aumento del metabolismo mitocondrial y, adicionalmente, son más eficientes en el consumo de oxígeno y posterior producción de ATP, lo cual puede ser numéricamente determinado al establecer la razón ATP/O, la cual es significativamente mayor para los ratones tratados con el clamp euglicémico-hiperinsulinémico, en comparación a los controles salinos (**Figura 27**). Estos últimos experimentos se realizaron durante una estadía de investigación de

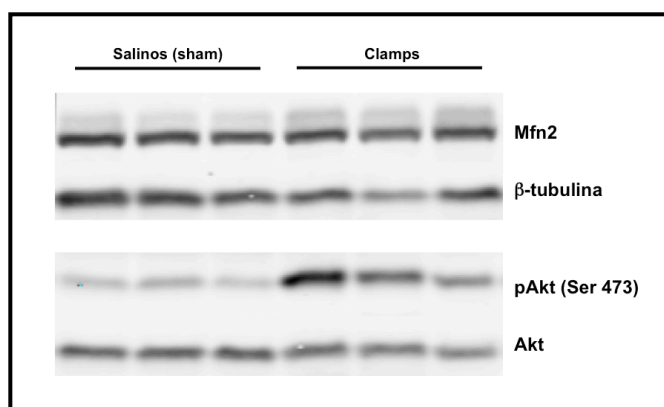
4 meses, realizada en el laboratorio del Dr. Dale Abel en la Universidad de Utah School of Medicine, Salt Lake City, USA, gracias al apoyo del concurso de Becas de Pasantías Doctorales en el Extranjero - BECAS CHILE, concurso año 2009.



**Figura 25. Efecto del clamp euglicémico-hiperinsulinémico sobre los niveles de la proteína Opa-1 en extractos totales de proteínas cardíacas de ratones WT**

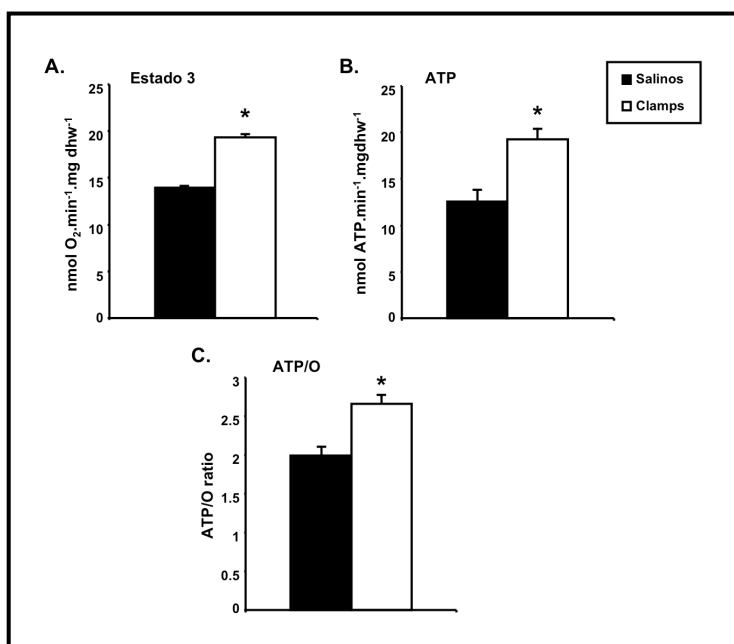
(A) Ratones WT C57BL6 se sometieron a un clamp euglicémico-hiperinsulinémico (20 mU) durante 2 h, al término de este período los ratones se sacrificaron y sus corazones se utilizaron para la preparación de homogenizados de proteínas cardíacas. Los niveles de Opa-1 y  $\beta$ -tubulina se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=6 animales), \*p<0,05 vs control salino.





**Figura 26. Efecto del clamp euglicémico-hiperinsulinémico sobre los niveles de la proteína Mfn2 y sobre la fosforilación de Akt en extractos totales de proteínas cardíacas de ratones WT**

(A) Ratones WT C57BL6 se sometieron a un clamp euglicémico-hiperinsulinémico (20 mU) durante 2 h, al término de este período los ratones se sacrificaron y sus corazones se utilizaron para la preparación de homogenizados de proteínas cardíacas. Los niveles de Mfn2,  $\beta$ -tubulina, pAkt y Akt se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en gels al 12%.



**Figura 27. Efecto del clamp euglicémico-hiperinsulinémico sobre la respiración y síntesis de ATP de fibras cardíacas aisladas de ratones WT**

(A) Velocidad de respiración en estado 3 de fibras cardíacas aisladas. Ratones WT C57BL6 se sometieron a un clamp euglicémico-hiperinsulinémico (20 mU insulina) durante 2 h. Al término de este período, los ratones se sacrificaron y sus corazones se utilizaron para la preparación de fibras cardíacas, las cuales se permeabilizaron con saponina (50  $\mu$ g/mL) y luego estimularon con 20  $\mu$ M de palmitoil-carnitina y 5 mM de malato (B) Velocidad de síntesis de ATP de fibras cardíacas aisladas. Los niveles de ATP de las fibras aisladas se midieron mediante ensayo luminométrico luciferina- luciferasa (B) Razón entre la velocidad de síntesis de ATP y la velocidad de respiración en Estado 3 de fibras cardíacas aisladas. Todos los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=6 animales), \*p<0,05 vs control salino.

Una vez establecido el papel de insulina en la inducción de procesos de fusión mitocondrial y la implicancia de estos procesos y sus efectores, se procedió a estudiar la participación de la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt y del complejo proteico mTORc1 en la mediación de estos efectos. Esto último constituyó el tercer objetivo específico y final de esta tesis.

#### **6.6. Rol de la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt y del complejo metabólico mTORc1 en los efectos sobre la fusión y función mitocondrial mediados por insulina en el cardiomiocito.**

En los últimos años han surgido diversas evidencias en la literatura que muestran que la maquinaria que gobierna la dinámica mitocondrial también podría participar en la regulación del metabolismo energético; sin embargo, aún no se ha descrito una interacción directa entre las proteínas vinculadas a ambos procesos. Una posibilidad, es que las proteínas de la fisión/fusión mitocondrial también sean blanco de proteínas kinasas y/o fosfatasas que regulen el metabolismo intermediario. Puesto que insulina a través de la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt regula el estado de fosforilación de diversas proteínas y/o complejos involucrados en el control del metabolismo, tal es el caso de mTORc1, GSK-3 $\beta$ , AMPK, entre otras (**Cheng y cols., 2010**); es posible proponer que tal vez esta misma vía controle la morfología mitocondrial. De ser correcta esta premisa, se establecería por primera vez una relación directa entre morfología y función mitocondrial y se explicaría, en parte, porqué en la obesidad y resistencia a insulina se encuentran alteraciones en proteínas de la maquinaria de la fusión (**Bach y cols., 2003; Walder y cols., 2005**).

Como primera aproximación, se estudió si la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt respondía a los diferentes tiempos de tratamiento con insulina estudiados (0 - 24 h) y la generación del proceso de desensibilización en estas mismas condiciones. Con esta finalidad, se realizaron ensayos de Western blot que permitieran estudiar el grado de fosforilación de la proteína Akt en las condiciones de experimentación usuales y bajo la re-estimulación con un segundo pulso de insulina, posterior al estímulo original. La **Figura 28** muestra que la proteína Akt se encuentra fosforilada significativamente entre la media y 6 h de tratamiento con insulina, fosforilación que disminuye a las 24 h. Para el estudio del proceso de desensibilización de la respuesta, las células se trataron por los mismos tiempos

originales, para luego ser re-expuestas a un segundo pulso con la hormona (insulina 10 nM por 15 min). Bajo estas condiciones, se observó que a las 6 y 24 h de tratamiento, la capacidad de respuesta, medida como fosforilación de Akt, frente a un segundo estímulo con insulina, disminuyó significativamente (**Figura 28**). Este resultado sugiere, que bajo nuestras condiciones experimentales, la vía transduccional mediada por la proteína Akt, se encuentra plenamente funcional al menos hasta las 3 h de estimulación, con una capacidad de respuesta normal y aún no comprometida en procesos de desensibilización y resistencia.

Actualmente también sabemos que insulina estimula la fosforilación del complejo mTORc1 en forma dependiente de Akt, lo que causa la activación de sus efectores río abajo como p70S6Kinasa en diversos tipos celulares, incluidos los cardiomiocitos (**Sharma y cols., 2007**). Esta ruta transduccional tendría un papel fundamental en la regulación del metabolismo y crecimiento celular frente a diferentes estados nutricionales, así como un papel directo en el control de la función mitocondrial, el cual ha sido descrito recientemente (**Schiecke y cols., 2006; Ramanathan y Schreiber, 2009**). Si mTORc1 regula la función mitocondrial, es posible también preguntarse si esta regulación también cursa a través de un control de la morfología del organelo. Sin embargo, puesto que estos antecedentes son sumamente recientes, antes de estudiar la directa implicancia de este importante complejo en el control de la morfología mitocondrial inducido con y sin insulina, se procedió a estudiar si bajo nuestras condiciones experimentales, este complejo se encontraba activo. Con este fin, se estudió el grado de fosforilación del complejo mTOR en todas nuestras condiciones experimentales y frente al inhibidor químico rapamicina (Rapa, 100 nM) como control positivo. Si el sistema se encuentra funcional y activo, tendría que observarse la fosforilación de este complejo frente a la estimulación con insulina, así como la inhibición de esta fosforilación con la utilización del inhibidor, tal como se muestra en la **Figura 29**. Una vez obtenido este resultado, se procedió a estudiar la participación de este complejo en los efectos sobre la morfología y función mitocondrial mediados por insulina en los cardiomiocitos.

La primera aproximación directa para estudiar la participación de la ruta RI/IRS-1/PI3-K/Akt/mTORc1 en el control de los efectos de insulina fue investigar la

inhibición de esta vía y sus consecuencias sobre los cambios en la morfología mitocondrial en condiciones basales y tras el tratamiento. Con este motivo, se utilizó una batería de inhibidores químicos con importantes blancos en esta ruta: Genisteína, inhibidor general de receptores con actividad tirosina kinasa; LY-294002 (Ly), inhibidor de PI3-K; Akti VIII (Akti), inhibidor específico de Akt 1 y 2 y Rapa, inhibidor del complejo mTORc1; además de las células tratadas con o sin insulina, las cuales fueron visualizadas mediante el uso de la sonda Mitotracker Green y microscopía confocal. Los resultados mostraron que tanto Akti (10  $\mu$ M) como Rapa (100 nM) a las 3 h de tratamiento no causaron fragmentación de la red mitocondrial por sí solos, pero sí previnieron significativamente la fusión de la red mitocondrial inducida por insulina en este mismo tiempo, efecto evaluado por medio de la cuantificación del volumen mitocondrial promedio y del número de mitocondrias por célula (**Figura 30**). Paralelamente, el uso de genisteína (50  $\mu$ M) y Ly (50  $\mu$ M), mostró estos mismos efectos (**Figura 31**), lo cual sugiere fuertemente que la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt participa en la regulación de la fusión mitocondrial inducida por insulina, así como también lo estaría haciendo el complejo mTORc1, el cual podría actuar río abajo de esta misma vía, tal como ha sido previamente descrito (**Moschella y cols., 2007; Sharma y cols., 2007**). Cabe destacar, que la utilización de Akti y Rapa en conjunto, en experimentos preliminares idénticos a los descritos anteriormente, no mostró efectos aditivos, lo cual refuerza la idea de la participación de mTORc1 río abajo de insulina en el control de la fusión mitocondrial (**Figura 32**).

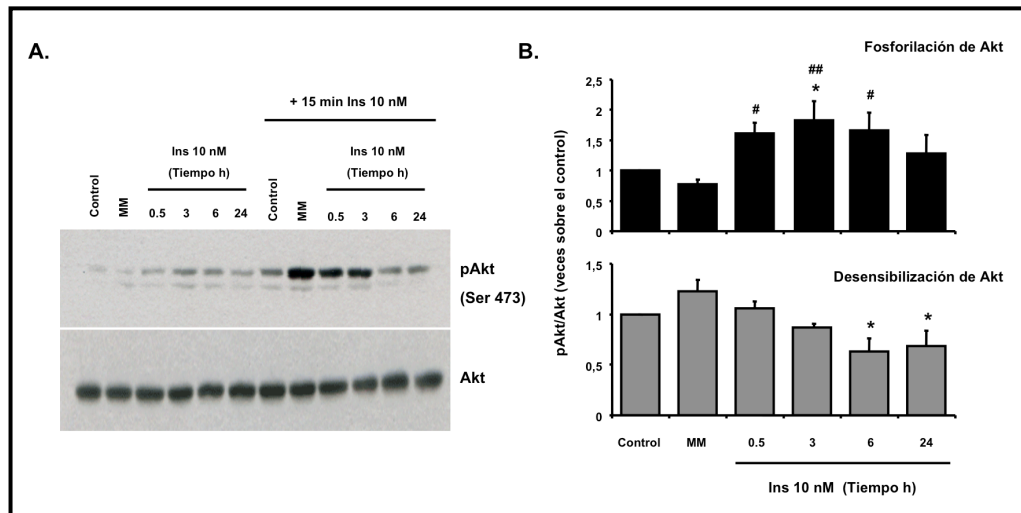
Adicionalmente, también se investigó si el ingreso rápido de glucosa a las células cardíacas por acción de insulina, a través de los transportadores GLUT-4, también contribuye al proceso de fusión mitocondrial observado en los cardiomiocitos. Para este fin, se utilizó Citocalasina B, compuesto que a bajas concentraciones (10  $\mu$ M) inhibe los transportadores GLUT-4 y el ingreso de glucosa a las células (**Contreras-Ferrat y cols., 2010**). Tal como se muestra en la **Figura 33**, el tratamiento con este inhibidor no impidió el aumento de volumen y disminución del número de partículas mitocondriales dependiente de insulina (10 nM, 3 h), pero sí disminuyó su efecto. Este resultado, concuerda con el papel propuesto para mTORc1 como principal regulador de los cambios en la morfología mitocondrial inducidos por insulina, ya que de acuerdo a antecedentes presentes en

la literatura, para lograr la completa activación de este complejo a través de la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt, es necesario el ingreso de glucosa a las células cardíacas (**Sharma y cols., 2007**). Este antecedente, junto a la ausencia de un efecto aditivo frente a la inhibición de Akt y del complejo mTORc1 mismo, podría sugerir que este complejo actuaría como uno de los principales mediadores río abajo de los efectos mitocondriales cardíacos hasta aquí descritos. Sin embargo, futuras investigaciones deberán confirmar o refutar tal hipótesis, así como clarificar cómo el complejo mTORc1 regula la morfología mitocondrial.

Una vez establecido el papel de la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt/mTORc1 en la regulación de la fusión mitocondrial y su dependencia del aumento de los niveles totales de la proteína Opa-1, se estudió el efecto de los inhibidores Akti y Rapa sobre el incremento en los niveles de esta proteína inducidos por insulina 10 nM a las 3 h de tratamiento. La **Figura 34** muestra que ambos inhibidores, impidieron el aumento en los niveles totales de la proteína con respecto a sus controles, siendo el efecto de Rapa aparentemente más efectivo que el de Akti.

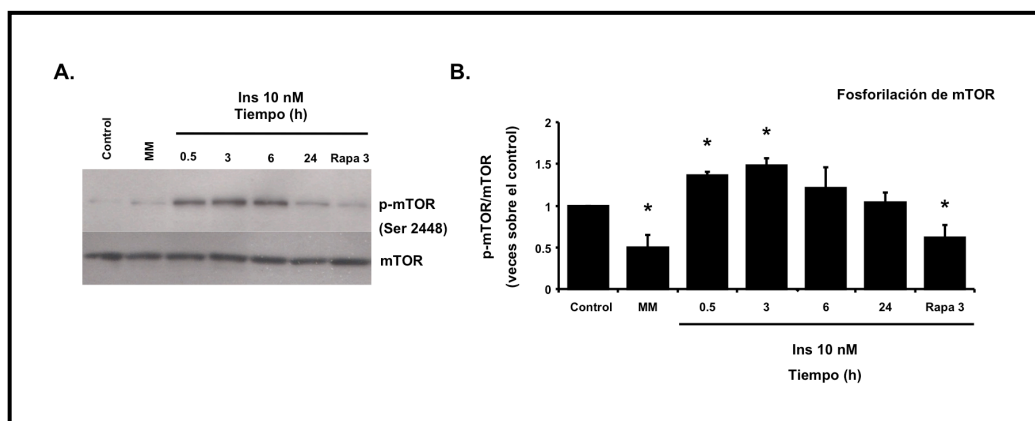
Finalmente, como tanto los datos de morfología mitocondrial, como los asociados al estudio de los niveles de Opa-1, sugieren que la vía transduccional RI/IRS-1/PI3-K/Akt se encuentra implicada en la regulación de la morfología mitocondrial, así como también el complejo mTORc1, el cual probablemente estaría actuando río abajo de la proteína Akt, se procedió a estudiar la implicancia de la inhibición de este complejo en los incrementos metabólicos inducidos por insulina. La **Figura 35** muestra que Rapa 100 nM impidió el incremento del potencial mitocondrial y de la concentración intracelular de ATP inducido con insulina 10 nM a las 0,5 y 3 h de tratamiento, efecto que fue significativo con respecto a los controles. Un efecto similar, se observó al estudiar lo que ocurre con la velocidad de respiración celular, en donde Rapa 100 nM también inhibió efectivamente el aumento en la tasa respiratoria previamente descrito para el tratamiento con insulina (**Figura 35**). Todos estos antecedentes, indican que mTORc1 podría jugar un papel fundamental en la regulación de la fusión mitocondrial inducida por insulina, en el aumento de los niveles de la proteína Opa-1 y finalmente, también en los efectos metabólicos asociados a estos procesos, lo cual constituye una

importante y novedosa acción, no descrita previamente para este complejo transduccional, el cual podría actuar como un regulador maestro, capaz de conectar la función y morfología mitocondrial del organelo.



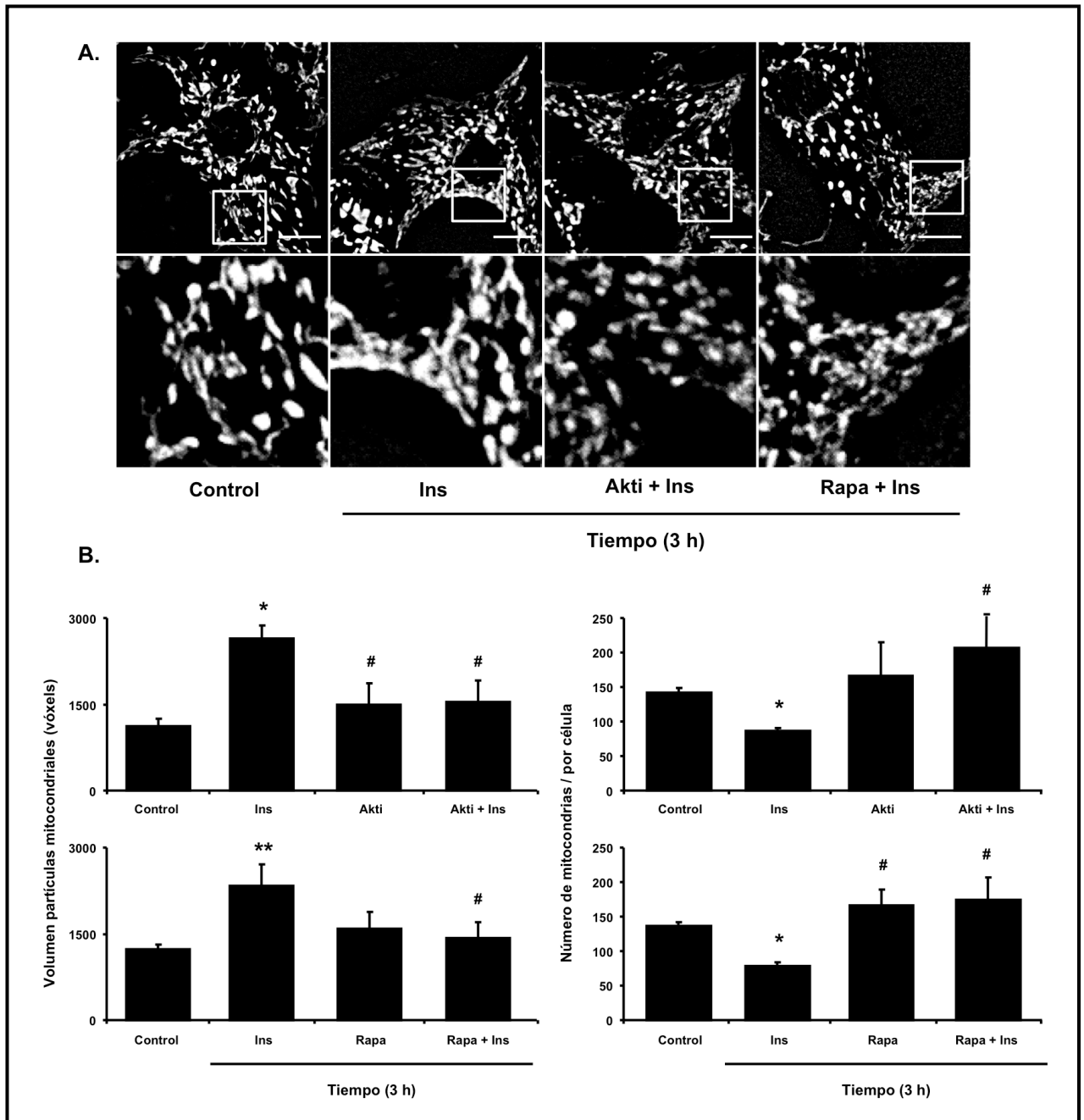
**Figura 28. Efecto de insulina sobre la fosforilación y desensibilización de Akt en el cardiomiocito.**

(A) Extractos de proteínas totales de cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM a los tiempos indicados y luego sometidos a un nuevo pulso de la hormona por 15 min. Los niveles de pAkt y Akt total en estos extractos se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independientes), \*p<0,05 respecto al control; #p<0,05 y ##p<0,01 respecto al control con medio de mantención sin FBS.



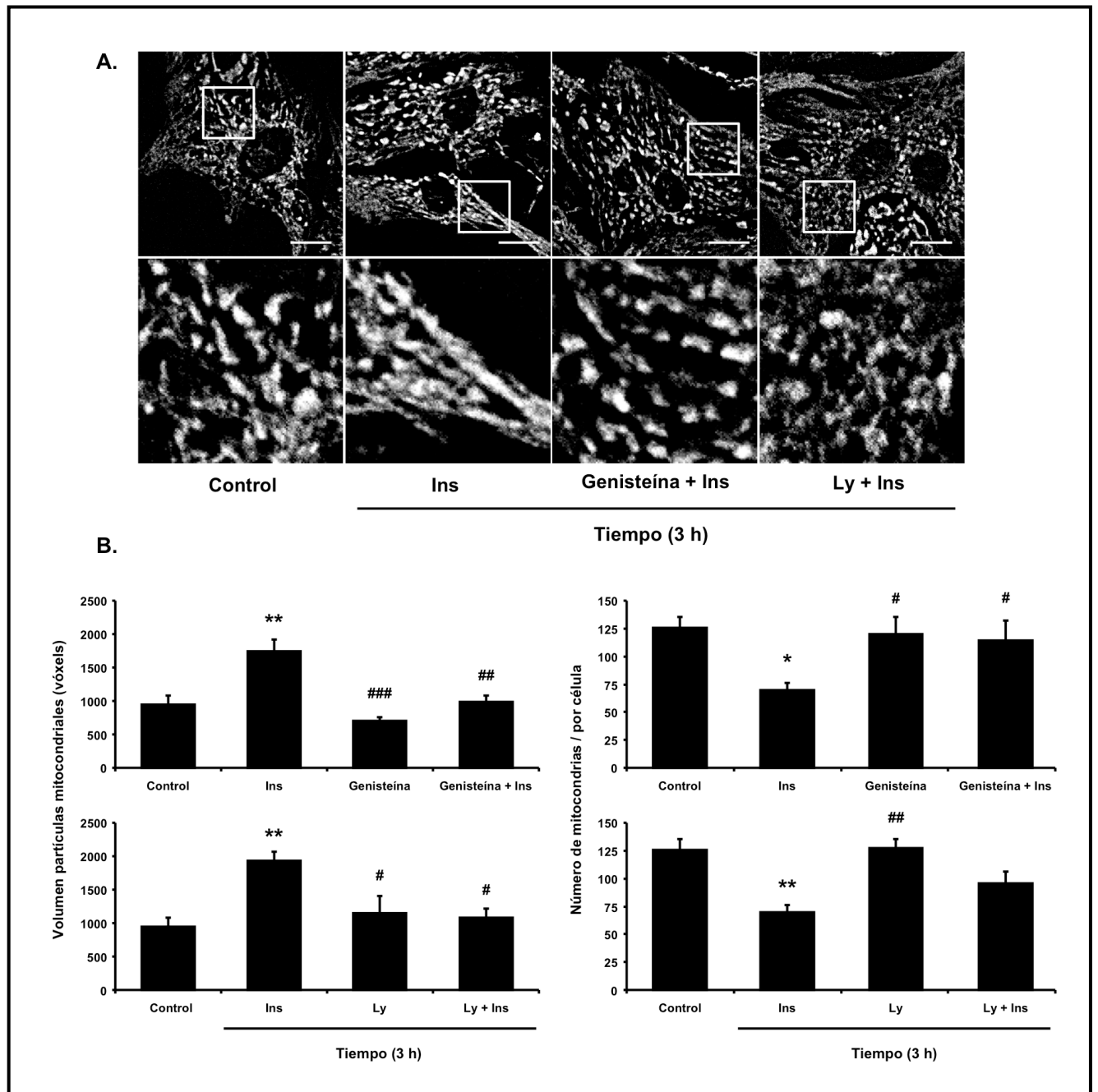
**Figura 29. Efecto de insulina sobre la fosforilación de la proteína mTORc1 en el cardiomiocito.**

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con insulina (Ins) 10 nM a los tiempos indicados para posteriormente preparar extractos de proteínas totales. Los niveles de p-mTOR y mTOR total en estos extractos se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 8%. (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independientes), \*p<0,05 respecto al control.



**Figura 30. Efecto de la inhibición de Akt y mTORc1 sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en el cardiomiocito.**

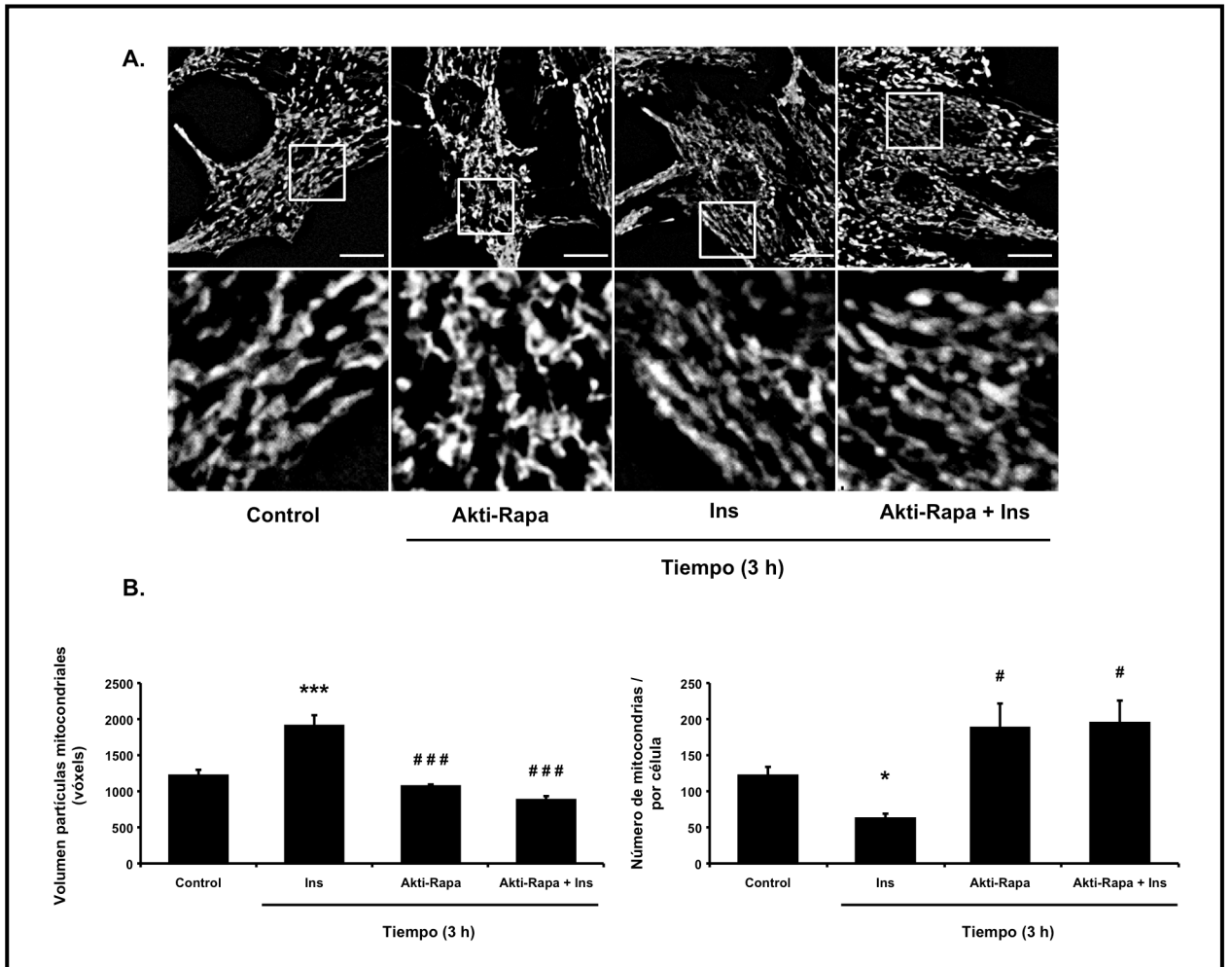
(A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM, Akti 10  $\mu$ M y/o Rapa 100 nM por los tiempos indicados. Las imágenes confocales se obtuvieron de células marcadas con Mitotracker Green. Escala: 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación del volumen mitocondrial y del número de mitocondrias por célula (n=4 experimentos independientes), \*p<0,05; \*\*p<0,01 respecto al control y #p<0,05 respecto a insulina 3 h.



**Figura 31. Efecto de la inhibición del receptor de insulina y de la proteína PI3-K sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en el cardiomiocito.**

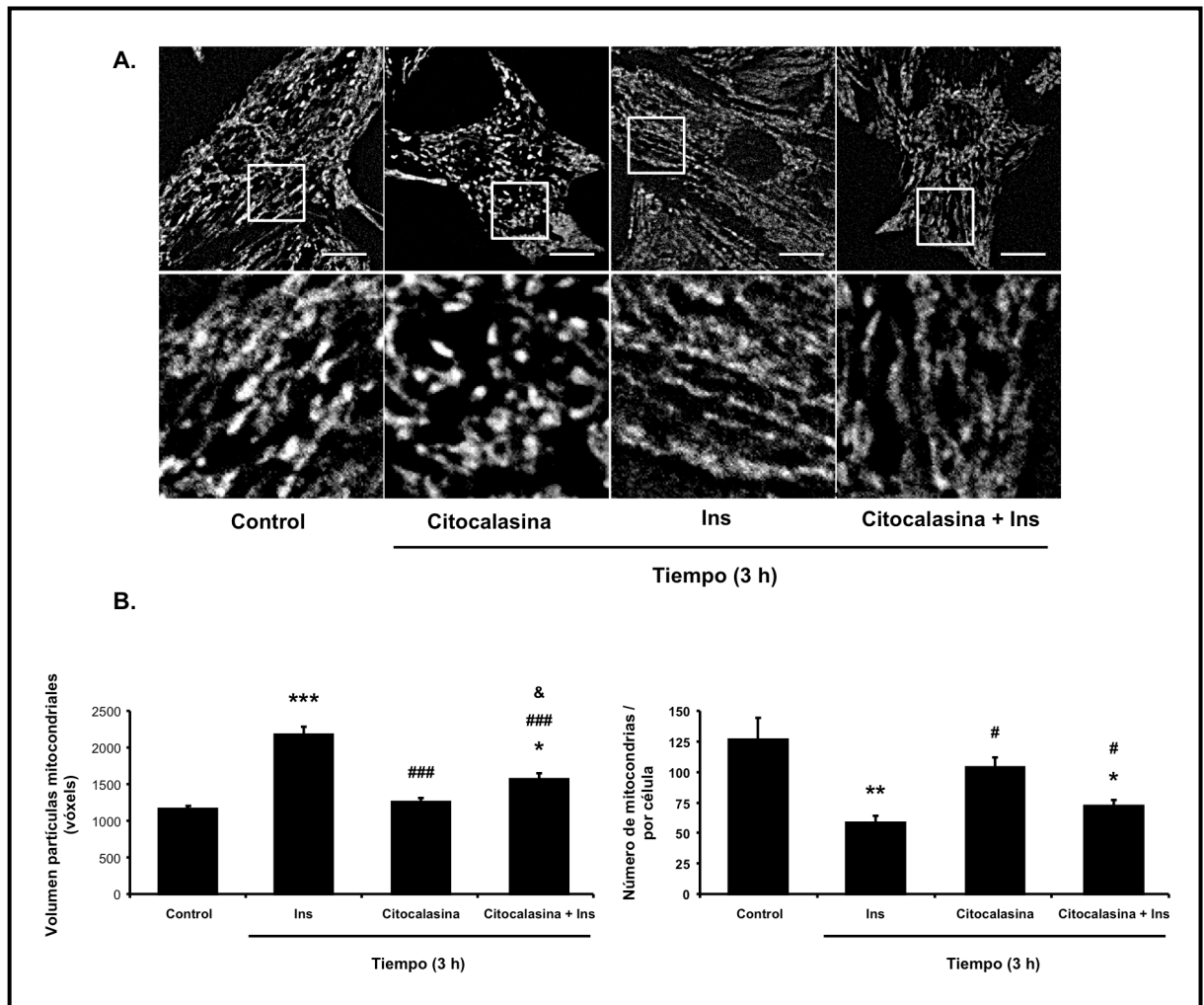
(A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM, Genisteína 50  $\mu$ M y/o Ly 50  $\mu$ M por los tiempos indicados. Las imágenes confocales se obtuvieron de células marcadas con Mitotracker Green. Escala: 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación del volumen mitocondrial y del número de mitocondrias por célula (n=4 experimentos independientes), \*p< 0,05; \*\*p<0,01 respecto al control; #p<0,05 y ##p<0,01 respecto a insulina 3 h.





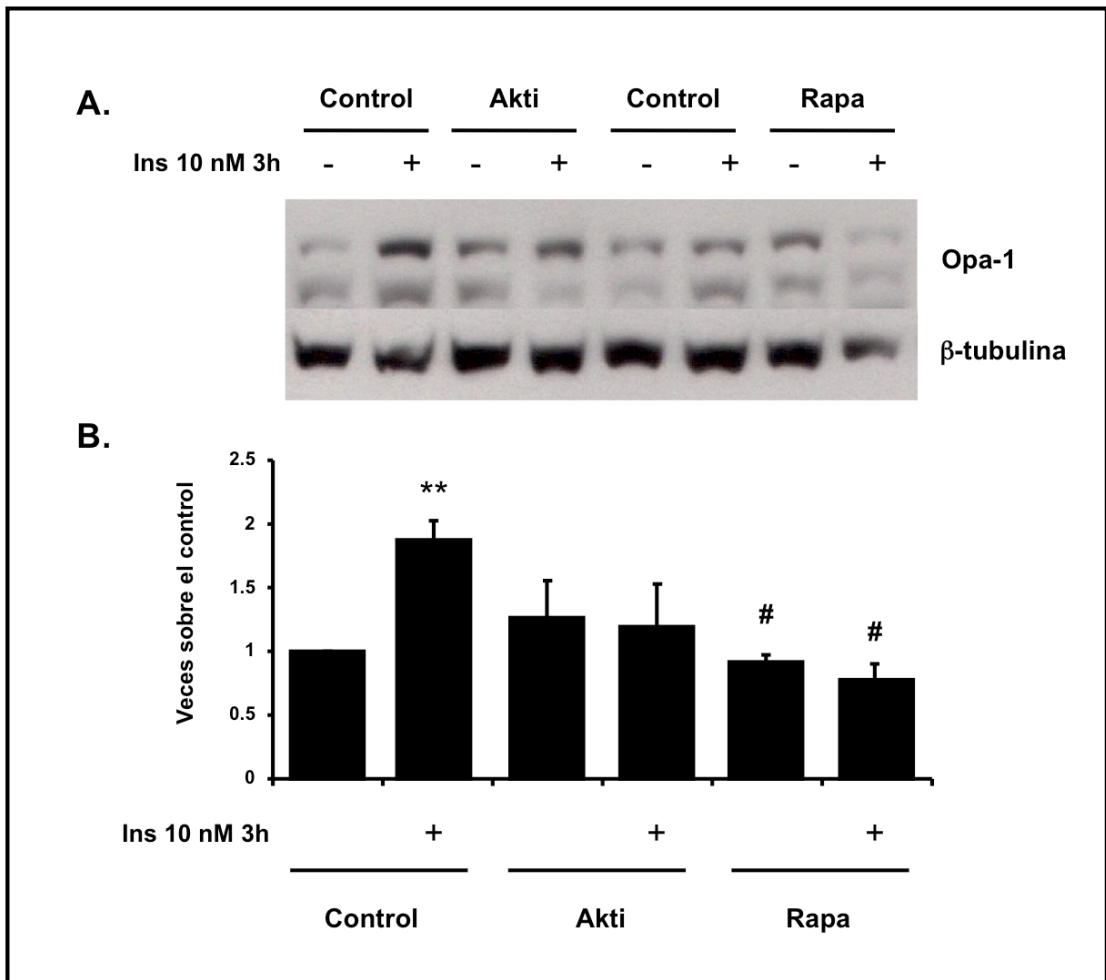
**Figura 32. Efecto de la inhibición de la inhibición conjunta de Akt y mTORc1 sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en el cardiomiocito.**

(A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM, Akti 10  $\mu$ M y Rapa 100 nM por los tiempos indicados. Las imágenes confocales se obtuvieron de células marcadas con Mitotracker Green. Escala: 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación del volumen mitocondrial y del número de mitocondrias por célula (n=4 experimentos independientes), \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 respecto al control; #p<0,05 y ###p<0,001 respecto a insulina 3 h.



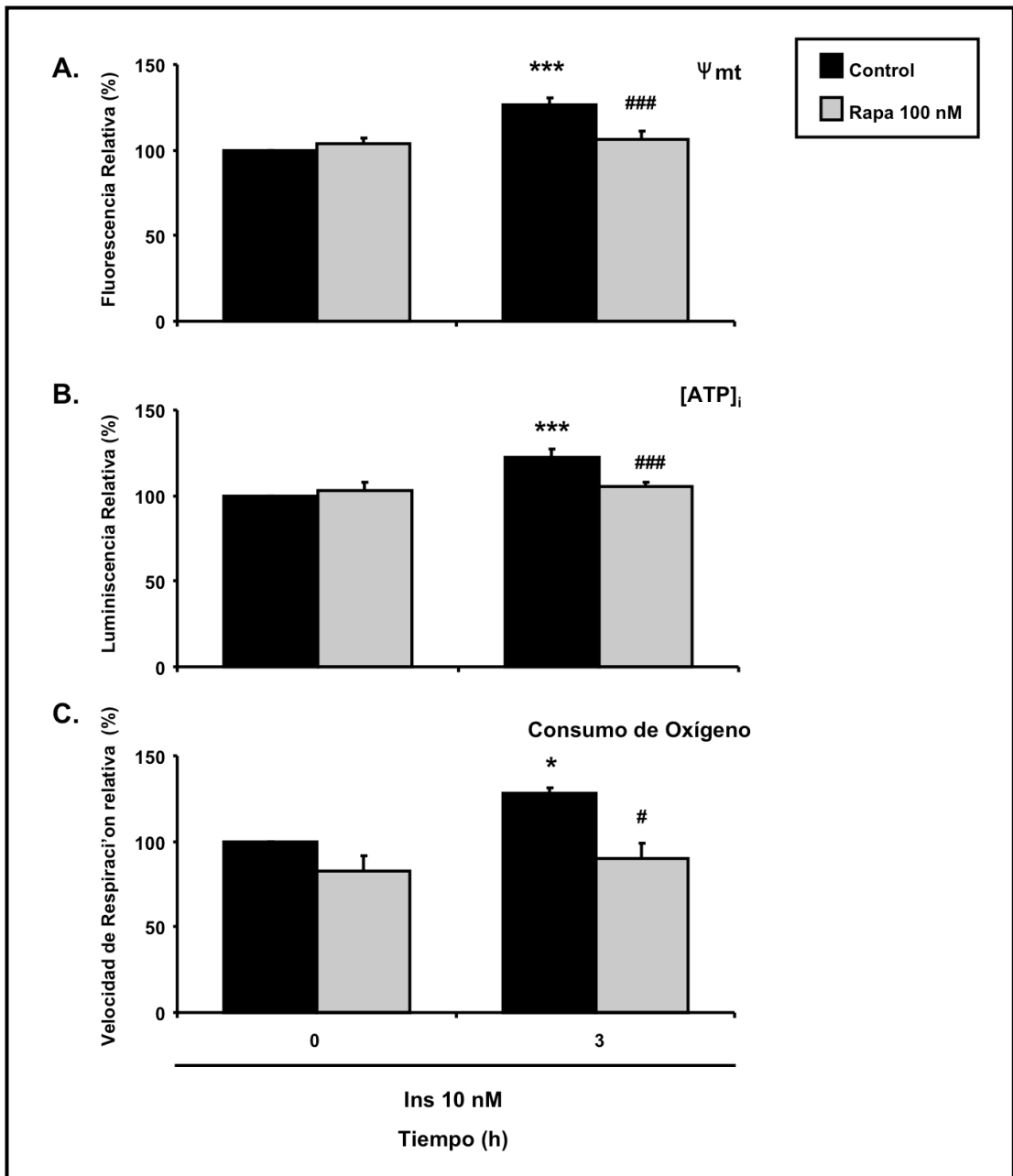
**Figura 33. Efecto de la inhibición de la entrada de glucosa a través de los transportadores GLUT-4 sobre la fusión mitocondrial inducida por insulina en el cardiomiocito.**

(A) Reconstrucción de la red mitocondrial de cultivos primarios de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM y Citocalasina B 10  $\mu$ M por los tiempos indicados. Las imágenes confocales se obtuvieron de células marcadas con Mitotracker Green. Escala: 10  $\mu$ m. (B) Cuantificación del volumen mitocondrial y del número de mitocondrias por célula (n=4 experimentos independientes), \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecto al control; #p<0,05; ###p<0,001 respecto a insulina 3 h y &p<0,05 respecto a Citocalasina 3 h.



**Figura 34. Efecto de la inhibición de Akt y mTORc1 sobre el incremento en los niveles de Opa-1 inducidos por insulina en el cardiomiocito.**

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con insulina (Ins) 10 nM, Akti 10  $\mu$ M y Rapa 100 nM por los tiempos indicados, para posteriormente preparar extractos de proteínas totales. Los niveles de Opa-1 y  $\beta$ -tubulina en estos extractos se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12% (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=3 experimentos independientes), \*\*p<0,05 respecto al control y #p<0,05 respecto al control con insulina 3 h.



**Figura 35. Efecto de la inhibición de mTORc1 sobre los incrementos metabólicos inducidos por insulina en el cardiomiocito.**

(A) El  $\Psi_{mt}$  se determinó en una población de cardiomiocitos tratados con insulina (Ins) 10 nM y Rapa 100 nM por los tiempos indicados, utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP (B) Las concentraciones intracelulares de ATP ( $[ATP]_i$ ) se midieron mediante ensayo de luminiscencia (C) La velocidad de consumo de oxígeno se midió en cardiomiocitos tratados con insulina 10 nM y Rapa 100 nM por los tiempos indicados mediante el uso de un electrodo de Clark (n=5 experimentos independientes), \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecto al control; # $p < 0,05$  y ### $p < 0,001$  respecto control insulina 3 h.

## 7. DISCUSIÓN

Las mitocondrias juegan un papel esencial en la mantención de la homeostasis de las células eucariontes, proveyendo de abundante energía generada a través de la fosforilación oxidativa. Además, son el compartimiento en donde tienen lugar numerosas reacciones esenciales en el metabolismo y juegan un papel clave en la muerte y envejecimiento celular (**Scheffler, 2001**). En el corazón, este papel energético cobra mayor relevancia dada la dependencia energética de ATP que tiene este órgano para mantener su actividad contráctil sistólica y diastólica. La hipótesis de que ciertas patologías cardíacas podrían estar ligadas a la incapacidad del corazón para alcanzar requerimientos energéticos mínimos tiene cierta lógica (**Ingwall and Weiss, 2004**), posicionando a la mitocondria como un organelo subcelular clave en su funcionamiento. El corazón está formado por varios tipos celulares, siendo los fibroblastos y cardiomiocitos los más importantes. Estas últimas células, terminalmente diferenciadas, cesan de proliferar poco después del nacimiento y son las unidades contráctiles funcionales del corazón. Esta restricción evolutiva del cardiomiocito para proliferar, hace a este órgano muy vulnerable a diferentes situaciones de estrés y a cualquier estímulo fisiopatológico capaz de causar la remodelación de sus organelos (**Chien et al., 1991**).

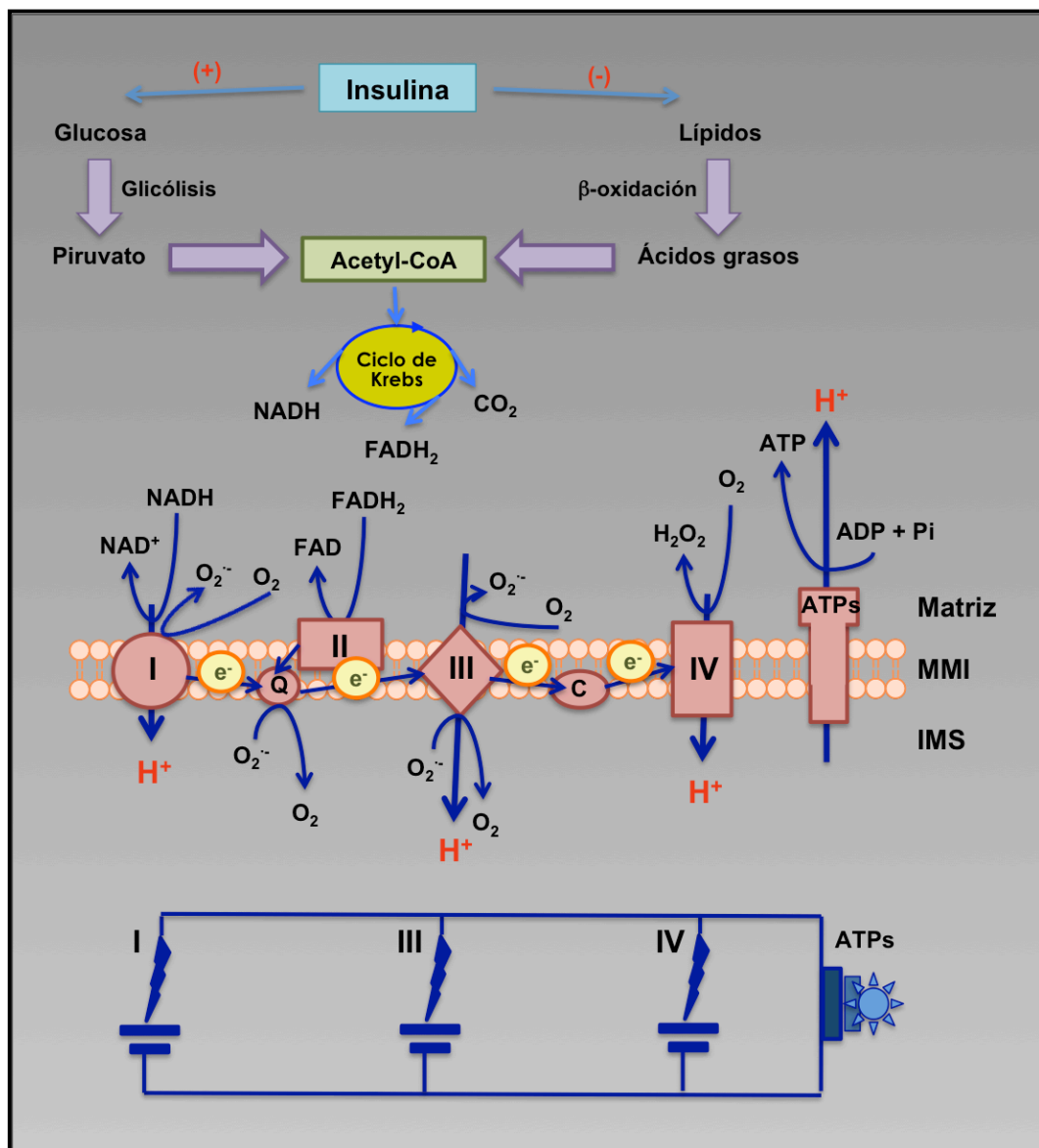
Actualmente, se desconoce la relación existente entre los procesos que controlan la dinámica mitocondrial y el estado metabólico de los cardiomiocitos, siendo fundamental entender esta relación en condiciones fisiológicas. Insulina es una hormona fundamental en el control del metabolismo cardíaco (**Brownsey y cols., 1997; Abel 2005**), sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la vinculación de esta hormona con procesos que controlen la morfología mitocondrial, pregunta fundamental dadas las publicaciones recientes que han descrito alteraciones en la expresión de las proteínas Mfn2 y Opa-1 en condiciones de resistencia a la insulina, diabetes y obesidad (**Civitarese y Ravussin, 2008**). Con esta finalidad, esta tesis tuvo por objetivo estudiar los cambios inducidos por insulina en diferentes parámetros del metabolismo energético y de la morfología mitocondrial en cardiomiocitos, así como la relación existente entre ambos procesos.

### 7.1. Función mitocondrial y su relación con insulina

La mitocondria, como principal organelo encargado del control del metabolismo celular, integra el catabolismo de lípidos y carbohidratos para la mantención de los niveles energéticos celulares en la forma de moléculas de ATP. Esto se logra gracias al acoplamiento de las reacciones que se llevan a cabo durante el ciclo de Krebs (o ciclo del ácido tricarboxílico, TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) **(Figura 36) (Wallace, 1999; Maechler y Wollheim, 2001; Cheng y cols., 2010)**. El Acetil-CoA generado a partir de la glicólisis y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, ingresa al ciclo TCA en la matriz mitocondrial, en donde es oxidado para formar  $\text{CO}_2$ , NADH y  $\text{FADH}_2$ . Los electrones de estos dos últimos complejos ingresan a los complejos I y II, respectivamente, para luego ser traspasados al complejo III y IV a través de la co-enzima ubiquinona (Q) y el citocromo C. En el complejo IV, el oxígeno molecular acepta estos electrones, formándose finalmente agua. Durante este proceso redox, los complejos I, III y IV, bombean protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando la gradiente electroquímica conocida como potencial de membrana mitocondrial, la cual es utilizada como fuerza motriz para el funcionamiento de la ATP sintasa y la generación final de ATP **(Cheng y cols., 2010; Brand y Nicholls, 2011)**. El potencial redox máximo a lo largo de toda la cadena transportadora de electrones es de alrededor de 1.100 mV, mientras que el máximo potencial de la membrana interna se encuentra en un rango que puede variar entre los 180 - 220 mV **(Brand y Nicholls, 2011)**.

La corriente protónica que atraviesa la membrana mitocondrial interna, es exactamente igual a la de los protones que reingresan al circuito bajo condiciones de equilibrio **(Brand y Nicholls, 2011)**. De esta manera, la ATP sintasa constituye el efector molecular predominante para el reingreso de los protones al sistema durante condiciones de activa producción de ATP, generándose así un circuito de cargas positivas a través de la membrana mitocondrial, la cual puede ser expresada en términos de potencial de membrana y del flujo de los protones mismos. Dado que éstos últimos, son utilizados por el complejo IV en la generación de agua a partir de oxígeno, el consumo de éste, es entonces, directamente proporcional al flujo protónico a través de la membrana. Con estos últimos conceptos, no es difícil imaginar que el funcionamiento de la mitocondria es análogo

al de un circuito eléctrico, cuya función puede ser caracterizada a través de la descripción de su voltaje o tensión eléctrica (potencial mitocondrial) y el flujo de cargas o corriente circulante (consumo de oxígeno) (Figura 36) (Brand y Nicholls, 2011).



**Figura 36. El circuito protónico a través de la membrana interna mitocondrial y su analogía con un circuito eléctrico.**

La mitocondria integra el el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en el ciclo de Krebs, el cual genera los sustratos reducidos **NADH** y **FADH<sub>2</sub>**. Estos últimos entregan electrones a los complejos de la cadena transportadora de electrones I y II, respectivamente, generándose el gradiente electroquímico ( $\Psi_{mt}$ ) necesaria para el funcionamiento de la **ATP sintasa (ATPs)**. En el análogo del circuito eléctrico el  $\Psi_{mt}$  corresponde a la tensión eléctrica o voltaje, mientras que el flujo de electrones corresponde a la corriente. **MMI**, membrana mitocondrial interna, **MME**, membrana mitocondrial externa (Adaptado de Cheng y cols; 2010 y Brand y Nicholls, 2011).

Insulina en su rol de hormona clave en el control del metabolismo celular, actúa principalmente, a través de la activación de su receptor de membrana (RI), causando la propagación de su señal por medio de dos importantes ramas de transducción: la cascada RI/PI3-K/Akt y la Grb-2/SOS/RAS (**Figura 1**). Ambas rutas, mantienen y controlan la función mitocondrial normal en células hepáticas, musculares y pancreáticas (**O`Neill y cols., 2007; Riehle y cols., 2008; Cheng y cols., 2009; Liu y cols., 2009**), aunque los actores moleculares directos de esta regulación permanecen elusivos. Interesantemente, la función mitocondrial se encuentra disminuída en condiciones de resistencia a la insulina (**Petersen y cols., 2004; Lowell y Shulman, 2005; Turner y Heilbronn, 2008**). De esta forma, el tejido muscular de pacientes con diabetes tipo 2, presenta menos mitocondrias que el de controles sanos de la misma edad (**Kelley y cols., 2002**), mientras que sujetos insulino resistentes, muestran una menor capacidad oxidativa en biopsias musculares y hepáticas (**Petersen y cols., 2004; Lowell y Shulman 2005**). Más aún, en células musculares obtenidas de sujetos diabéticos, la infusión con insulina no induce la expresión del RNAm de varias proteínas claves del metabolismo mitocondrial, al contrario de lo que ocurre en células obtenidas de pacientes sanos (**Stump y cols., 2003**).

Todos los antecedentes previamente descritos han llevado a la idea de que deficiencias en las vías de señalización activadas por insulina podrían alterar el funcionamiento mitocondrial. Así por ejemplo, en el músculo cardíaco, la activación de PI3-K aumenta la tasa de  $\beta$ -oxidación, mientras que su inhibición lleva a disfunción mitocondrial y a una menor capacidad de adaptación del tejido frente a estímulos hipertróficos (**O`Neill y cols, 2007**). Adicionalmente, ratones con deleciones cardíacas específicas de la proteínas IRS1, IRS2 o ambas, presentan una menor síntesis de ATP, consumo de oxígeno y una disminución en la expresión de los genes relacionados con OXPHOS (**O`Neill y cols, 2007**). Esto último revela la importancia de la ruta activada por insulina en el control de la función mitocondrial en el corazón y concuerda con nuestros propios resultados, en donde observamos que insulina estimula directamente la función de este organelo en cardiomiocitos, a través de un incremento en la fusión mitocondrial dependiente de la proteína Opa-1 (**Figuras 7, 19, 22 y 24**), siendo esto último demostrado por primera vez, en un modelo celular fisiológico. La pregunta de cómo el proceso de



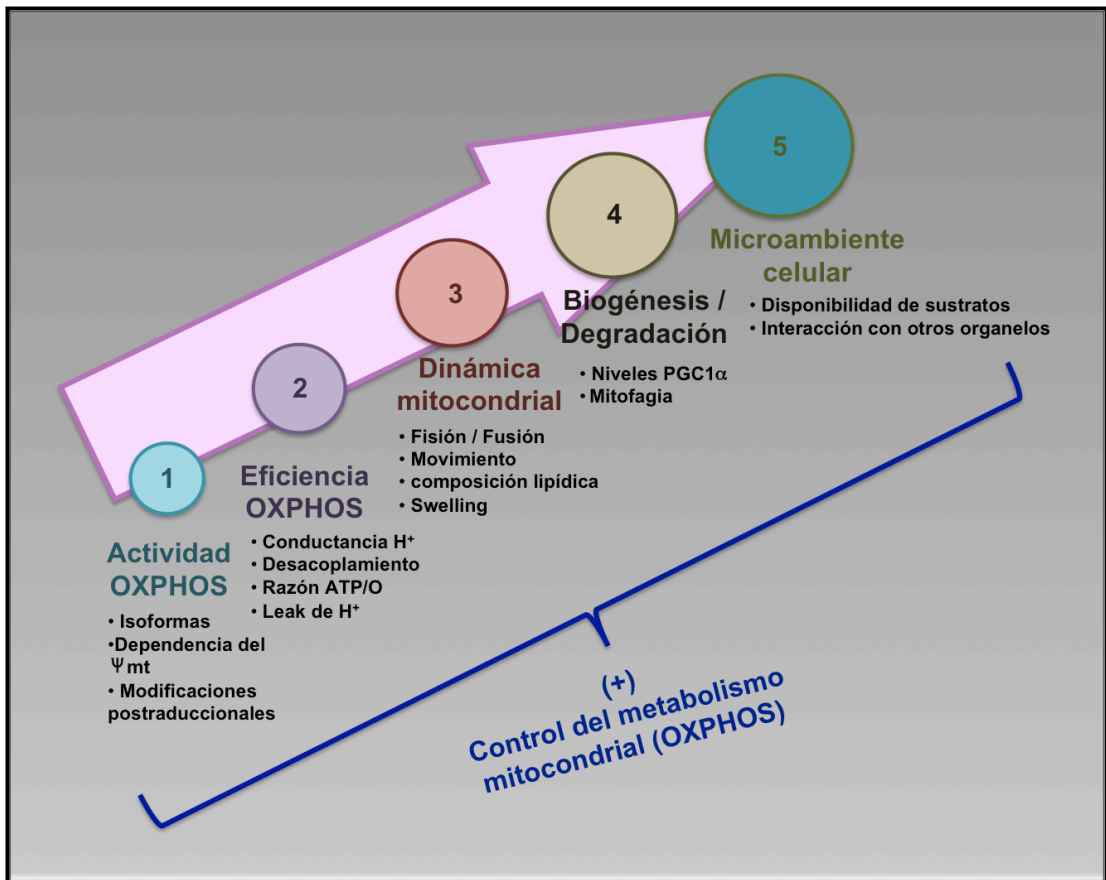
fusión mismo y/o el incremento de Opa-1, son capaces de afectar directamente el funcionamiento de la mitocondria serán entonces, los principales temas a discutir a continuación.

## **7.2. Morfología mitocondrial y su relación con el control del metabolismo en células cardiacas**

La capacidad de adaptación de las células eucariones frente a las necesidades ambientales y fisiológicas necesita estar acoplada al control de la demanda energética y de los diferentes sustratos metabólicos utilizados por la misma. De esta forma, en los últimos años ha surgido el concepto del remodelamiento subcelular el cual ha revelado que los diferentes componentes celulares experimentan cambios bioquímicos y moleculares durante la progresión de un gran número de enfermedades (**Dhalla y cols., 2009**). Esto último ha cobrado gran importancia, sobre todo en el estudio de la progresión de las enfermedades cardiacas, y principalmente, durante el desarrollo de cuadros como la hipertrofia y la insuficiencia (**Dhalla y cols., 2009**). Por citar un ejemplo, el remodelamiento del sarcolema conlleva a modificaciones importantes en la homeostasis y manejo del  $Ca^{+2}$ , así como de las señales activadas por éste como segundo mensajero, alterando la actividad de diferentes canales y receptores, mientras que el remodelamiento de la mitocondria directamente modifica el estado metabólico y redox de los cardiomiocitos (**Weisser-Thomas y cols., 2005; Ishikawa y cols., 2005; Tsutsui y cols., 2006**).

En tejidos con una alta tasa metabólica, el remodelamiento de la red mitocondrial afecta directamente el funcionamiento de la cadena respiratoria u OXPHOS, impactando profundamente el metabolismo celular (**Benard y cols., 2010**). Sin embargo, este remodelamiento no es el único nivel de regulación involucrado en el funcionamiento de la mitocondria. Así, diferentes tejidos presentan grandes diferencias tanto en la composición de la maquinaria de la OXPHOS, como en la organización de sus mitocondrias (**Benard y cols., 2006**), siendo estas diferencias un fiel reflejo de los requerimientos específicos de cada uno de ellos, su funcionalidad y el estado fisiológico en el que se encuentran. De forma consistente con estas ideas, actualmente se ha propuesto un modelo, en donde la producción de energía mitocondrial se encuentra regulada en al menos en 5 niveles diferentes, tal

como se observa en la **Figura 37: (1)** La actividad específica de los elementos de la cadena transportadora, la cual se controla por medio de la expresión diferencial de distintas isoformas de los complejos (**Capaldi y cols., 1986**), su modulación catalítica por cambios en el potencial eléctrico (**Dalmonte y cols., 2009**) o, por medio de modificaciones postraduccionales de los mismos (**Das y cols., 1998; Carroll y cols., 2005**). **(2)** La eficiencia intrínseca de OXPHOS, la cual puede ser regulada por medio de cambios en la conductancia basal o inducida de los protones (**Parker y cols., 2009**), por cambios en la razón ATP/O (**Gnaiger y cols., 2000**), por el desacoplamiento de OXPHOS y la ATP sintasa (ATPs) o, cambios en el denominado “leak” de protones (**Benard y cols., 2010**). **(3)** Por otro lado, la capacidad energética de la cadena transportadora, también puede depender del estado morfológico de la red mitocondrial, lo cual depende de los procesos que controlan la dinámica del organelo, en donde se incluyen la fusión y fisión (**Benard y cols., 2007**), el movimiento de las mitocondrias en el citoplasma (**Choi y cols., 2006; Furt y Moreau, 2009**), así como el cambio osmótico asociado al proceso de la apoptosis o “swelling” (**Hackenbrock, 1968**). Los niveles superiores de regulación, **4** y **5**, están determinados, principalmente, por la relación que establece la mitocondria con su entorno. Así, el nivel número **4**, depende de los procesos de biogénesis y degradación del organelo, mientras que el **5**, depende directamente de la biodisponibilidad de sustratos al interior de la célula, siendo esto último un fiel reflejo de las necesidades y contexto de la misma (**Benard y cols., 2010**).



**Figura 37. Niveles de regulación del metabolismo mitocondrial.**

La modulación de la actividad de la cadena transportadora de electrones u OXPHOS ocurre en al menos en 5 niveles diferentes, lo que permite la adaptación del funcionamiento mitocondrial a las diferentes demandas energéticas y disponibilidad celular de sustratos (Adaptado de Benard y cols., 2010).

El hecho de que tejidos que presentan una alta demanda energética (músculo esquelético y células cardíacas, por ejemplo), presentan una morfología mitocondrial característica, con mitocondrias fusionadas e interconectadas y crestas altamente empaquetadas, mientras que tejidos con una baja demanda, presentan mitocondrias más pequeñas y fisionadas (Duchen, 2004; Kodde y cols., 2007), hace que el estudio de la morfología mitocondrial y su impacto en el control del metabolismo celular sea de vital importancia en un modelo como el nuestro. Hasta la fecha, esta importante relación ha sido pobremente estudiada, posiblemente debido a la percepción de que ella no juega un papel importante dada la alta estructuración de la célula cardíaca, lo que de alguna forma limitaría la importancia de estos procesos (Hom y Sheu, 2009; Parra y cols., 2011). Interesantemente, el tejido cardíaco posee niveles de expresión elevados de las proteínas que gobiernan

la dinámica mitocondrial, en comparación con otros tejidos (**Imoto y cols., 1998; Bach y cols., 2003; Stojanovski y cols., 2004; Parra y cols., 2011**). Más aún, estados de hiper e hipofusión mitocondrial han sido descritos en asociación con varias patologías cardiacas importantes. Así, hace ya más de 40 años, Sun y cols., demostraron que la hipoxia desencadena la aparición de mitocondrias gigantes en corazones perfundidos (**Sun y cols., 1969**).

Recientemente se ha demostrado, en diferentes modelos, que la disminución en la expresión de Mfn2 se asocia a una reducción en la oxidación de sustratos (**Pich y cols., 2005**), respiración y potencial mitocondrial, hallazgos similares a los descritos para modelos con silenciamiento génico de Opa-1 (**Chen y cols., 2005**) y Drp-1 (**Benard y cols., 2007**). Estos hallazgos han sido parcialmente replicados en modelos animales y en muestras de miocardio de individuos con insuficiencia cardiaca (**Chen y cols., 2009**), observándose una significativa disminución en las proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial. En conjunto, estas evidencias sugieren que cualquier disrupción en este proceso, impacta negativamente en la función de este organelo (**Ong y cols., 2010**). Sin embargo, el papel fisiológico de la fusión misma, así como la implicancia directa de esta respuesta en diversos contextos celulares aún no ha sido dilucidado.

Nuestros resultados indican que en cardiomiocitos de rata neonata, insulina induce la fusión de la red mitocondrial, lo que se define por un aumento en el volumen mitocondrial promedio y disminución en el número de mitocondrias por célula (**Figura 7**). Este efecto no sería dependiente de procesos de biogénesis ni de degradación mitocondrial, como lo demuestran los experimentos destinados a evaluar el DNAmT y la masa mitocondrial (**Figura 15**). Adicionalmente, insulina incrementa el metabolismo celular, lo cual sería principalmente mediado por un aumento en la función de OXPHOS, lo que queda demostrado por los experimentos de consumo de oxígeno, en condiciones basales y desacopladas (**Figura 19**). Este último parámetro corresponde a una condición meramente experimental, pero que da cuenta de un estado de circuito “abierto”, sólo establecido mediante el uso del desacoplante CCCP (**Brand y Nicholls, 2011**). Interesantemente, bajo las condiciones respiratorias desacopladas, insulina tiene un efecto incluso mayor, lo cual es indicativo de una mayor capacidad respiratoria de la cadena transportadora

misma. Paralelamente en el modelo animal, el clamp hiperinsulinémico, también indujo un incremento en el consumo de oxígeno de fibras aisladas, siendo lo más relevante de este hallazgo, su concordancia con el resultado obtenido en células bajo las condiciones de desacoplamiento, ya que en el modelo animal, este aumento induce un incremento en la razón ATP/O (**Figura 27**), lo que es indicativo de una mayor eficiencia a nivel del metabolismo mitocondrial. De acuerdo a la literatura y a todos los antecedentes anteriormente presentados, no es sorprendente que insulina induzca estos incrementos metabólicos, sin embargo, sí lo es el hecho de que junto con el aumento de la eficiencia, este fenómeno sea dependiente del cambio morfológico mitocondrial, ya que la ausencia de cualquiera de las dos proteínas de la fusión, Opa-1 o Mfn2, impide este incremento (**Figuras 22 y 24**). La pregunta que surge entonces es cómo un aumento de la conectividad de la red, puede reflejarse en un incremento de la funcionalidad de OXPHOS, y el consecuente aumento en el contenido de ATP intracelular.

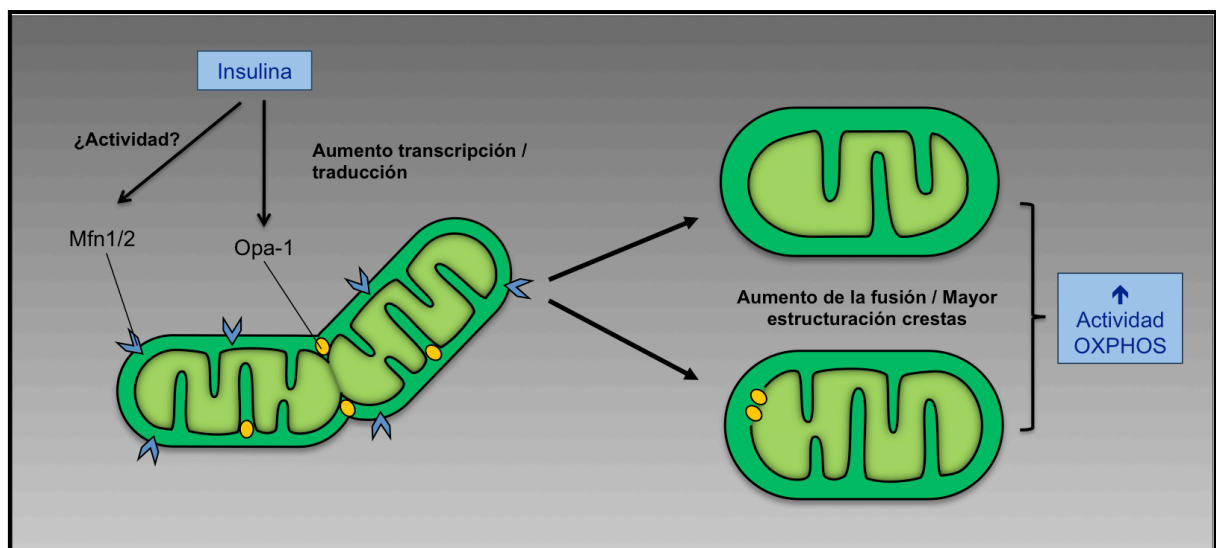
La primera explicación surge de la analogía que sugiere que las mitocondrias podrían funcionar como un arreglo de sistemas eléctricos. Mientras más elongado e interconectado se encuentre este sistema, más fácil es la difusión energética en forma de potencial y protones desde la periferia hacia el interior celular (**Skulachev, 2001**). De esta forma, se puede especular que la fusión mitocondrial inducida por insulina, puede aumentar la continuidad física de la matriz y de las membranas mitocondriales, con el consiguiente aumento en la propagación del potencial mitocondrial y un aumento en el espacio de difusión disponible para los sustratos metabólicos como el ADP y NADH, incrementando así, su capacidad de interacción potencial con los diferentes componentes de la cadena transportadora y promoviendo el aumento de la producción de ATP. Otra alternativa, es que los cambios morfológicos de la red, tengan algún impacto en la organización de los complejos respiratorios o respirasomas, causando la activación de cascadas de señalización aún no identificadas. Esta segunda alternativa, cobra una relevancia mayor, a la luz de la dependencia del incremento en los niveles de la proteína Opa-1 para el aumento metabólico inducido por insulina, tal como se discutirá más adelante (**Figuras 11 – 12 y 24**) (**Ver modelo en Figura 38**). En forma concordante con los resultados hasta acá discutidos, uno de los pocos trabajos que muestra un aumento de la fusión mitocondrial en condiciones de aumentos en la demanda

energética, describe un incremento en los niveles de Mfn2 durante el ejercicio y exposición al frío (**Tondera y cols., 2009**). Sin embargo, la disponibilidad de observaciones relacionadas con aumentos en la actividad de OXPHOS por aumentos en la fusión mitocondrial es limitada, mientras que la mayoría de los reportes han descrito deficiencias en la respiración mitocondrial en condiciones donde las células se tornan fusión-incompetentes (**Benard y cols., 2008**).

Por otro lado, Mfn2 ha sido recientemente descrita como un componente esencial de la interfase retículo - mitocondria, con un posible rol en la regulación de la recaptación del  $\text{Ca}^{+2}$  por parte de la mitocondria. Incrementos en el  $\text{Ca}^{+2}$  mitocondrial, pueden inducir la actividad de un amplio número de enzimas del ciclo de Krebs, participando directamente en la regulación del metabolismo, constituyendo así, una ruta alternativa de regulación, la cual no podemos descartar en nuestro modelo (**Figura 14**). A pesar de que nuestros resultados, no mostraron variaciones en los niveles de Mfn2, esto no indica la ausencia de cambios en la actividad de la proteína (**Ver modelo en Figura 38**), más aún cuando previamente, nuestro grupo ha descrito variaciones en los niveles del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico en cardiomiocitos tras la estimulación con insulina (**Contreras-Ferrat y cols., 2010**). Adicionalmente, y como podemos observar en la **Figura 8**, nuestros resultados muestran que junto a la fusión descrita en nuestro modelo, insulina también induce una redistribución de la red mitocondrial hacia la zona perinuclear, efecto similar al observado durante las primeras etapas del estrés de retículo, proceso que hemos descrito previamente como un fuerte inductor del metabolismo mitocondrial y dependiente del traspaso de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el retículo hacia la mitocondria, siendo esto último dependiente de la actividad de la proteína Mfn2 (**Bravo y cols., 2011**).

Otro resultado interesante relacionado con los cambios morfológicos es el obtenido en el experimento destinado a buscar el tiempo mínimo de estimulación con insulina que induce la fusión a las 3 h de tratamiento (30 min), tiempo que posteriormente se utilizó como límite para la remoción de la hormona y el estudio de los cambios morfológicos a tiempos más largos (**Figura 9**). Originalmente en la **Figura 7** se observó que la estimulación crónica con insulina durante 24 h, inducía fisión de la red mitocondrial a este tiempo, lo que podría estar relacionándose con procesos de desensibilización y resistencia a la hormona insulina a nivel de sus

vías de señalización, tal como se corroboró posteriormente con el ensayo de desensibilización de Akt frente a un segundo pulso de estimulación (**Figura 28**). Cuando insulina es removida del medio, no se observa la fisión de la red mitocondrial a las 24 h de tratamiento, lo que indica que efectivamente las señales que mediarían procesos de resistencia inducidos por la estimulación crónica con la hormona misma, también podrían estar regulando la fisión de la red, tal como se ha planteado originalmente. El conocimiento de la ventana temporal en que se inicia la reversión de la fusión y este proceso de fisión, nos permitirá en un futuro acercarnos a las señales moleculares y transduccionales involucradas en el cambio metabólico que se observa en ciertas condiciones patológicas, principalmente durante la resistencia a la insulina y durante el desarrollo de la diabetes tipo-2.



**Figura 38. Modelo para la regulación de la función mitocondrial a través de la modulación de las proteínas de la maquinaria de la fusión mitocondrial.**

Insulina produciría un aumento de la fusión mitocondrial, lo que se traduciría en un incremento de la actividad de la cadena transportadora u OXPHOS. Esto se lograría a través de un incremento en los niveles de la proteína Opa-1 o de la actividad de Mfn2. Para el primer caso, mayores cantidades de Opa-1, junto con aumentar la tasa de fusión mitocondrial neta, también causarían el remodelado de la estructura de las crestas mitocondriales, lo cual contribuiría al incremento de la función del organelo.

Hasta el momento se ha discutido unidireccionalmente, cómo los cambios en la morfología mitocondrial afectan la capacidad funcional del organelo frente a un estímulo, sin embargo, no se ha abordado la pregunta desde su perspectiva inversa, es decir, cómo los cambios funcionales de la mitocondria pueden verse directamente reflejados en un cambio morfológico. El problema que tenemos actualmente para resolver esta pregunta, es básicamente de carácter práctico. Hasta el momento no existen agentes moleculares o genéticos capaces de causar un cambio en la función de la mitocondria, sin afectar al mismo tiempo su morfología. Es así, como es posible observar cambios significativos en el grado de interconexión de la red mitocondrial, bajo condiciones que incrementan la actividad de OXPHOS, como la privación de glucosa (**Rosignol y cols., 2004**) o, bajo condiciones que disminuyen esta actividad, como las obtenidas tras el uso de inhibidores de los diferentes componentes de la cadena respiratoria (**Benard y cols., 2007**). Sin embargo, los mecanismos moleculares que dirigen estos cambios continúan siendo desconocidos. Una probable explicación para esta relación, surge de la evidencia de que las proteínas Drp-1, Mfn1/2 y Opa-1 dependen de los niveles celulares de GTP para llevar a cabo su actividad. Así, el trabajo reciente de Jezek y Plecita-Hlavata, propone la hipótesis de que la formación de GTP por el ciclo de Krebs, seguido de su traslocación a través del transportador ANT, podría estar modulando directamente el grado de fusión de la red mitocondrial (**Jezek y Plecita-Hlavata, 2009**). De esta misma forma, la conversión de ATP a GTP por las nucleósido difosfato kinasas (NDP kinasas) localizadas en la superficie de la mitocondria o en el espacio intermembranas, también podrían participar directamente del control de la dinámica mitocondrial (**Lacombe y cols., 2000; Milon y cols., 2000**). Aparte de esta posibilidad, el análisis de las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial, también ha entregado claves para entender el circuito de retroalimentación que vincula el control de la morfología y función de la mitocondria, siendo la proteína Opa-1 un importante blanco en esta regulación y sobre la cual se discutirá en la siguiente sección.

Otro aspecto interesante relacionado con los procesos de fusión mitocondrial es la ventaja que presentan dos mitocondrias fusionadas en relación a dos mitocondrias aisladas con igual radio, con respecto al espacio o volumen interno del



organelo disponible para la difusión de metabolitos y/o ión  $\text{Ca}^{+2}$ , así como el área de intercambio con el medio intracelular. Este hecho se hace más patente al imaginar a las mitocondrias como cuerpos esféricos o cilíndricos. En los primeros, el volumen corresponde a una función del cubo del radio ( $V = 4/3\pi r^3$ ), mientras que la superficie, a una función del cuadrado de éste ( $S = 4\pi r^2$ ). Así, el aumento del radio del organelo no es directamente proporcional al incremento del volumen, ni la superficie celular, por lo que en este caso dos mitocondrias fusionadas pueden ser más eficientes en cuanto a procesos de difusión e intercambio a lo largo de la red. Un ejemplo fácil de entender, es imaginar a dos mitocondrias individuales con un radio hipotético de  $2 \mu\text{m}$  cada una, lo que da cuenta de un volumen total de  $33,5 \mu\text{m}^3$  y un área de  $50,2 \mu\text{m}^2$ . Si estas dos mitocondrias se fusionan aumentando el radio del nuevo cuerpo al doble ( $4 \mu\text{m}$ ), éste cuerpo poseerá ahora un volumen total de  $267,9 \mu\text{m}^3$  y un área de  $200,9 \mu\text{m}^2$ , con una relación de difusión e intercambio superficie/volumen más ventajosa que los dos cuerpos mitocondriales iniciales individuales.

### 7.3. Opa-1 y control metabólico

A la luz de los resultados en los que observamos un importante incremento en los niveles de la proteína Opa-1 (**Figura 12**), cobra relevancia la explicación que describe que la fusión mitocondrial podría causar un aumento en la función mitocondrial por medio de la alteración de la estructura de los respirasomas. Opa-1, a pesar de su localización en la MMI, participa en el control de los procesos de fusión de ambas membranas, dada su capacidad de interacción con proteínas de la MME, principalmente con las Mfn's (**Sesaki y cols., 2003, Cipolat y cols., 2004**), tal como lo observamos también nosotros con el estudio de la colocalización de las proteínas (**Figura 11**). Adicional a esta función, también se ha descrito que Opa-1 controla la estructura de las crestas de la MMI y la liberación del citocromo C durante la apoptosis (**Olichon y cols., 2003; Griparic y cols., 2004; Freezza y cols., 2006; Meeusen y cols., 2006**). Sin embargo, y a pesar de estos antecedentes, la información centrada en el rol fisiológico de esta proteína es escasa, debido en gran parte, a que los ratones con mutaciones homocigotas para esta proteína mueren en el estado embrionario. Recientemente, Zhang y cols. describieron que ratones KO condicionales adultos y generados con el sistema Cre-loxP, desarrollan una condición hiperglicémica debido a defectos en el complejo IV

de la cadena transportadora de electrones, lo que refuerza la importancia de Opa-1 en el control del metabolismo, pero que nuevamente corresponde a un modelo que se centra en la carencia de la proteína y que aún no da ninguna respuesta acerca de su regulación y funcionamiento en un modelo fisiológico **(Zhang y cols., 2011)**.

Con respecto a la participación de Opa-1 en la estructuración de las crestas, ésta ha sido descrita principalmente en trabajos centrados en procesos de muerte celular **(Olichon y cols., 2003; Freezza y cols., 2006; Meeusen y cols., 2006)**. Asimismo, también se ha descrito su alta regulación en estados en donde se observa una caída en el potencial mitocondrial, siendo proteolizada por la proteasa OMA-1 **(Ehse y cols., 2009; Head y cols., 2009; McBride y Soubanier, 2009)**. Esta cuidada regulación estaría dada gracias a su localización en dominios altamente estructurados de la MMI, los cuales estarían determinados por anillos formados por las proteínas prohibitinas, las cuales en condiciones fisiológicas, también participarían de la estructuración de las crestas **(Merkwirth y Langer, 2009; Osman y cols., 2009)**. Cuando se produce una caída del potencial mitocondrial, estos dominios perderían su estructura, permitiendo el acceso de OMA-1 a Opa-1, causando así, su proteólisis **(McBride y Soubanier, 2009)**. De esta forma, cambios en los niveles de la proteína podrían estar influyendo directamente en la estructura de las crestas mitocondriales, en nuestro caso haciéndolas más eficientes, quizás por una mayor capacidad de ensamblaje de los complejos mitocondriales o respirasomas, o, si volvemos al modelo de las mitocondrias como circuitos eléctricos, alterando directamente la resistencia que ofrecen las membranas a la difusión del potencial y de los protones, aumentando así su capacidad energética. En relación a lo primero, y a la luz del resultado obtenido mediante microscopía electrónica **(Figura 10)**, parece ser que efectivamente la estimulación de cardiomiocitos con insulina aumenta el grado de estructuración de las crestas, las cuales se ven más compactas y electrodensas, lo cual podría estar en relación directa con el aumento de la tasa metabólica celular y el incremento de los niveles de la proteína Opa-1 **(Figuras 12, 13 y 19)**. Sin embargo, si los incrementos de esta última afectan directamente el grado de compactación de las crestas, es algo que aún queda por ser establecido. Experimentos a futuro deberán centrarse en aclarar el rol de Opa-1 en la organización de la MMI y como esto afecta directamente el funcionamiento de la

mitocondria. Más aún, la información disponible hasta el momento acerca de la regulación de Opa-1 es escasa, careciéndose de información que indique qué factores de transcripción pueden estar involucrados en su regulación, así como cuáles otras modificaciones postraduccionales pueden afectar su funcionamiento, aparte del ya mencionado proceso de proteólisis. Con respecto a esto último, y nuevamente en relación con el control del metabolismo en modelos patológicos, Makino y cols. recientemente describieron la glicosilación de la proteína Opa-1 en un modelo de hiperglicemia en cardiomiocitos, proceso que se relacionaría con una menor capacidad funcional de la mitocondria (**Makino y cols., 2011**).

#### **7.4. Akt, mitocondria y mTOR**

La activación del receptor de insulina, tal como se ha descrito anteriormente, lleva a la activación de la proteína Akt. Esta proteína, para la cual actualmente hay descritas 3 isoformas, puede fosforilar un gran número de sustratos relevantes para la vía de señalización activada por la hormona, entre ellos: GSK3 $\alpha/\beta$  (que bloquea la inhibición de la síntesis de glicógeno y que además concuerda con los resultados presentados en la **Figura 20**), AS160 (que promueve la translocación de los transportadores GLUT-4), el complejo BAD-BCL2 (el cual inhibe la apoptosis) y el complejo proteico mTORc1, el cual se discutirá en profundidad más adelante. Interesantemente y como se mencionó previamente, de las tres isoformas de la proteína Akt, sólo Akt2 se encuentra relacionada con el control del metabolismo (**Cheng y cols., 2010**). Más aún, estudios recientes en los cuales se ha caracterizado la distribución subcelular de las diferentes isoformas de la proteína, han mostrado que Akt2 se localiza casi exclusivamente en la superficie de la mitocondria, lo cual además refuerza la idea de que esta isoforma es la que se encuentra más implicada en el control del metabolismo celular, así como en la protección de la apoptosis por su interacción con proteínas como hexokinasa y el complejo BAD-BCL2 (**Miyamoto y cols., 2009; Santi y Lee, 2010**).

Uno de los principales efectores río abajo de Akt es el complejo mTORc1, el cual integra la disponibilidad de nutrientes y la regulación metabólica ejercida por distintas hormonas y factores de crecimiento. La activación de este complejo se logra a través de la inhibición mediada por Akt de la GTPasa TSC2, lo cual inactiva RHEB (**Huang y Manning, 2008, Cheng y cols., 2010**). Akt fosforila TSC2

inhibiendo su actividad GTPásica, lo cual permite la acumulación de RHEB en su forma unida a GTP, lo que finalmente lleva a la activación de mTORc1. Por otro lado, el complejo mTOR también forma un segundo complejo, mTORc2, el cual se encuentra principalmente vinculado con la regulación y control de la organización del citoesqueleto de actina y cuyo principal blanco conocido, es la proteína Akt. Hasta el momento, este segundo complejo, no ha sido vinculado directamente con el control metabólico, pero sí se sabe que la completa activación de Akt requiere de su fosforilación por este complejo, el cual al parecer participa en la estabilización de kinasas recientemente sintetizadas (**Foster y Fingar, 2010**).

Los resultados presentados en esta tesis concuerdan con los antecedentes expuestos de la regulación de la vía de Akt y mTORc1, y el control del metabolismo (**Figuras 28, 29, 32, 35**). De acuerdo a nuestros resultados creemos que la principal isoforma de Akt implicada en nuestro modelo correspondería a la segunda, dados sus efectos directos a nivel del control de metabolismo. Sin embargo, esta afirmación requiere ser estudiada con mayor profundidad, así como también la participación del complejo mTORc1 río abajo de Akt2. Aunque esta vía transduccional ha sido previamente descrita en el cardiomiocito (**Sharma y cols., 2007**), no se descarta la participación directa de Akt en la regulación del funcionamiento de la mitocondria, en forma paralela a las acciones sobre el complejo mTORc1. Estudios recientes han mostrado la presencia de Akt2 en la mitocondria, así como también su interacción con las proteínas prohibitinas, las cuales participan en la estructuración de las crestas de la MMI (**Sun y cols., 2004; Héron-Milhave y cols., 2008; Santi y Lee, 2010**) (Ver modelo en Figura 39).

#### **7.5. mTOR y su rol como regulador de la función y morfología mitocondrial**

En mamíferos, el complejo proteico mTOR es un importante efector río abajo de la ruta de señalización iniciada por la hormona insulina, capaz de activar la maquinaria de traducción proteica en la célula (**Moule y Denton, 1997; Proud, 2004; Sharma y cols., 2007; Foster y Fingar 2010**). Específicamente, los efectos relacionados con el crecimiento celular son mediados por las proteínas p70S6K y el factor de elongación 4EBP1 (**Proud, 2004; Foster y Fingar, 2010**), mientras que los efectos metabólicos del complejo, parecen ser independientes de estos efectores (**Foster y Fingar, 2010**). En cardiomiocitos, mTOR es adicionalmente, un

importante regulador del proceso hipertrófico. Así, la inhibición de este complejo, atenúa este proceso, mientras que la sobreexpresión continua de Akt, culmina con la hipertrofia de la célula cardíaca (**Shioi y cols., 2002; Shioi y cols., 2003**).

Tal como se mencionó previamente, el complejo mTOR existe en 2 formas distintas: El complejo sensible a nutrientes y energía e inhibible por rapamicina, mTORc1 y el complejo sensible a mitógenos, no inhibible por rapamicina mTORc2 (**Foster y Fingar, 2010**). Estudios recientes han mostrado que en relación con el control del metabolismo, la inhibición de mTORc1 mediante rapamicina o silenciamiento por RNA lleva a una disminución de la respiración celular basal y desacoplada (**Schieke y cols., 2006**), y de la biogénesis mitocondrial mediante la inactivación del complejo transcripcional YY1-PGC1 $\alpha$  (**Cunningham y cols., 2007**). Por otro lado, la inhibición de mTORc1 por rapamicina evoca cambios rápidos en el proteoma mitocondrial que, como ya se mencionó, al parecer no dependen de la activación de algunos de sus blancos canónicos, como p70S6K (**Schieke y cols., 2006; Ramanathan y Schreiber, 2009**). Estos efectos rápidos de mTORc1 han sido recientemente descritos y hasta el momento sólo se ha discutido la probable capacidad del complejo de interactuar directamente con proteínas mitocondriales, permitiendo así la regulación rápida del metabolismo celular en respuesta a variaciones en la disponibilidad de nutrientes y de los diferentes requerimientos energéticos celulares.

Nuestros resultados indican que la fusión mitocondrial observada en los cardiomiocitos e inducida por insulina es dependiente de la activación de la vía canónica mediada por esta hormona y del efector proteico río abajo mTORc1 (**Figuras 30 – 32**), siendo para nuestro conocimiento, la primera vez que se establece una relación causal entre el control morfológico mitocondrial y esta ruta. Como hemos mencionado previamente, estudios recientes ya habían establecido la capacidad de este complejo de regular el metabolismo mitocondrial, sin embargo, no existían trabajos previos que relacionaran la actividad de mTORc1 con la morfología del organelo, menos aún con la regulación directa de los niveles proteicos de la proteína Opa-1 (**Figura 34**). Interesantemente, en nuestro modelo el proceso de fusión inducido por insulina requiere en parte, del ingreso de glucosa a las células (**Figura 33**), lo cual concuerda con los reportes previos y realizados en

cardiomiocitos, en donde se había demostrado esta necesidad para lograr la completa activación de mTORc1 y sus efectos en éstas células (**Sharma y cols., 2007**).

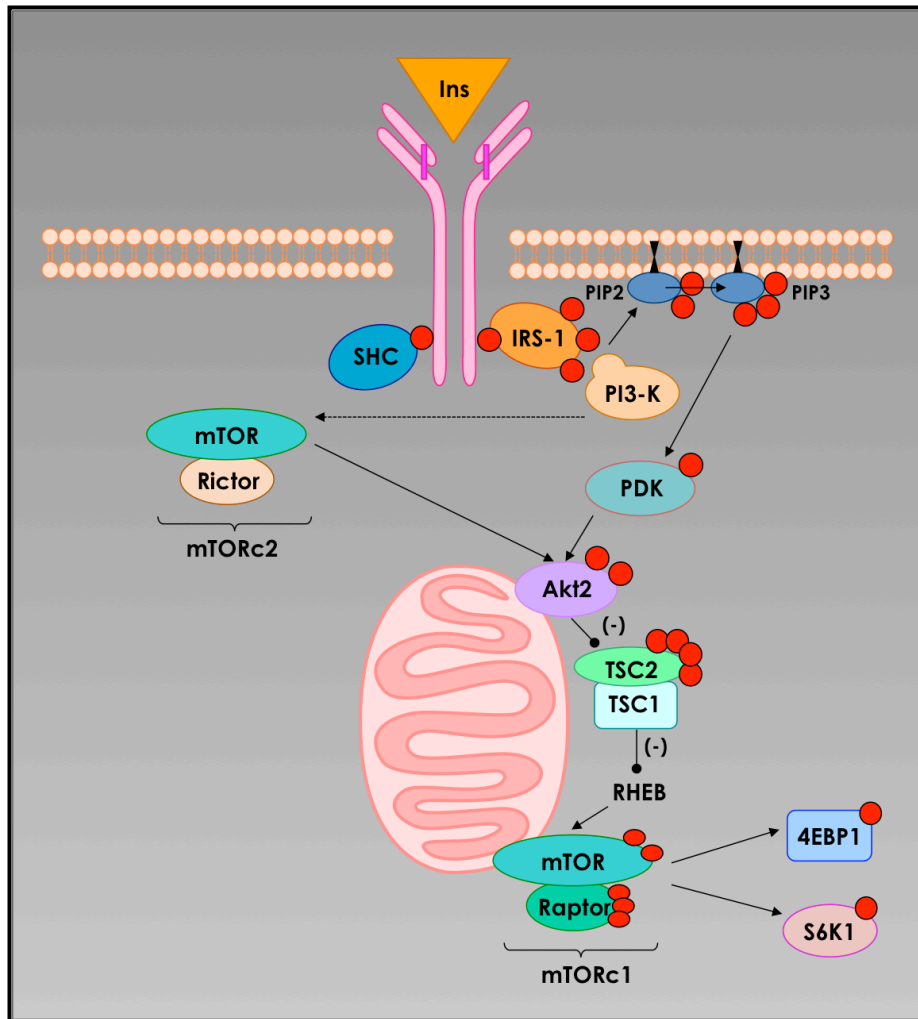
Adicionalmente, nuestros resultados también muestran aumentos evidentes de la proteína Opa-1, a partir de las 0,5 h, efecto rápido, que ya ha sido descrito para otras proteínas cuyos niveles están bajo el control del complejo mTOR (**Fernández y cols., 2007**). Más aún, este incremento proteico, se acompañó de un incremento en los niveles de su mensajero, efecto evidente a las 3 h de incubación con insulina (**Figura 16**). Estos datos preliminares requieren aún de una mayor confirmación, pero concuerdan con la inhibición del efecto sobre la fusión mitocondrial y el incremento de Opa-1 que se logra tras la previa incubación de las células con actinomicina y cicloheximida (**Figuras 17 - 18**). Todo lo cual indica, que insulina induce un aumento rápido de la fusión, efecto que cursa con incrementos en Opa-1 los cuales a su vez, son dependientes de la activación de mTORc1. Hasta el momento, se ha señalado que los efectos metabólicos mitocondriales ejercidos por este complejo, son independientes de su efecto sobre p70S6K y la activación de la traducción a través de esta proteína (efecto que no fue estudiado en nuestro sistema), pero que sí sería dependiente de la interacción directa con proteínas mitocondriales (**Schieke y cols., 2006; Ramanathan y Schreiber, 2009**). Sin embargo, y como discutiremos a continuación, la regulación de Opa-1 a través de mTORc1 nos hace diferir, al menos en parte, con esta afirmación.

Los datos obtenidos muestran que junto con el incremento de los niveles de Opa-1, se produce un aumento en su mensajero. Sorprendentemente, los efectos de cicloheximida y actinomicina difieren en cuanto al tamaño de su efecto (**Figura 17**), siendo mayor, el que se logra con cicloheximida. De esta forma, el experimento con cicloheximida sobre los niveles de Opa-1 (**Figura 18**), indica una vida media menor a las 3 h para la proteína total, resultado que difiere a lo descrito inicialmente por Guillery y cols., quienes reportaron una vida media larga de al menos, 16 h (**Guillery y cols., 2008**). Estos resultados podrían indicar que la traducción del mensajero de Opa-1 tiene un mayor efecto que la transcripción misma, lo cual en nuestro caso particular, concordaría con los efectos descritos para mTORc1 sobre la regulación del proceso de traducción a través de p70S6K y 4EBP1. Como el

primero ha sido descartado como mediador de los efectos metabólicos mitocondriales (**Schieke y cols., 2006**), experimentos a futuro deberán corroborar esta información en nuestro modelo, así como establecer la importancia de la ruta regulada por 4EBP1 (**Ver modelo en Figura 39**).

4EBP1 es una proteína reguladora que tras ser fosforilada por mTORc1 libera al factor de iniciación de la traducción eIF4E. eIF4E queda libre para formar complejos con otros factores de iniciación y la subunidad ribosomal 40S para iniciar la traducción proteica (**Proud, 2004; Foster y Fingar, 2010**). Mientras que la inhibición de mTORc1 con rapamicina, bloquea completamente la fosforilación de p70S6K, sólo reduce parcialmente la fosforilación de 4EBP1 en algunos tipos celulares (**Foster y Fingar, 2010**). Si esta afirmación es correcta, es probable que las diferencias descritas para los efectos de mTORc1 sobre el control del metabolismo mitocondrial se deban a esta diferencia. Surge a futuro entonces, la necesidad de esclarecer la participación de esta ruta en los aumentos de los niveles de Opa-1 y la posterior fusión mitocondrial, así como la directa regulación de la traducción de esta proteína, por mediadores aún no descritos para mTORc1, el cual interesantemente también ha sido descrito como capaz de interactuar directamente con la superficie mitocondrial (**Ramanathan y Schreiber, 2009**).

Finalmente, es interesante el hecho de que el estudio de los blancos de mTOR sea actualmente un área de activo estudio y que a pesar de esto, el completo entendimiento de su función está lejos de ser comprendida. Esto se debe en gran medida, a que el inhibidor clásico de este complejo, rapamicina, no inhibe todas sus funciones. Dos trabajos recientes se han avocado a la búsqueda de nuevos blancos de este complejo mediante estrategias de fosfoproteómica (**Hsu y cols., 2011; Yu y cols., 2011**), todo lo cual nos ayudará en un futuro a la comprensión de la regulación metabólica ejercida por este complejo, así como al de las proteínas implicadas en ello, tal como es el caso de Opa-1.



**Figura 39. Regulación de las vías de señalización de Akt2 y mTOR.**

Insulina induce la activación de la ruta RI/PI3-K/Akt, produciendo la inactivación del complejo TSC2. Esto último, causa la acumulación de RHEB en su forma unida a GTP, produciéndose la activación del complejo mTORc1. La señalización de la ruta PI3-K también causa la activación del complejo mTORc2 a través de una ruta aún desconocida (Adaptado de Cheng y cols, 2010 y Foster y Fingar, 2010).

### 7.5. Modelo final y proyecciones

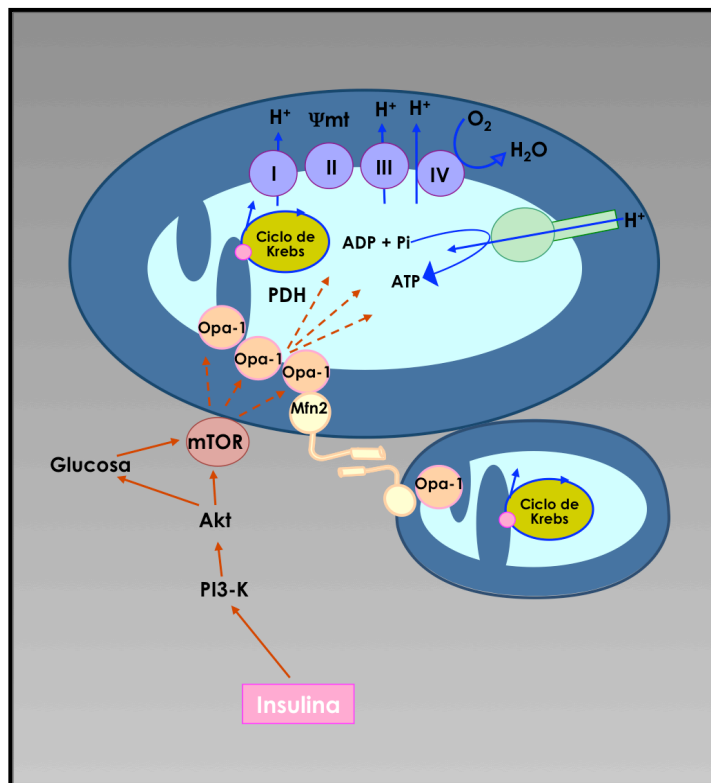
Este es el primer estudio conocido que investiga la participación de la maquinaria de la fusión mitocondrial en el cardiomiocito de rata y su relación con el control del metabolismo. Los datos presentados en este trabajo indican que insulina induce un aumento en la fusión de mitocondrial, la cual es necesaria para el incremento en el metabolismo mitocondrial inducido por la hormona. Estos procesos son acompañados con un incremento en los niveles de la proteína Opa-1, todo lo cual es a su vez dependiente de la activación del complejo mTOR (**Ver modelo en Figura 40**).



Estos resultados, siendo en su mayoría descriptivos, tienen el mérito de abrir nuevas líneas investigación en la regulación de la dinámica mitocondrial y su relación con el metabolismo celular, siendo uno de los pocos estudios, a la fecha, que muestra un aumento de la fusión mitocondrial en una condición que desencadena una mayor demanda energética a nivel celular. Experimentos a futuro, como el estudio de estos procesos en cardiomiocitos adultos o el estudio de la fusión misma en un modelo animal, ayudarán a determinar el papel de la fusión como un determinante importante para el control del metabolismo, así como el rol de Opa-1 en esta respuesta, ya sea en modelos fisiológicos o patológicos.

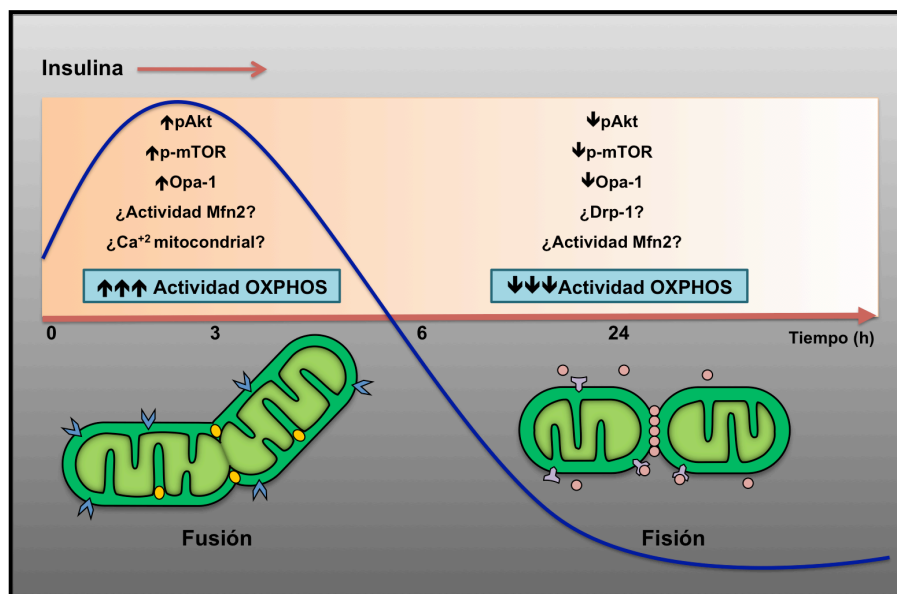
Claramente, también se requieren nuevos estudios destinados a resolver cómo mTORc1 regula los niveles proteicos de Opa-1 y la función mitocondrial, lo cual es actualmente materia de debate. Quedando aún por descifrar, si esta regulación es a través de una interacción directa del complejo con Opa-1 y/o la superficie mitocondrial, o a través de la mediación por alguno de sus efectores conocidos o aún por describir.

Finalmente, resta aún también por conocer, si los procesos descritos hasta el momento, se encuentran alterados en modelos de cardiomiopatía diabética, siendo la respuesta a esta pregunta una de las mayores proyecciones a futuro de este trabajo. En concordancia con esto último, llama la atención el hecho de que a los tiempos largos de estimulación con insulina (24 h) se observe fisión de la red mitocondrial, lo cual de acuerdo a los resultados del estado de fosforilación y desensibilización de Akt, correlacionan con un estado similar al de la resistencia a insulina, en este caso inducida por la misma hormona. Si esto constituye una verdadera relación causa-efecto, podríamos estar frente a nuevos procesos que explicarían en parte, el cambio metabólico que se observa durante cuadros de resistencia, ayudando así, a la búsqueda de nuevas señales y efectores moleculares alterados en estos procesos (**Ver modelo en Figura 41**).



**Figura 40. Modelo final: regulación de la morfología y función mitocondrial por insulina en el cardiomiocito**

Insulina induce un aumento de la función mitocondrial a través de un incremento del metabolismo mitocondrial, lo cual sería mediado por la actividad de OXPHOS y acompañado de un incremento de Opa-1. Finalmente, todos estos procesos, la fusión y actividad mitocondrial, así como el incremento proteico de Opa-1, son dependientes de la ruta canónica activada por insulina R/PI3-K/Akt, y del complejo proteico mTORc1.



**Figura 41. Modelo temporal**

Modelo de los procesos y señales inducidos por insulina y su relación con la actividad mitocondrial en el cardiomiocito.

## 8. CONCLUSIONES

1. Insulina estimuló el proceso de fusión mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos en una ventana temporal de 3 h, requiriendo de un tiempo crítico de 30 min. Este proceso celular se caracterizó por un aumento en el volumen mitocondrial promedio, una disminución del número de mitocondrias por célula y por ser inducido en un alto porcentaje de la población celular a concentraciones fisiológicas de la hormona, además de revertir a las 6 h de tratamiento. Sin embargo, la exposición prolongada a insulina produjo fisión de la red mitocondrial, la que concordó temporalmente con la desensibilización del sistema transduccional del receptor de insulina, evaluado como los niveles de la fosforilación de Akt,
2. Los efectos de insulina en la estructura de la red mitocondrial descritos anteriormente, correlacionaron con un incremento en el metabolismo energético global, principalmente a nivel de la actividad de OXPHOS.
3. Paralelamente, los estudios de insulina a nivel de la maquinaria de la fusión mitocondrial en el cardiomiocito, mostraron que esta hormona reguló selectivamente la expresión de la proteína de la membrana mitocondrial interna Opa-1, observándose aumentos tempranos (30 min) en sus niveles de mRNA y en las formas cortas y largas de la proteína. Todo estos efectos se previnieron al utilizar inhibidores de la transcripción génica y traducción proteica. Por otra parte, los niveles de la proteína de la membrana externa mitocondrial Mfn2 no se modificaron por acción de la hormona.
4. Puesto que la intervención genética de las proteínas Opa-1 y Mfn2 que controlan la fusión mitocondrial previno la respuesta metabólica a insulina, concluimos la existencia de una relación de causalidad en el control de la morfología y metabolismo energético mitocondrial mediado por la hormona.
5. La elevación de los niveles de insulina en ratones mediante un clamp hiperinsulinémico-euglicémico por 2 h, también aumentó los niveles de Opa-1 y

el metabolismo energético en fibras cardíacas aisladas. Insulina aumentó significativamente la razón ATP/oxígeno en este modelo, lo que sugiere que esta hormona incrementa la eficiencia metabólica mitocondrial, lo cual podría estar relacionado con una mayor conectividad de la red del organelo y con el incremento de los niveles de Opa-1.

6. Todas estas acciones de insulina sobre la morfología y función mitocondrial en el cardiomiocito dependen de la vía transduccional canónica del receptor de insulina, siendo mediadas principalmente por Akt y el complejo mTORc1.
7. Todos estos novedosos resultados indican que insulina regula el metabolismo energético del cardiomiocito a través de un mecanismo dependiente de procesos de fusión mitocondrial, constituyendo este trabajo el primero en mostrar tal relación, su dependencia de Opa-1 y de la vía transduccional Akt-complejo mTORc1.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Abel ED. Glucose transport in the heart. *Front Biosci.* 9:201-215, 2004.

Abel ED. Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 5:219-26, 2005.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . *Curr Biol.* 7:261-269, 1997.

Araya-Maturana R, Cardona W, Cassels BK, Delgado-Castro T, Ferreira J, Miranda D, Pavani M, Pessoa-Mahana H, Soto-Delgado J, Weiss-López B. Effects of 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorg Med Chem.* 14:4664-4669, 2006.

Araya-Maturana R, Delgado-Castro T, Gárate M, Ferreira J, Pavani M, Pessoa-Mahana H, Cassels BK. Effects of 4,4-dimethyl-5,8-dihydroxynaphtalene-1-one and 4,4-dimethyl-5,8-dihydroxytetralone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorg Med Chem.* 10:3057-3060, 2002.

Arnoult D. Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 17:6-12, 2007.

Arselin G, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brethes D, Velours J. The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP synthase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem.* 279:40392-40399, 2004.

Baandrup U, Florio R, Roters F, Olsen E. Electron microscopic investigation of endomyocardial biopsy samples in hypertrophy and cardiomyopathy. A semiquantitative study in 48 patients. *Circulation.* 63:1289-1298, 1981.

Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacín M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, Zorzano A. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes.* 54:2685-2693, 2005.

Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Dugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem.* 278:17190-17197, 2003.

Bae SS, Cho H, Mu J, Birnbaum MJ. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J Biol Chem.* 278:49530-49536, 2003.

- Banting FG, Best CH. The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med.* 7:251-266, 1922.
- Bao YC, Tsuruga H, Hirai M, Yasuda K, Yokoi N, Kitamura T, Kumagai H. Identification of a human cDNA sequence which encodes a novel membrane-associated protein containing a zinc metalloprotease motif. *DNA Res.* 10:123-128, 2003.
- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci.* 120:838-848, 2007.
- Benard G, Bellance N, Jose C, Melser S, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim Biophys Acta.* 1797:698-709, 2010.
- Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Delage JP, Casteilla L, Letellier T, Rossignol R. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol.* 291:C1172-1182, 2006.
- Benard G, Rossignol R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal.* 10:1313-1342, 2008.
- Bessman S, Geiger P. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science.* 211:448-452, 1981.
- Bijur GN, Jope RS. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem.* 87:1427-1435, 2003a.
- Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport.* 14:2415-2419, 2003b.
- Bittl J, Ingwall J. Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A <sup>31</sup>P NMR magnetization transfer study. *J Biol Chem.* 260:3512-3517, 1985.
- Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 435:297-312, 2011.
- Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, Quiroga C, Rodriguez AE, Verdejo HE, Ferreira J, Iglewski M, Chiong M, Simmen T, Zorzano A, Hill JA, Rothermel BA, Szabadkai G, Lavandero S. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci.* 124:2143-2152, 2011.
- Brownsey RW, Boone AN, Allard MF. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res.* 34:3-24, 1997.

- Bornhovd C, Vogel F, Neupert W, Reichert AS. Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes. **J Biol Chem.** 281:13990-13998, 2006.
- Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. **Curr Opin Cell Biol.** 15:706-716, 2003.
- Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. **Circulation.** 112:2686-2695, 2005.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science.** 296:1655-1657, 2002.
- Capaldi RA, Halphen DG, Zhang YZ, Yanamura W. Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain. **J Bioenerg Biomembr.** 20:291-311, 1988.
- Cadenas S, Echtay KS, Harper JA, Jekabsons MB, Buckingham JA, Grau E, Abuin A, Chapman H, Clapham JC, Brand MD. The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice over-expressing or lacking uncoupling protein-3. **J Biol Chem.** 277:2773-2778, 2002.
- Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Runswick MJ, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. **Mol Cell Proteomics.** 4:693-699, 2005.
- Cervený KL, Jensen RE. The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. **Mol Biol Cell.** 14:4126-4139, 2003.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **J Cell Biol.** 160:189-200, 2003.
- Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. **J Biol Chem.** 280:26185-26192, 2005.
- Chen H, Chan DC. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. **Hum Mol Gen.** 14:R283-R289, 2005.
- Chen L, Gong Q, Stice JP, Knowlton AA. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. **Cardiovasc Res.** 84:91-99, 2009.
- Cheng Z, Guo S, Copps K, Dong X, Kollipara R, Rodgers JT, Depinho RA, Puigserver P, White MF. Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver. **Nat Med.** 15:1307-1311, 2009.
- Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. **Trends Endocrinol Metab.** 21:589-598, 2010.

Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* 5:3037-3046, 1991.

Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 292:1728-1731, 2001.

Choi SY, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, Frohman MA. A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol.* 8:1255-1262, 2006.

Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci.* 101:15927-15932, 2004.

Civitaresse AE, Ravussin E. Mitochondrial energetics and insulin resistance. *Endocrinology.* 149:950-954, 2008.

Contreras-Ferrat AE, Toro B, Bravo R, Parra V, Vásquez C, Ibarra C, Mears D, Chiong M, Jaimovich E, Klip A, Lavandero S. An inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-IP3 receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology.* 151:4665-4677, 2010.

Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan KL. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.* 18:1533-1538, 2004.

Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J.* 86:3993-4003, 2004.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378:785-789, 1995.

Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature.* 450:736-740, 2007.

Dalmonte ME, Forte E, Genova ML, Giuffrè A, Sarti P, Lenaz G. Control of respiration by cytochrome c oxidase in intact cells: role of the membrane potential. *J Biol Chem.* 284:32331-32335, 2009.

Das TK, Pecoraro C, Tomson FL, Gennis RB, Rousseau DL. The post-translational modification in cytochrome c oxidase is required to establish a functional environment of the catalytic site. *Biochemistry.* 37:14471-14476, 1998.



Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. **Hum Genet.** 109:584-591, 2001.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.** 10:369-377, 2000.

Desai BN, Myers BR, Schreiber SL. FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. **Proc Natl Acad Sci USA.** 99:4319-24, 2002.

Detmer S, Chan D. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8:870-879, 2007.

Dhalla NS, Saini-Chohan HK, Rodriguez-Leyva D, Elimban V, Dent MR, Tappia PS. Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. **Cardiovasc Res.** 81:429-438, 2009.

Diaz F, Moraes CT. Mitochondrial biogenesis and turnover. **Cell Calcium.** 44:24-35, 2008.

Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. **Mol Aspects Med.** 25:365-451, 2004.

Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P. Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. **Biochim Biophys Acta.** 1670:126-131, 2004.

Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson NG, Neupert W, Reichert AS. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. **J Biol Chem.** 281:37972-37979, 2006.

Ebina Y, Edery M, Ellis L, Standring D, Beaudoin J, Roth RA, Rutter WJ. Expression of a functional human insulin receptor from a cloned cDNA in Chinese hamster ovary cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 82:8014-8018, 1985.

Ehse S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI, Langer T. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. **J Cell Biol.** 187:1023-1036, 2009.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nat Rev Genet.** 7:606-619, 2006.

Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. **J Biochem.** 134:333-344, 2003.

Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. **Dev Cell.** 1:515-525, 2001.

Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. **Cell.** 126:177-189, 2006.

Foster KG, Fingar DC. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. **J Biol Chem.** 285:14071-14077, 2010.

Furt F, Moreau P. Importance of lipid metabolism for intracellular and mitochondrial membrane fusion/fission processes. **Int J Biochem Cell Biol.** 41:1828-1836, 2009.

Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF, Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. **J Biol Chem.** 278:38484-38494, 2003.

Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. **EMBO J.** 24:1546-1556, 2005.

Gnaiger E, Méndez G, Hand SC. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. **Proc Natl Acad Sci USA.** 97:11080-11085, 2000.

Griffin EE, Graumann J, Chan DC. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. **J Cell Biol.** 170:237-248, 2005.

Griparic L, Kanazawa T, van der Blik AM. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. **J Cell Biol.** 178:757-764, 2007.

Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, van der Blik AM. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. **J Biol Chem.** 279:18792-18798, 2004.

Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombès A, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. **Biol Cell.** 100:315-325, 2008.

Gustafson TA, He W, Craparo A, Schaub CD, O'Neill TJ. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. **Mol Cell Biol.** 15:2500-2508, 1995.

Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. **J Cell Biol.** 30:269-297, 1966.

Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. **J Cell Biol.** 37:345-369, 1968.

Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Blik AM. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. **J Cell Biol.** 187:959-966, 2009.

Herlan M, Bornhovd C, Hell K, Neupert W, Reichert AS. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. **J Cell Biol.** 165:167-173, 2004.

Héron-Milhavet L, Mamaeva D, Rochat A, Lamb NJ, Fernandez A. Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. **J Cell Physiol.** 214:158-165, 2008.

Herrmann G, Decherd G. The chemical nature of heart failure. **Ann Inter Med.** 12:1233-1244, 1939.

Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. **Science.** 332:1317-1322, 2011.

Hom J, Sheu SS. Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. **J Mol Cell Cardiol.** 46:811-820, 2009.

Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. **Proc Natl Acad Sci USA.** 93:2719-2723, 1996.

Huang J, Gabrielsen JS, Cooksey RC, Luo B, Boros LG, Jones DL, Jouihan HA, Soesanto Y, Knecht L, Hazel MW, Kushner JP, McClain DA. Increased glucose disposal and AMP-dependent kinase signaling in a mouse model of hemochromatosis. **J Biol Chem.** 282:37501-37507, 2007.

Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. **Biochem J.** 412:179-190, 2008.

Hwang JB, Frost SC. Effect of alternative glycosylation on insulin receptor processing. **J Biol Chem.** 274:22813-22820, 1999.

Imoto M, Tachibana I, Urrutia R. Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. **J Cell Sci.** 111:1341-1349, 1998.

Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. **J Cell Biol.** 170:1021-1027, 2005.

Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25:2966–2977, 2006.

Ishihara N, Jofuku A, Eura Y, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:891-898, 2003.

Ishikawa K, Kimura S, Kobayashi A, Sato T, Matsumoto H, Ujiie Y, Nakazato K, Mitsugi M, Maruyama Y. Increased reactive oxygen species and anti-oxidative response in mitochondrial cardiomyopathy. *Circ J.* 69:617-620, 2005.

Jagasia R, Grote P, Westermann B, Conradt B. DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature.* 433:754-760, 2005.

Jaroszewski L, Li W, Godzik A. In search of more accurate alignments in the twilight zone. *Protein Sci.* 11:1702-1713, 2002.

Jezek P, Plecítá-Hlavatá L. Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:1790-1804, 2009.

John GB, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, Selker JM, Rangell L, Bennett MJ, Zha J. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell.* 16:1543-1554, 2005.

Kahn CR, Freychet P, Roth J, Neville Jr DM. Quantitative aspects of the insulin-receptor interaction in liver plasma membranes. *J Biol Chem.* 249:2249-2257, 1974.

Kaser M, Kambacheld M, Kisters-Woike B, Langer T. Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J Biol Chem.* 278:46414-46423, 2003.

Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes.* 51:2944-2950, 2002.

Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT, de Jong JW. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 146:26-39, 2007.

Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, Shiojima I, Walsh K, Dyck JR. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem.* 278:39422-39427, 2003.

Kuzmíć J, Del Campo A, Lopez-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro PF, Verdejo HE, Parra V, Chiong M, Lavandero S. Dinámica y función mitocondrial: un potencial nuevo blanco terapéutico para la insuficiencia cardiaca (Mitochondrial dynamics and function: a

potential new therapeutic target for heart failure). **Rev Esp Cardiol.** doi:10.1016/j.recesp.2011.05.018, 2011.

Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nat Protoc.** 3:965-976, 2008.

Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. **J Bioenerg Biomembr.** 32:247-58, 2000.

Lee Y, Jeong S, Karbowski M, Smith C, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. **Mol Biol Cell.** 15:5001-5011, 2004.

Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. **Mol Biol Cell.** 15:5001-5011, 2004.

Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. **Mol Biol Cell.** 13:4343-4354, 2002.

Levine R, Goldstein M, Klein S, Huddlestun B. The action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated nephrectomized dogs. **J Biol Chem.** 179:985-986, 1949.

Linn TC, Pettit FH, Reed LJ. Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. **Proc Natl Acad Sci USA.** 62:234-241, 1969.

Liu S, Okada T, Assmann A, Soto J, Liew CW, Bugger H, Shirihai OS, Abel ED, Kulkarni RN. Insulin signaling regulates mitochondrial function in pancreatic beta-cells. **PLoS One.** 4:e7983, 2009.

Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science.** 307:384-387, 2005.

Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial function in normal and diabetic beta cells. **Nature.** 414:807-812, 2001.

Makino A, Suarez J, Gawlowski T, Han W, Wang H, Scott BT, Dillmann WH. Regulation of mitochondrial morphology and function by O-GlcNAcylation in neonatal cardiac myocytes. **Am J Physiol.** 300:R1296-R1302, 2011.

Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombès A, Rojo M. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. **EMBO Rep.** 6:853-859, 2005.

Manders EMM, Verbeek EJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. **Journal of Microscopy.** 169:375-382, 1993.

Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 91:1103-1113, 2002.

Mancini M, Anderson BO, Caldwell E, Sedghinasab M, Paty PB, Hockenbery DM. Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J Cell Biol*. 138:449-469, 1997.

Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech*. 27:278-283, 1994.

Marambio P, Toro B, Sanhueza C, Troncoso R, Parra V, Verdejo H, García L, Quiroga C, Munafo D, Díaz-Elizondo J, Bravo R, González MJ, Diaz-Araya G, Pedrozo Z, Chiong M, Colombo MI, Lavandero S. Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1802:509-518, 2010.

Marin-García J, Goldenthal M. Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review. *J Card Fail*. 8:347-361, 2002.

Martinou JC, Youle RJ. Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ*. 13:1291-1295, 2006.

McDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 360:2211-2225, 2005.

McBride H, Soubannier V. Mitochondrial function: OMA1 and OPA1, the grandmasters of mitochondrial health. *Curr Biol*. 20:R274-R276, 2009.

Meeusen S, DeVay R, Block J, Cassidy-Stone A, Wayson S, McCaffery JM, Nunnari J. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*. 127:383-395, 2006.

Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1793:27-32, 2009.

Milon L, Meyer P, Chiadmi M, Munier A, Johansson M, Karlsson A, Lascau I, Capeau J, Janin J, Lacombe ML. The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem*. 275:14264-14272, 2000.

Miyamoto S, Rubio M, Sussman MA. Nuclear and mitochondrial signalling Akts in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 82:272-285, 2009.

Moschella PC, Rao VU, McDermott PJ, Kuppuswamy D. Regulation of mTOR and S6K1 activation by the nPKC isoforms, PKCepsilon and PKCdelta, in adult cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 43:754-766, 2007.

Moule SK, Denton RM. Multiple signaling pathways involved in the metabolic effects of insulin. *Am J Cardiol.* 80:41A-49A, 1997.

Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev.* 28:463-491, 2007.

Munoz JP, Chiong M, García L, Troncoso R, Toro B, Pedrozo Z, Diaz-Elizondo J, Salas D, Parra V, Núñez MT, Hidalgo C, Lavandero S. Iron induces protection and necrosis in cultured cardiomyocytes: Role of reactive oxygen species and nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 48:526-534, 2010.

Naylor K, Ingerman E, Okreglak V, Marino M, Hinshaw JE, Nunnari J. Mdv1 interacts with assembled Dnm1 to promote mitochondrial division. *J Biol Chem.* 281:2177-2183, 2006.

Neely J, Morgan H. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu Rev Physiol.* 36:413-459, 1974.

Neubauer S. The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med.* 356:1140-1151, 2007.

Nystrom FH, Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal.* 11:563-574, 1999.

Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S. Insulin exocytotic mechanism by imaging technique. *J Biochem (Tokyo).* 140:1-5, 2006.

Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem.* 278:7743-7746, 2003.

Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Bricchese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 523:171-176, 2002.

Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 121:2012-2022, 2010.

Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, Diamant M. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia.* 48:1229-1237, 2005.

Osman C, Merkwirth C, Langer T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci.* 122:3823-3830, 2009.

O'Neill BT, Kim J, Wende AR, Theobald HA, Tuinei J, Buchanan J, Guo A, Zaha VG, Davis DK, Schell JC, Boudina S, Wayment B, Litwin SE, Shioi T, Izumo S, Birnbaum MJ, Abel ED. A conserved role for phosphatidylinositol 3-kinase but not

Akt signaling in mitochondrial adaptations that accompany physiological cardiac hypertrophy. **Cell Metab.** 6:294-306, 2007.

Parker N, Crichton PG, Vidal-Puig AJ, Brand MD. Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. **J Bioenerg Biomembr.** 41:335-342, 2009.

Parra V, Eisner V, Chiong M, Criollo A, Moraga F, Garcia A, Härtel S, Jaimovich E, Zorzano A, Hidalgo C, Lavandro S. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. **Cardiovasc Res.** 77:387-397, 2008.

Parra V, Verdejo H, del Campo A, Pennanen C, Kuzmicic J, Iglewski M, Hill JA, Rothermel BA, Lavandro S. The complex interplay between mitochondrial dynamics and cardiac metabolism. **J Bioenerg Biomembr.** 43:47-51, 2011.

Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. **EMBO J.** 21: 221-230, 2002.

Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med.** 350:664-671, 2004.

Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. **Hum Mol Genet.** 14:1405-1415, 2005.

Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. **EMBO J.** 20:2690-2701, 2001.

Proud CG. Role of mTOR signalling in the control of translation initiation and elongation by nutrients. **Curr Top Microbiol Immunol.** 279:215-244, 2004.

Ramanathan A, Schreiber SL. Direct control of mitochondrial function by mTOR. **Proc Natl Acad Sci USA.** 106:22229-22232, 2009.

Remondino A, Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Tardy I, Papageorgiou I, Dorsaz PA, Jorge-Costa M, Lerch R. Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol.** 32:2025-2034, 2000.

Reusch JE, Bhuripanyo P, Carel K, Leitner JW, Hsieh P, DePaolo D, Draznin B. Differential requirement for p21ras activation in the metabolic signaling by insulin. **J Biol Chem.** 270:2036-2040, 1995.

Riehle C, Wayment B, Pires KM, Moreira AB, Theobald H, Dong X, White MF, Litwin SE, Abel ED. Abstract 3559: Insulin Receptor Substrates (IRS) Signaling are



Essential Regulators of Mitochondrial Function and Cardiomyocyte Survival **Circulation**. 118, S444, 2008.

Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. **J Cell Sci**. 115:1663-1674, 2002.

Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. **Cancer Res**. 64:985-993, 2004.

Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. **J Cell Sci**. 114:867-874, 2001.

Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. **J Cell Sci**. 116:2763-2774, 2003.

Santi SA, Lee H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. **Am J Physiol**. 298:C580-C591, 2010.

Scalettar BA, Abney JR, Hackenbrock CR. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. **Proc Natl Acad Sci USA**. 88:8057-8061, 1991.

Sharma S, Guthrie PH, Chan SS, Haq S, Taegtmeyer H. Glucose phosphorylation is required for insulin-dependent mTOR signalling in the heart. **Cardiovasc Res**. 76:71-80, 2007.

Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. **Mitochondrion**. 1:3-31, 2001.

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. **Dev Cell**. 2:55-67, 2002.

Schieke SM, Phillips D, McCoy JP Jr, Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, Finkel T. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. **J Biol Chem**. 281:27643-52, 2006.

Sesaki H, Southard SM, Yaffe MP, Jensen RE. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. **Mol Biol Cell**. 14:2342-2356, 2003.

Sesaki H, Southard SM, Hobbs AE, Jensen RE. Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mt and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. **Biochem Biophys Res Commun**. 308:276-283, 2003.

Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. **Mol Cell Biol**. 22:2799-2809, 2002.

- Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, Izumo S. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 107:1664-1670, 2003.
- Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci*. 26:23-29, 2001.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 12:2245-2256, 2001.
- Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*. 178:749-755, 2007.
- Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci*. 117:1201-1210, 2004.
- Stump CS, Short KR, Bigelow ML, Schimke JM, Nair KS. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:7996-8001, 2003.
- Sun CN, Dhalla NS, Olson RE. Formation of gigantic mitochondria in hypoxic isolated perfused rat hearts. *Experientia*. 25:763-764, 1969.
- Sun L, Liu L, Yang XJ, Wu Z. Akt binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation. *J Cell Sci*. 117:3021-3029, 2004.
- Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol*. 19:59-113, 1994.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:85-96, 2006.
- Tieu Q, Okreglak V, Naylor K, Nunnari J. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol*. 158:445-452, 2002.
- Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P, Raschke I, Merkwirth C, Ehse S, Krause F, Chan DC, Alexander C, Bauer C, Youle R, Langer T, Martinou JC. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J*. 28:1589-1600, 2009.
- Tsutsui H, Ide T, Kinugawa S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure. *Antioxid Redox Signal*. 8:1737-1744, 2006.
- Turner N, Heilbronn LK. Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends Endocrinol Metab*. 19:324-330, 2008.

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **EMBO J.** 27:433-446, 2008.

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, Mason A, Seeburg PH, Grunfeld C, Rosen OM, Ramachandran J. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. **Nature.** 313:756-761, 1985.

Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochem J.** 346:561-576, 2000.

Villena J, Henriquez M, Torres V, Moraga F, Díaz-Elizondo J, Arredondo C, Chiong M, Olea-Azar C, Stutzin A, Lavandero S, Quest AF. Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. **Free Radic Biol Med.** 44:1146-1160, 2008.

Vinciguerra M, Foti M. PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling. **Arch Physiol Biochem.** 112:89-104, 2006.

Walder K, Kerr-Bayles L, Civitarese A, Jowett J, Curran J, Elliott K, Trevaskis J, Bishara N, Zimmet P, Mandarino L, Ravussin E, Blangero J, Kissebah A, Collier GR. The mitochondrial rhomboid protease PARL is a new candidate gene for type 2 diabetes. **Diabetologia.** 48:459-468, 2005.

Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science.** 283:1482-1488, 1999.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochem J.** 281:21-40, 1992.

Wang PR, Chien YW. Day-night differences in the kinetics and dynamics of insulin: diabetic versus normal Yucatan minipigs. **Chronobiol Int.** 13:213-225, 1996.

Weber KT, Brilla CG. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. **Clin Cardiol.** 16:II10-II14, 1993.

Weisser-Thomas J, Kubo H, Hefner CA, Gaughan JP, McGowan BS, Ross R, Meyer M, Dillmann W, Houser SR. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger/SR Ca<sup>2+</sup> ATPase transport capacity regulates the contractility of normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. **J Card Fail.** 11:380-387, 2005.

Westermann B. Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. **EMBO Rep.** 3:527-531, 2002.

White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. **Am J Physiol.** 283:E413-E422, 2002.

Wong ED, Wagner JA, Scott SV, Okreglak V, Holewinske TJ, Cassidy-Stone A, Nunnari J. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol.* 160:303-311, 2003.

Yip CC, Ottensmeyer P. Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem.* 278:27329-27332, 2003.

Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol.* 23:5409-5420, 2003.

Yoon Y, Pitts KR, McNiven MA. Mammalian dynamin-like protein Dlp1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell.* 12:2894-905, 2001.

Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:657-663, 2005.

Yu Y, Yoon SO, Poulogiannis G, Yang Q, Ma XM, Villén J, Kubica N, Hoffman GR, Cantley LC, Gygi SP, Blenis J. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science.* 332:1322-1326, 2011.

Zhang J, Ishibashi Y, Zhang Y, Eijgelshoven MH, Duncker DJ, Merkle H, Bache RJ, Ugurbil K, From AH. Myocardial bioenergetics during acute hibernation. *Am J Physiol.* 273:H1452-H1463, 1997.

Zhang J, Wilke N, Wang Y, Zhang Y, Wang C, Eijgelshoven MH, Cho YK, Murakami Y, Ugurbil K, Bache RJ, From AH. Functional and bioenergetic consequences of postinfarction left ventricular remodeling in a new porcine model. MRI and 31 P-MRS study. *Circulation.* 94:1089-1100, 1996.

Zhang Z, Wakabayashi N, Wakabayashi J, Tamura Y, Song WJ, Sereda S, Clerc P, Polster BM, Aja SM, Pletnikov MV, Kensler TW, Shirihai OS, Iijima M, Hussain MA, Sesaki H. The dynamin-related GTPase Opa1 is required for glucose-stimulated ATP production in pancreatic beta cells. *Mol Biol Cell.* 22:2235-2245, 2011.