

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



**“REGULACIÓN DE LA RESPUESTA A INSULINA POR  
CERAMIDAS EN EL CARDIOMIOCITO A NIVEL DE LA  
DINÁMICA MITOCONDRIAL”**

Tesis para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica,  
área de especialización Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico  
Molecular,  
y Memoria para optar al Título de Bioquímica por:

**CAMILA PAZ LÓPEZ CRISOSTO**

Director de Tesis  
Dr. Sergio Lavandero González

Santiago, Chile  
2012

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

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER Y TÍTULO DE BIOQUÍMICO**

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

**CAMILA PAZ LÓPEZ CRISOSTO**

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímica, en el examen de defensa de tesis rendido el día \_\_\_\_\_.

**Director de Tesis:**

Dr. Sergio Lavandero González \_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Javier Puente Piccardo (Presidente) \_\_\_\_\_

Dra. Lorena García Nannig \_\_\_\_\_

Dra. Margarita Vega Blanco \_\_\_\_\_

Dedicada a  
mi familia.

Esta tesis de Magíster se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, el cual pertenece al Centro de Estudios Moleculares de la Célula, en las Facultades de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Medicina de la Universidad de Chile.

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

- Beca CONICYT 2011 (CL)
- Proyecto FONDAP 15010006 (Dr. Sergio Lavandero)
- Proyecto Anillo ACT1111 (Dr. Sergio Lavandero)
- Proyecto FONDECYT 1120212 (Dr. Sergio Lavandero)
- Proyecto FONDECYT 1090727 (Dr. Pablo Castro)

La presente tesis de Magíster y memoria de pregrado ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

**a) Presentaciones a congresos:**

**López-Crisosto C**, Kuzmicic J, Morales C, Parra V, Castro P, Lavandero S. High concentration of lipids alter mitochondrial dynamics and cause Insulin signaling desensibilization in cultured cardiomyocytes. XXXIV Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Valdivia, Chile, 27-30 Septiembre 2011.

Parra V, Verdejo H, Troncoso R, Kuzmicic J, del Campo A, Pennanen C, **López-Crisosto C**, Chiong M, Zorzano A, Lavandero S. Insulin signalling increases mitochondrial metabolism by promoting mitochondrial fusión. XXXIV Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. New members session. Valdivia, Chile, 27-30 Septiembre 2011.

Lavandero S, Parra V, Verdejo H, Kuzmicic J, **López-Crisosto C**, del Campo A, Bravo R, Gutiérrez T, Chiong M, Quiroga C. Mitochondrial dynamics and metabolism are regulated by insulin. Cell Signaling Networks 2011. Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB) Symposium. Mérida, Yucatán, México, October 22-27, 2011.

**López-Crisosto C**, Kuzmicic J, Parra V, Castro P, Lavandero S. Ceramides alter mitochondrial dynamics in cardiomyocytes causing insulin signaling desensibilization. X Annual Scientific Sessions. Society for Heart and Vascular Metabolism. Oxford, United Kingdom. June 24-27, 2012.

**López-Crisosto, C**; Parra, V; Lavandero, S. La menor respuesta a insulina inducida por ceramidas en cardiomiocitos se relaciona con la fisión mitocondrial. Congreso Ciencia Joven 2012. XV Aniversario del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM). Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile, 06 de Septiembre 2012.

**López-Crisosto C**, Parra V, Castro P, Lavandero S. Ceramides-induced insulin signaling desensitization is linked to mitochondrial network fragmentation. XXXV Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Puerto Varas, Chile, 02-05 Octubre 2012.

**b) Publicaciones:**

Kuzmicic J, del Campo A, **López-Crisosto C**, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro PF, Verdejo HE, Parra V, Chiong M, Lavandero S. Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. Rev Esp Cardiol 64:916-23, 2011.

Troncoso R, Vásquez-Trincado C, del Campo A, Gatica D, Morales PE, Paredes F, Torrealba N, **López-Crisosto C**, Pedrozo Z, García L, Díaz-Araya G, Battiprolu PK, Nemchenko A, Ferdous A, Gillette TG, Hill JA, Lavandero S. Regulation of autophagy by Insulin/IGF-1 signaling pathways. Autophagy: Principles, Regulation and Roles in Disease - Nova Publisher-September 2, 2011

Bravo-Sagua R, Rodriguez AE, Kuzmicic J, Gutierrez T, **López-Crisosto C**, Quiroga C, Chiong M, Gillette TG, Rothermel BA, Lavandero S. Cell death and survival through the endoplasmic reticulum-mitochondrial axis. Curr Mol Med. Aceptado para publicación, 2012.

Battiprolu PK, **López-Crisosto C**, Wang Z, Nemchenko A, Lavandero S, Hill JA. Diabetic cardiomyopathy and metabolic remodeling of the heart. Life Sci. en revisión, 2012.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a todas las personas que me han acompañado a lo largo del desarrollo de este trabajo y que han hecho posible la finalización de esta tesis.

En primer lugar, a mi director de tesis, Dr. Sergio Lavandero, por su apoyo, guía, confianza y la oportunidad de trabajar en este laboratorio.

A los integrantes de mi comisión evaluadora, por su apoyo y sus comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo

A todos mis compañeros de laboratorio, por la compañía, el apoyo y los buenos momentos compartidos. Especialmente al Grupo Mitocondrias, por su enorme aporte para el desarrollo tanto profesional como personal de todos sus integrantes.

A Valentina Parra, por su amistad, compañía e incontables enseñanzas y sugerencias que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A mi familia, por su apoyo, preocupación y buenos deseos que han sido fundamentales para mi desarrollo personal.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b> .....	9
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	11
<b>ABREVIATURAS</b> .....	12
<b>RESUMEN</b> .....	15
<b>SUMMARY</b> .....	16
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1.1. Estructura y metabolismo del corazón.....	17
1.2. Metabolismo cardiaco de ácidos grasos.....	18
1.3. Insulina y su sistema de transducción.....	19
1.3.1. Acción de la insulina en el corazón.....	21
1.4. Obesidad, resistencia a la insulina y patologías cardiovasculares.....	21
1.4.1. Lipotoxicidad y resistencia a la insulina.....	22
1.5. Mitocondria.....	23
1.5.1. Dinámica mitocondrial.....	24
1.5.2. Maquinaria de fusión mitocondrial.....	24
1.5.3. Maquinaria de fisión mitocondrial.....	25
1.5.4. Estructura y regulación de Drp-1.....	26
1.6. Función y dinámica mitocondrial y su relación con insulina.....	27
1.7. Ceramidas: estructura y síntesis.....	28
1.7.1. Rol de las ceramidas en estrés y resistencia a la insulina.....	30
1.7.2. Papel de las ceramidas en la disfunción y fisión de la red mitocondrial.....	32
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	35
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	35
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
5.1. Reactivos.....	36
5.2. Modelo experimental.....	37
5.3. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas.....	37
5.4. Estímulo con C <sub>2</sub> -ceramida o palmitato.....	38
5.5. Transducción adenoviral.....	38

5.6. Preparación de extractos celulares totales.....	38
5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas.....	39
5.8. Western blot.....	39
5.9. Inmunofluorescencia indirecta.....	40
5.10. Visualización de la morfología mitocondrial.....	41
5.11. Análisis digital de imágenes.....	41
5.12. Análisis estadístico.....	42
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
6.1. Efecto de las ceramidas sobre la fosforilación de Akt en respuesta a insulina.....	43
6.2. Efecto de las ceramidas sobre la dinámica mitocondrial.....	45
6.3. Prevención de la fragmentación de la morfología mitocondrial por ceramidas mediante la sobreexpresión de Drp-1K38A.....	49
6.4. Rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina mediante la sobreexpresión de Drp-1K38A.....	50
6.5. Prevención de la fragmentación de la morfología mitocondrial mediante el uso de un inhibidor químico de Drp-1.....	51
6.6. Rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina mediante el uso de un inhibidor químico de Drp-1.....	53
6.7. Evaluación de la producción de ceramidas por palmitato.....	55
6.8. Evaluación del rol de las ceramidas como mediadores de la fragmentación de la red mitocondrial inducida por palmitato.....	56
6.9. Evaluación del rol de las ceramidas como mediadores de la translocación de Drp-1 a la mitocondria inducida por palmitato.....	58
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>60</b>
7.1. Ceramidas y fosforilación de Akt.....	61
7.2. Ceramidas y fisión mitocondrial.....	61
7.3. Efectos de la inhibición de Drp-1 sobre la morfología mitocondrial.....	63
7.4. Efectos de la inhibición de Drp-1 sobre la fosforilación de Akt.....	64
7.5. Palmitato y producción de ceramidas.....	66
7.6. Palmitato y fisión mitocondrial.....	67
7.7. Papel de las ceramidas en la fisión mitocondrial inducida por palmitato.....	67
7.8. Perspectivas.....	69
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Vía de señalización de la insulina a través de PI-3K/Akt.....	20
<b>Figura 2.</b> Maquinaria molecular de la dinámica mitocondrial en células de mamíferos.....	25
<b>Figura 3.</b> Vías de síntesis de las ceramidas.....	29
<b>Figura 4.</b> Efecto de la C <sub>2</sub> -ceramida sobre la fosforilación de Akt en respuesta a insulina.....	44
<b>Figura 5.</b> Efecto de la C <sub>2</sub> -ceramida sobre la morfología mitocondrial.....	46
<b>Figura 6.</b> Efecto de la C <sub>2</sub> -ceramida sobre la translocación de Drp-1 a la mitocondria.....	48
<b>Figura 7.</b> Prevención de la fragmentación de la morfología mitocondrial mediante la sobreexpresión de Drp-1K38A.....	50
<b>Figura 8.</b> Rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina mediante la sobreexpresión de Drp-1K38A.....	52
<b>Figura 9.</b> Prevención de la fragmentación de la morfología mitocondrial mediante el uso de un inhibidor químico de Drp-1.....	53
<b>Figura 10.</b> Rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina mediante el uso de un inhibidor químico de Drp-1.....	54
<b>Figura 11.</b> Evaluación de la producción de ceramidas por palmitato.....	56
<b>Figura 12.</b> Evaluación del rol de las ceramidas como mediadores de la fragmentación de la red mitocondrial inducida por palmitato.....	57
<b>Figura 13.</b> Evaluación del rol de las ceramidas como mediadores de la translocación de Drp-1 a la mitocondria inducida por palmitato.....	59
<b>Figura 14.</b> Modelo final.....	70

## ABREVIATURAS

µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
µM	: Micromolar
µm	: Micrómetro
AGL	: Ácidos grasos libres
Akt/PKB	: Proteína kinasa Akt o proteína kinasa B
ANOVA	: Análisis de la varianza
AS160	: Sustrato de Akt de 160 kDa
ATP	: Adenosín trifosfato
BSA	: Albúmina de suero bovino
C <sub>2</sub> -ceramida	: N-acetil-D-eritro-esfingosina
CCCP	: Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
CERT	: Proteína de transferencia de ceramidas
CnA	: Calcineurina
CoA	: Coenzima A
CPT	: Carnitina palmitoiltransferasa
CT	: Translocasa carnitina:acil-carnitina
DAG	: Diacilglicerol
DH-C <sub>2</sub> -ceramida	: Dihidro-N-acetil-D-eritro-esfingosina
DM	: Diabetes mellitus
DME	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
Drp-1	: Proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo 1
Drp-1K38A	: Mutante con efecto dominante negativo de Drp-1
FABPmb	: Isoforma de la proteína ligante de ácidos grasos en membrana plasmática
FAT/CD36	: Translocasa de ácidos grasos
FATP	: Proteína transportadora de ácidos grasos
FBS	: Suero fetal bovino

FCS	: Suero fetal de ternera
Fis-1	: Proteína de la fisión mitocondrial
GED	: Dominio efector de GTPasa ( <i>GTPase effector domain</i> ) de Drp-1
GLUT4	: Transportador de glucosa tipo 4
GTP	: Guanosín trifosfato
GTPasa	: Guanosín trifosfatasa
H	: Horas
IMC	: Índice de masa corporal
IRS	: Sustratos del receptor de insulina ( <i>Insulin receptor substrates</i> )
kDa	: kilo Dalton
LacZ	: Adenovirus para $\beta$ -galactosidasa bacteriana
Mdivi-1	: Inhibidor de la división mitocondrial 1 ( <i>Mitochondrial division inhibitor</i> )
Mdv1p/Caf4p	: Proteínas adaptadoras para la unión de Drp-1 a Fis-1 en levaduras
Mff	: Factor de fisión mitocondrial ( <i>Mitochondrial fission factor</i> )
Mfn	: Mitofusina
MiD49/51	: Proteínas de la dinámica mitocondrial de 49 y 51 kDa que actúan como reguladores negativos de la fisión mitocondrial
MIEF	: Factor de elongación mitocondrial ( <i>Mitochondrial elongation factor</i> )
Min	: Minutos
MM	: Medio de cultivo de mantención
MOI	: Multiplicidad de infección
MTG	: Mitotracker green
mtHsp-70	: Proteína “ <i>heat shock</i> ” -70 de la mitocondria
mTOR	: Proteína kinasa mTOR, blanco de rapamicina de mamíferos ( <i>Mammalian target of rapamycin</i> )
Opa-1	: Proteína de la atrofia óptica tipo-1
PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida
p-Akt	: Proteína Akt fosforilada en Serina <sup>473</sup>
PBS	: Tampón de fosfato salino

PDK1	: Proteína kinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositidos
PH	: Dominio de homología a pleckstrina ( <i>Pleckstrin homology</i> )
PI-3K	: Fosfatidilinositol- 3 kinasa
PIP3	: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	: Proteína kinasa A
PKC	: Proteína kinasa C
PMSF	: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP2A	: Fosfoproteína fosfatasa 2A
PSF	: Función de difusión puntual ( <i>Point spread function</i> )
PTEN	: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTP1B	: Proteína tirosina fosfatasa 1B
ROS	: Especies reactivas del oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SEM	: Error estándar de la media
Ser	: Serina
SH2	: Dominio de homología a Src 2 ( <i>Src homology 2</i> )
SPT	: Serina-palmitoil transferasa
SUMO	: Modificador pequeño similar a la ubiquitina ( <i>Small ubiquitin-like modifier</i> )
TAG	: Triacilglicerol
TBS	: Tampón de Tris salino
TCA	: Ácido tricloroacético
Thr	: Treonina
TNF	: Factor de necrosis tumoral
Tyr	: Tirosina

## RESUMEN

La obesidad y la diabetes son condiciones altamente prevalentes que representan un importante factor de riesgo para el desarrollo de patologías cardiovasculares, principal causa de muerte entre los pacientes diabéticos. La lipotoxicidad y las alteraciones metabólicas juegan un papel fundamental en la resistencia a la hormona insulina y el daño cardíaco en estos pacientes. Los cardiomiocitos son las unidades funcionales del corazón y poseen un alto requerimiento energético que depende en su mayor parte de la función mitocondrial. Las mitocondrias forman una red dinámica que se remodela constantemente por eventos de fisión y fusión. La mantención de una morfología mitocondrial balanceada es fundamental para mantener una funcionalidad adecuada de este organelo. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de las ceramidas, que derivan del metabolismo lipídico, en la señalización de la insulina y la dinámica mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata. La señalización de insulina se evaluó mediante Western blot para Akt fosforilada y la morfología mitocondrial por microscopía confocal en células teñidas con Mitotracker Green. El tratamiento de los cardiomiocitos con C<sub>2</sub>-ceramida (40 μM, 3 h) disminuyó la fosforilación de Akt basalmente y en respuesta a insulina y favoreció la fisión mitocondrial, aumentando la translocación de la proteína de fisión Drp-1 hacia este organelo. Para evaluar si ambos efectos estaban relacionados, se inhibió la actividad de Drp-1 mediante el uso de un dominante negativo y de un inhibidor químico, antes del tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida. La inhibición de Drp-1 mediante ambas herramientas previno la fisión mitocondrial causada por C<sub>2</sub>-ceramida y rescató la fosforilación de Akt en respuesta a insulina. Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que el tratamiento de los cardiomiocitos con palmitato 500 μM durante 3 h también induce fisión de la red mitocondrial. En este trabajo se mostró que al inhibir la síntesis de ceramidas a partir de palmitato se previene, en parte, los efectos de este ácido graso sobre la dinámica mitocondrial de los cardiomiocitos. En conclusión, la fragmentación de la red mitocondrial inducida por ceramidas es necesaria para la disminución de la señalización de insulina en los cardiomiocitos. Además, la fisión mitocondrial inducida por palmitato en este modelo depende en parte de la generación de ceramidas.

## SUMMARY

Obesity and diabetes are highly prevalent conditions that represent an important risk factor for the development of cardiovascular diseases, the main cause of death in diabetic patients. Lipotoxicity and metabolic alterations take part in insulin resistance and heart damage in these patients. Cardiomyocytes are the functional basic units of the heart and have a high energy requirement that depends largely on mitochondrial function. Mitochondria form a dynamic network that is constantly remodelled by fission and fusion events. The maintenance of a balanced mitochondrial morphology is critical to maintain a proper functionality of this organelle. The aim of this study was to investigate the effect of ceramides, derived from lipid metabolism, in insulin signalling and mitochondrial dynamics in primary cultures of rat cardiomyocytes. Insulin signalling was assessed by Western blot for phosphorylated Akt and mitochondrial morphology by confocal microscopy in Mitotracker Green-stained cells. Treatment of cardiomyocytes with C<sub>2</sub>-ceramide (40 µM, 3 h) decreased the phosphorylation of Akt at baseline and in response to insulin and induced mitochondrial fission, increasing the translocation of the fission protein Drp-1 to this organelle. To assess whether both effects were related, Drp-1 activity was inhibited by using a dominant negative and a chemical inhibitor, before treatment with C<sub>2</sub>-ceramide. The inhibition of Drp-1 by both tools prevented mitochondrial fission caused by C<sub>2</sub>-ceramide and rescued Akt phosphorylation in response to insulin. Previous work in our laboratory showed that treatment of cardiomyocytes with palmitate 500 µM for 3 h also induces mitochondrial fission. We showed that inhibiting the synthesis of ceramides from palmitate prevented in part the effects of this fatty acid on mitochondrial dynamics in cardiomyocytes. In conclusion, the mitochondrial network fragmentation induced by ceramides is required for the decrease of insulin signalling in cardiomyocytes. Furthermore, palmitate-induced mitochondrial fission in this model depends in part on the generation of ceramides.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Estructura y metabolismo del corazón

El corazón es el órgano encargado de bombear la sangre a través del sistema circulatorio, con el fin de distribuir los nutrientes a todos los tejidos del organismo y eliminar los productos de desecho del metabolismo. El tejido cardiaco está compuesto principalmente por dos tipos celulares: los cardiomiocitos y los fibroblastos. Los cardiomiocitos son las células responsables de la contracción del corazón y dan cuenta del 33% del número total de células de este órgano, sin embargo debido a su gran tamaño relativo, ocupan el 75% del espacio estructural del corazón. Los cardiomiocitos son células altamente especializadas para su función contráctil y ya que son células terminalmente diferenciadas tienen una escasa capacidad para proliferar **(Weber & Brilla 1993; Chien et al. 1991)**. Por su parte, los fibroblastos, de menor tamaño, constituyen el 66% restante del número de células y su principal función es ejercer como sostén del tejido cardiaco mediante la síntesis y remodelado de la matriz extracelular **(Weber & Brilla 1993)**.

Debido al constante trabajo mecánico necesario para los ciclos de contracción y relajación y la necesidad de mantener la homeostasis iónica, el corazón requiere de un suministro continuo de energía en forma de ATP. La capacidad de reserva energética del corazón es bastante limitada, por lo cual se necesita de un suministro constante de nutrientes para la síntesis de ATP **(Neely & Morgan 1974; Stanley et al. 2005; Ingwall 2009)**. En el corazón adulto normal alrededor del 95% de la producción de ATP deriva de la fosforilación oxidativa mitocondrial, mientras que el resto proviene de la glicólisis y la producción de GTP durante el ciclo de Krebs **(Lopaschuk et al. 2010)**. La importancia de mantener el suministro de energía en el corazón queda demostrada por la gran abundancia de mitocondrias en los cardiomiocitos, llegando a ocupar hasta un 30% del volumen de estas células **(Brownsey et al. 1997)**. Para mantener una producción de ATP suficiente para satisfacer las demandas energéticas, el corazón utiliza diversos sustratos metabólicos dependiendo de su disponibilidad. Sin embargo,

en un corazón adulto normal en reposo, cerca del 70% de la producción de ATP proviene de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos **(Stanley et al. 2005)**.

## **1.2. Metabolismo cardiaco de ácidos grasos**

Debido a su baja solubilidad en agua, los ácidos grasos llegan al corazón unidos a la albúmina plasmática o esterificados en forma de triacilgliceroles (TAG) contenidos en lipoproteínas circulantes **(van der Vusse et al. 2000; Lopaschuk et al. 2010)**. La captación de ácidos grasos en los cardiomiocitos ocurre gracias a la difusión pasiva o con ayuda de diversas proteínas transportadoras. Dentro de estas proteínas transportadoras se encuentran la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36), la isoforma de la proteína ligante de ácidos grasos en la membrana plasmática (FABPmb) y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP). En los cardiomiocitos, el transporte a través de la translocasa FAT/CD36 da cuenta del 50-60% de la captación total de ácidos grasos **(Bonen et al. 2004; Luiken et al. 2004; Lopaschuk et al. 2010)**.

Una vez ocurrida la captación de los ácidos grasos al cardiomiocito, éstos se convierten en ésteres de coenzima A (CoA) mediante la acción de acil-CoA sintetasa y luego deben ser transportados a la mitocondria para comenzar el ciclo de  $\beta$ -oxidación **(Lopaschuk et al. 2010)**. El transporte de ácidos grasos de cadena larga al interior de la matriz mitocondrial no ocurre directamente, sino a través de la lanzadera acil-carnitina/carnitina. La carnitina palmitoiltransferasa (CPT) 1 de la membrana mitocondrial externa cataliza la conversión de los acil-CoA de cadena larga en ésteres de acil-carnitina de cadena larga **(Longo et al. 2006; Lopaschuk et al. 2010)**. A continuación, la acil-carnitina se transloca a través de la membrana mitocondrial interna mediante la translocasa carnitina:acil-carnitina (CT), que intercambia la acil-carnitina del espacio intermembrana por moléculas de carnitina presentes en la matriz mitocondrial **(Lopaschuk et al. 2010)**. Una vez dentro de la matriz mitocondrial, la acil-carnitina se reconvierte a acil-CoA por la CPT 2. El ingreso del acil-CoA a la matriz mitocondrial mediante la lanzadera acil-carnitina/carnitina constituye el paso limitante en la oxidación de los ácidos grasos **(Lopaschuk et al. 2010)**.

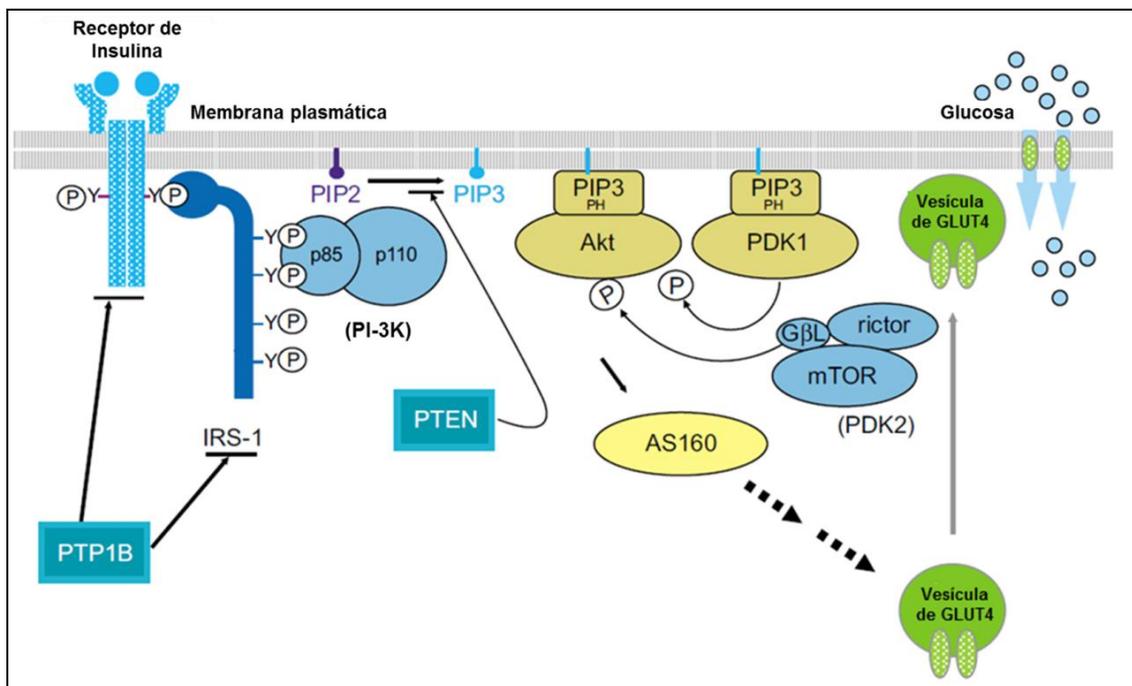
La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos se encuentra bajo un estricto control que depende de diversos factores entre los que se encuentran: i) el suministro de ácidos grasos al corazón; ii) la competencia con otros sustratos energéticos (glucosa, lactato, cuerpos cetónicos o aminoácidos); iii) la demanda energética del corazón; iv) el suministro de oxígeno al corazón; v) el control alostérico de la captación, esterificación y transporte mitocondrial de los ácidos grasos; vi) el control de la función mitocondrial, incluyendo el control directo de la  $\beta$ -oxidación, la actividad del ciclo de Krebs y de la cadena transportadora de electrones. Además debe considerarse el control transcripcional de las enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial (**Lopaschuk et al. 2010**).

### 1.3. Insulina y su sistema de transducción

La insulina es una hormona peptídica sintetizada y liberada por las células  $\beta$  pancreáticas en respuesta a aumentos postprandiales de la cantidad de glucosa en la circulación. La insulina es una de las principales hormonas encargadas de la homeostasis energética del organismo y estimula, entre otros procesos, la captación y almacenamiento de los nutrientes en el estado postprandial, en tejidos como el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (**Kanzaki & Pessin 2001; Choi & Kim 2010**).

La insulina actúa a través de un receptor con actividad tirosina kinasa intrínseca (**Yip & Ottensmeyer 2003; Kanzaki & Pessin 2001**), el cual, una vez que interactúa con su ligando, se autofosforila y fosforila diversos sustratos intracelulares entre los que destacan las proteínas IRS (*Insulin receptor substrates*). La fosforilación en diversos residuos de tirosina de las proteínas IRS genera motivos de reconocimiento para proteínas que contienen el dominio SH2 (*Src homology 2*) (**Kanzaki & Pessin 2001**). La vía de señalización clásica de la insulina (**Figura 1**) involucra el reclutamiento a la membrana plasmática de la fosfatidilinositol-3 kinasa (PI-3K), la cual genera el segundo mensajero PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), estimulando el reclutamiento a la membrana plasmática de proteínas citosólicas que contienen el dominio PH (*Pleckstrin homology*) el cual tiene afinidad por PIP3 (**Taniguchi et al. 2006; Kanzaki & Pessin 2001**). Uno de estos efectores es la proteína kinasa Akt/PKB,

que al unirse a PIP3 descubre dos sitios de fosforilación necesarios para su activación. Uno de ellos es la Thr<sup>308</sup> la cual es fosforilada por la kinasa PDK1, y el segundo es la Ser<sup>473</sup>, fosforilada a su vez por el complejo mTOR C2 (**Taniguchi et al. 2006**). Akt es un regulador central del metabolismo anabólico, promoviendo la captación de glucosa y aminoácidos a la célula y favoreciendo la supervivencia, gracias a su efecto antiapoptótico (**Summers 2006; Choi & Kim 2010; Taniguchi et al. 2006**).



**Figura 1. Vía de señalización de la insulina a través de PI-3K/Akt.**

Esquema de la vía transduccional de la insulina en relación con la captación de glucosa. A través de la unión a su receptor, la insulina induce la fosforilación de las proteínas IRS-1/2, lo que lleva a la activación de las enzimas PI-3K y Akt. Esta última actúa como principal efector de esta rama de la vía de señalización de la insulina, promoviendo la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática. PI-3K, fosfatidilinositol-3 quinasa; PIP3, fosfatidilinositoltrifosfato; Akt, proteína quinasa B; AS160, sustrato de Akt de 160 kDa; PDK1 y 2, kinasas que participan en la activación de Akt; PTEN y PTP1B, fosfatasas encargadas de apagar la señalización. Adaptado de Choi y cols (**Choi & Kim 2010**).

### 1.3.1. Acción de la insulina en el corazón

El músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo son reconocidos usualmente como los principales tejidos blanco de la insulina. Sin embargo, el músculo cardíaco también expresa receptores para la insulina, en niveles que varían entre 10.000 y 100.000 receptores por cardiomiocito **(Muniyappa et al. 2007)**, cumpliendo esta hormona un importante rol en el metabolismo cardíaco **(Brownsey et al. 1997; Muniyappa et al. 2007)**. La insulina regula directamente el metabolismo en los cardiomiocitos modulando el transporte de glucosa, la glicolisis, la síntesis de glicógeno, el metabolismo lipídico, la síntesis de proteínas, el crecimiento, la contractilidad y la apoptosis **(Muniyappa et al. 2007)**. Por otra parte, existe una acción indirecta de la insulina sobre el corazón al afectar el suministro de sustratos metabólicos provenientes del músculo esquelético y el tejido adiposo, y al regular la perfusión miocárdica mediante su efecto vasodilatador **(Muniyappa et al. 2007)**.

### 1.4. Obesidad, resistencia a la insulina y patologías cardiovasculares

El sobrepeso y la obesidad son condiciones crónicas que han aumentado considerablemente en las últimas décadas, alcanzando una prevalencia del 39,3 y 25,1%, respectivamente, en la población chilena **(Ministerio de Salud Gobierno de Chile 2010)**. Estas condiciones están dadas por un incremento de la masa de tejido adiposo, principalmente de tipo visceral, y se definen generalmente en base al índice de masa corporal (IMC), considerándose como persona obesa, según la Organización Mundial de la Salud, aquella que tiene un IMC mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> **(Ministerio de Salud Gobierno de Chile 2010)**. La obesidad es un factor de riesgo preponderante para patologías crónicas tales como la diabetes mellitus (DM) y las enfermedades cardiovasculares, entre las que se incluyen la hipertensión arterial, el infarto agudo al miocardio, la aterosclerosis y la insuficiencia cardíaca **(Lawlor et al. 2006; Wild & Byrne 2006)**.

Las patologías cardiovasculares son la primera causa de mortalidad en Chile **(Instituto Nacional de Estadísticas Chile 2007)** y, en general, en todo el mundo.

Considerando la gran prevalencia de obesidad en la población y su relación con el desarrollo de patologías cardiovasculares, es de gran importancia comprender los mecanismos que relacionan el aumento de los lípidos con el daño producido a nivel cardíaco.

Una de las consecuencias de la obesidad es el estado de resistencia a la insulina, en el cual un nivel normal de esta hormona es insuficiente para producir una respuesta adecuada en los tejidos blancos, y se considera la antesala al desarrollo de la DM tipo 2 (**Goldstein 2002; Summers 2006**).

#### **1.4.1. Lipotoxicidad y resistencia a la insulina**

Originalmente, la resistencia a la insulina se definía desde una perspectiva glucocéntrica, considerándose la glucotoxicidad como la principal causa de daño, sin embargo, actualmente es bien reconocido que los niveles elevados de ácidos grasos también contribuyen al desarrollo de esta patología (**Kusminski et al. 2009; Mitra et al. 2008; Blaak 2005**). En estados de obesidad, la sobreacumulación de ácidos grasos de cadena larga puede superar la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo, causando el depósito de lípidos en tejidos como el hígado, músculo esquelético, corazón y páncreas (**Samuel & Shulman 2012**). Bajo estas circunstancias, el depósito lipídico en tejidos no diseñados para esta función puede tener efectos deletéreos, agrupados bajo el concepto de lipotoxicidad (**van Herpen & Schrauwen-Hinderling 2008; Summers 2006; Kusminski et al. 2009**). Este concepto fue introducido por el grupo del Dr. Unger (UT Southwestern Medical Center, Dallas), el cual ha investigado las consecuencias de la acumulación de lípidos y su relación con el síndrome metabólico y la DM2 (**Unger & Orci 2002; Unger et al. 2010; Kusminski et al. 2009**). Los lípidos que se encuentran en exceso pueden seguir vías metabólicas no oxidativas que resultan en la producción de derivados lipídicos reactivos que causan disfunción celular o promueven la muerte celular programada (lipoapoptosis) (**Kusminski et al. 2009**).

Asimismo, Unger *et al.* han rescatado el concepto de “corazón graso” o cardiomiopatía lipotóxica, condición producida por el depósito excesivo de lípidos en el tejido cardíaco. Esta patología ha sido prácticamente ignorada y no se conocen totalmente los mecanismos implicados en el defecto de la función cardíaca inducida por lipotoxicidad (**Szczepaniak et al. 2007**). Diversos estudios han mostrado que la sobreacumulación de lípidos en el tejido cardíaco puede conducir al desarrollo de cardiomiopatías o insuficiencia cardíaca (**Cheng et al. 2004; Zhou et al. 2000; Szczepaniak et al. 2007**).

En este contexto, diversos estudios han descrito que la acumulación de lípidos, principalmente en los músculos esquelético y cardíaco, tiene relación con el desarrollo de la resistencia a la insulina (**Guo 2007; Guo 2008; Chavez & Summers 2010; Zhang et al. 2010; Samuel et al. 2010**). Existe una correlación inversa entre el contenido lipídico intramiocelular y la sensibilidad a la insulina, siendo esta correlación más robusta que la de otros indicadores metabólicos, como el IMC o la razón cintura/cadera (**Virkamäki et al. 2001; Pan et al. 1997**). Se han propuesto dos mecanismos principales mediante los cuales el exceso lipídico altera el metabolismo de la glucosa. El primero se conoce como el ciclo de Randle o ciclo glucosa-ácidos grasos y se refiere a la competencia entre sustratos metabólicos, en la cual la utilización de un nutriente inhibe el uso del otro en forma directa y sin la mediación de hormonas (**Hue & Taegtmeier 2009; Guo 2007**). El segundo mecanismo sería a través de la producción de derivados de ácidos grasos (diacilgliceroles, ceramidas, etc.) que actuarían como moléculas de señalización, inhibiendo la vía transduccional de la insulina (**Chavez et al. 2003; Guo 2007; Zhang et al. 2010; Samuel et al. 2010; Chavez & Summers 2010; Summers 2006**).

### 1.5. Mitocondria

Las mitocondrias son organelos celulares rodeados de dos membranas, interna y externa, con un espacio intermembrana entre ellas. La membrana interna rodea la matriz mitocondrial y se encuentra plegada en crestas que contienen los complejos proteicos que participan en la cadena transportadora de electrones (**Chinnery & Schon**

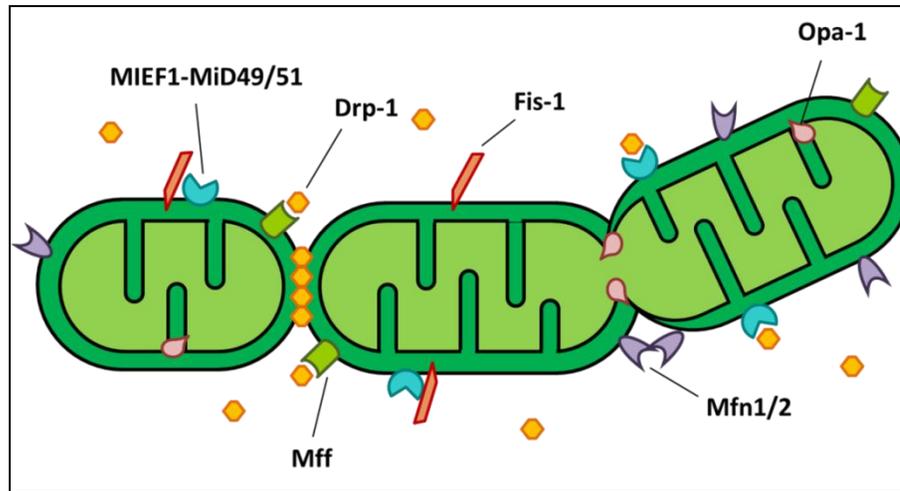
**2003)** necesaria para la síntesis de ATP (**Houtkooper & Vaz 2008**). Las mitocondrias cumplen diversas funciones relacionadas con el metabolismo energético, la señalización intracelular, el almacenamiento de calcio y la apoptosis, entre otras. En la mitocondria se produce la mayor parte del ATP celular derivado de la oxidación, a través del ciclo de Krebs, de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas (**Kuzmicic et al. 2011; Parra et al. 2011**).

### **1.5.1. Dinámica mitocondrial**

Las mitocondrias son organelos dinámicos que experimentan un proceso continuo de fusión y fisión, conocido como dinámica mitocondrial (**Liesa et al. 2009**). La morfología de la red mitocondrial depende del tipo celular y del estado metabólico de la célula, variando desde un estado de alta conectividad o hiperfusión de la red a un estado de elevada fragmentación. El correcto balance de los procesos de fusión y fisión es esencial para mantener la estabilidad de la red mitocondrial y su adecuada funcionalidad (**Detmer & Chan 2007; Parra et al. 2011; Kuzmicic et al. 2011**). Los procesos de fusión y fisión mitocondrial están altamente regulados y son llevados a cabo por maquinarias moleculares independientes.

### **1.5.2. Maquinaria de fusión mitocondrial**

La maquinaria de fusión mitocondrial está compuesta por Mitofusinas 1/2 (Mfn-1/2) y por Opa-1 (**Figura 2**). Todas ellas corresponden a GTPasas de alta masa molecular de la familia de las dinaminas (**Cipolat et al. 2004; Chen et al. 2005; Chen & Chan 2005; Chan 2006; Song et al. 2009; Hoppins et al. 2007**). Las Mfn-1/2 son proteínas integrales que median el anclaje y fusión entre las membranas externas de mitocondrias adyacentes (**Chan 2006; Hoppins et al. 2007**). Por su parte, Opa1 se localiza en la membrana mitocondrial interna, y además de mediar la fusión de estas membranas, participa en la mantención de la estructura de las crestas mitocondriales (**Frezza et al. 2006; Chan 2006; Liesa et al. 2009; Song et al. 2009**).



**Figura 2. Maquinaria molecular de la dinámica mitocondrial en células de mamíferos.**

Durante la fusión mitocondrial, las proteínas Mfn-1/2 se encargan del anclaje y fusión de las membranas mitocondriales externas, mientras que Opa-1 participa en la fusión de las membranas internas. Además, Opa-1 regula la estructura de las crestas mitocondriales. Durante el proceso de fisión, la GTPasa citosólica Drp-1 es reclutada hacia sitios definidos de división, donde se une a la proteína Mff, induciendo activamente la separación de las membranas mitocondriales. MiD49/51 regula negativamente la fisión mitocondrial secuestrando a Drp-1, mientras que Fis-1 favorece este proceso impidiendo la unión de MiD49/51 con Drp-1.

### 1.5.3. Maquinaria de fisión mitocondrial

La maquinaria clásica que regula la fisión de la red mitocondrial está compuesta por Fis-1, una proteína integral de la membrana externa, y por Drp-1, que corresponde a una GTPasa de la familia de las dinaminas (**Figura 2**) (**Chan 2006; Hoppins et al. 2007**). Drp-1 se encuentra principalmente en el citosol, sin embargo una pequeña porción tiene una distribución puntiforme en la membrana mitocondrial externa, marcando los futuros sitios de fisión (**Chan 2006**). Al momento de producirse la división del organelo, Drp-1 se recluta a la membrana mitocondrial externa, donde se uniría a Fis-1, formando anillos alrededor del organelo que se estrechan hasta lograr su separación en dos unidades (**Chan 2006; Liesa et al. 2009**).

En levaduras, Fis-1 interactúa con Dnm-1 (homóloga de Drp-1) a través de las proteínas adaptadoras Mdv1p/Caf4p, sin embargo en mamíferos no se ha podido demostrar la interacción entre Fis-1 y Drp-1, ni se han encontrado homólogos de Mdv1p/Caf4p (**Okamoto & Shaw 2005**). No obstante, en mamíferos se han descrito nuevas proteínas que conformarían la maquinaria de fisión mitocondrial (**Dikov & Reichert 2011**). Una de ellas es la proteína Mff (*Mitochondrial fission factor*) que actúa como receptor directo de Drp-1 en la membrana mitocondrial externa, promoviendo el proceso de fisión de la red mitocondrial independiente de Fis-1 (**Otera et al. 2010; Otera & Mihara 2011**). Otros componentes de este nuevo modelo son las proteínas MiD 49 y MiD 51 (también conocida como MIEF1), que unen a Drp-1, secuestrándola e impidiendo su unión con Mff, y por lo tanto inhibiendo la fisión mitocondrial (**Palmer et al. 2011; Zhao et al. 2011; Dikov & Reichert 2011**). En este modelo, Fis-1 favorecería la fisión mitocondrial uniéndose a MiD49/51 e impidiendo su acción inhibitoria sobre Drp-1 (**Zhao et al. 2011; Dikov & Reichert 2011**).

#### 1.5.4. Estructura y regulación de Drp-1

Drp-1 consta de un dominio GTPasa N-terminal, un dominio central, un dominio variable por *splicing* alternativo y un dominio GED (*GTPase effector domain*) C-terminal (**Smirnova et al. 1998**). El dominio GED participa en interacciones intra e intermoleculares, regulando la formación de oligómeros y la actividad GTPasa de Drp-1 (**Cribbs & Strack 2007**). Esta proteína actúa formando homo-oligómeros en forma de anillo helicoidal en torno a la membrana mitocondrial, constriñéndola gracias a la energía obtenida de la hidrólisis de GTP, hasta lograr su separación (**Chan 2006; Smirnova et al. 1998**).

La función de Drp-1 se regula principalmente mediante modificaciones post-traduccionales que afectan su translocación a la membrana mitocondrial y/o su actividad GTPasa. Entre las modificaciones descritas para Drp-1 se encuentran la ubiquitinación (**Nakamura et al. 2006; Yonashiro et al. 2006; Karbowski et al. 2007; Park et al. 2010**), SUMOilación (**Harder et al. 2004; Zunino et al. 2007; Figueroa-Romero et al. 2009**) y fosforilación (**Chang & Blackstone 2007; Cereghetti et al.**

**2008; Taguchi et al. 2007; Han et al. 2008; Cribbs & Strack 2007**). De estas modificaciones, la más estudiada es la fosforilación/desfosforilación mediada por proteína kinasa A (PKA)/Fosfatasa calcineurina en el residuo Ser<sup>637</sup> de la proteína humana (**Cribbs & Strack 2007; Chang & Blackstone 2007; Cereghetti et al. 2008**). La fosforilación de este residuo lleva a la inactivación de Drp-1, favoreciendo así el proceso de fusión mitocondrial, mientras que su desfosforilación tiene el efecto opuesto, favoreciendo la fisión.

### **1.6. Función y dinámica mitocondrial y su relación con insulina**

Recientemente nuestro laboratorio ha mostrado que la insulina estimula la fusión mitocondrial en cardiomiocitos, con un efecto máximo a las 3 h de tratamiento, y que este proceso se asocia con un aumento en parámetros metabólicos mitocondriales, tales como el potencial mitocondrial, el contenido de ATP celular y el consumo de oxígeno (**Parra 2011**). Ambos eventos están relacionados, ya que al alterar la fusión mitocondrial disminuyendo la expresión de Mfn-2, se inhibe el efecto de la insulina sobre los parámetros metabólicos (**Parra 2011**). La fusión mitocondrial causada por la estimulación con insulina es dependiente de la acción de Akt y de mTOR, ya que al inhibir estas proteínas se pierde el efecto sobre la dinámica mitocondrial (**Parra 2011**).

Así como la insulina favorece la fusión y función mitocondrial, también se ha descrito una conexión entre la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina, aunque la relación causa-efecto entre ambos fenómenos no está muy clara (**Turner & Heilbronn 2008; Dumas et al. 2009; Schrauwen et al. 2010; Szendroedi et al. 2012; Kim et al. 2008; Brands et al. 2012**). Se ha observado que personas resistentes a la insulina presentan disfunción mitocondrial, determinada por una menor capacidad oxidativa y de fosforilación de las mitocondrias aisladas desde biopsias musculares (**Kelley et al. 2002**) o por mediciones *in vivo* (**Petersen et al. 2003**). Además, en pacientes diabéticos las mitocondrias presentan un menor tamaño (**Kelley et al. 2002**).

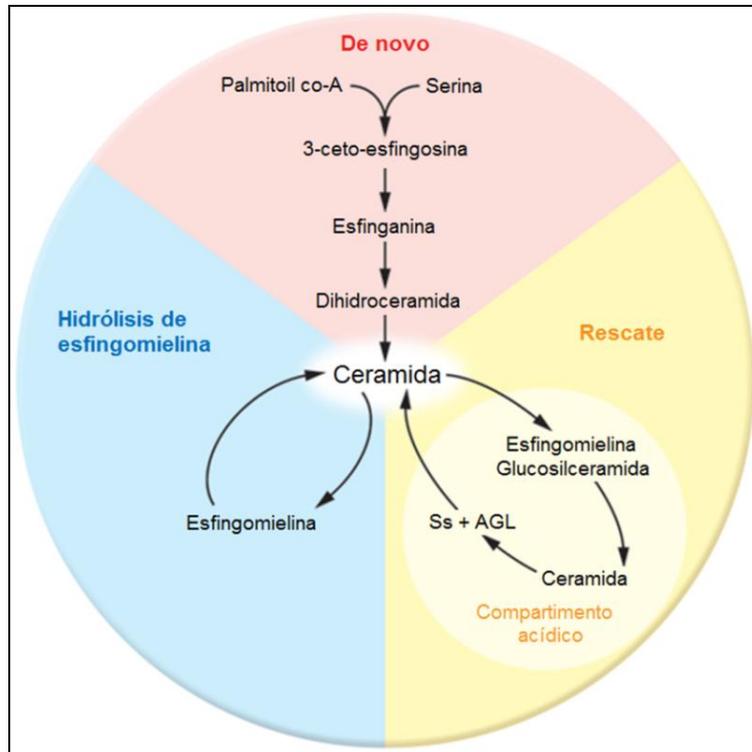
Se desconoce con certeza si la disfunción mitocondrial es una causa o consecuencia de la resistencia a la insulina, sin embargo, es evidente que este

fenómeno contribuye con la progresión de la enfermedad, ya que al haber una menor capacidad oxidativa, se favorece la acumulación de lípidos en los tejidos (**Summers 2006**). Zorzano *et al.* han planteado la hipótesis de que la relación entre la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina estaría mediada por alteraciones en la dinámica mitocondrial (**Zorzano et al. 2009a**), ya que se ha observado que personas con resistencia a la insulina presentan niveles reducidos de Mfn-2 en músculo esquelético, existiendo además una correlación positiva entre la expresión de Mfn-2 y la sensibilidad a insulina (**Bach et al. 2005**). Sin embargo, se desconocen los mecanismos que existen detrás de esta relación y no se descarta que pueda haber más factores involucrados.

### **1.7. Ceramidas: estructura y síntesis**

Las ceramidas son lípidos que constituyen la estructura básica precursora de los esfingolípidos, familia en la que se encuentran, además, las esfingomielinas, los glicolípidos y los gangliósidos. Los esfingolípidos forman parte de las membranas biológicas, y se ubican preferentemente en la cara extracelular de la membrana plasmática. Estructuralmente, las ceramidas constan de una molécula de ácido graso, generalmente de cadena larga o muy larga, unida mediante un enlace amida a una molécula de esfingosina (**Hannun & Obeid 2011**).

Existen tres vías para la síntesis de ceramidas (**Figura 3**). La más importante se conoce como vía *de novo* y ocurre principalmente en el retículo endoplásmico. En esta vía, el palmitoil-CoA y la serina se condensan para dar origen a una molécula de 3-ceto-dihidroesfingosina, mediante la acción de la serina-palmitoil transferasa (SPT). A continuación, la 3-ceto-dihidroesfingosina es reducida a dihidroesfingosina (esfinganina) por acción de la 3-ceto-dihidroesfingosina reductasa. En el paso siguiente, la ceramida sintasa cataliza la condensación de la dihidroesfingosina con una molécula de acil-CoA, formando una molécula de dihidroceramida. Finalmente, la ceramida se forma por acción de la dihidroceramida desaturasa sobre la dihidroceramida.



### Figura 3. Vías de síntesis de las ceramidas

La vía de síntesis de ceramidas *de novo* depende del suministro de palmitato y serina como sustratos de la etapa limitante. Las ceramidas también pueden derivarse de la hidrólisis de esfingomielinas por la acción de distintas isoformas de esfingomielinasas. La vía de síntesis de rescate utiliza como sustratos los derivados de la hidrólisis de diversos esfingolípidos. Ss: Esfingosina, AGL: Ácidos grasos libres. Adaptado de Bikman y cols (**Bikman & Summers 2011**).

La adición de la segunda molécula de ácido graso no es selectiva, e involucra tanto ácidos grasos saturados como insaturados, con un largo de cadena no menor a 12 carbonos. La primera reacción de esta vía es la etapa limitante y depende del suministro de palmitoil-CoA (**Summers 2006; Hannun & Obeid 2011**). Por lo tanto, un aumento general de los lípidos del organismo, principalmente de palmitato, incrementa los niveles de ceramidas.

Las ceramidas no constituyen una única entidad molecular, sino que corresponden a una familia de moléculas relacionadas. La variabilidad en la estructura de las

ceramidas está dada por la especificidad relativa de las enzimas involucradas en su metabolismo por sus sustratos o productos **(Hannun & Obeid 2011)**. Así, para cada etapa de la síntesis de las ceramidas, existen distintas isoformas enzimáticas con especificidad por diferentes largos de cadena de los grupos acilo. Más aún, las enzimas involucradas en el metabolismo de las ceramidas tienen diversas localizaciones intracelulares, otorgando una variante de compartimentalización a la acción de las ceramidas **(Hannun & Obeid 2011)**. Debido a su naturaleza hidrofóbica, las ceramidas tienden a mantenerse dentro de la membrana en la cual fueron generadas, a menos que sean transportadas entre distintos sistemas membranosos por transportadores específicos, como la proteína de transferencia de ceramidas, CERT **(Hanada et al. 2007; Hanada 2006; Kumagai et al. 2005; Perry & Ridgway 2005)**.

#### **1.7.1. Rol de las ceramidas en estrés y resistencia a la insulina**

Originalmente, se creía que las ceramidas y sus derivados eran componentes estructurales pasivos de las membranas celulares, sin embargo diversos estudios han demostrado que los esfingolípidos son importantes reguladores involucrados de forma activa en numerosas vías de transducción de señales que median funciones celulares críticas, como la respuesta al estrés, diferenciación, adhesión, migración, inflamación, tráfico intracelular, crecimiento y muerte celular **(Yang et al. 2004; Gulbins & Li 2006; Hannun & Obeid 2008; Mathias et al. 1998; Hannun & Obeid 2002)**.

Las ceramidas y sus derivados se producen durante diversos procesos de estrés celular, ya sea por síntesis *de novo* o por acción de las esfingomielinasas, y se ha demostrado que actúan como segundos mensajeros para el receptor de muerte Fas, el factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , interleukina 1 y otras citoquinas y señales extracelulares, usualmente con resultado de detención del ciclo celular o apoptosis **(Hannun & Obeid 2008; Yang et al. 2004)**.

Algunos de los efectos de las ceramidas podrían estar mediados por cambios en la estructura local de las membranas donde son generadas **(Stancevic & Kolesnick**

**2010; Zheng et al. 2006).** Las ceramidas tienden a autoagregarse, induciendo separaciones laterales de fases en la membrana y la formación de macrodominios enriquecidos en ceramidas que pueden alterar la permeabilidad y la curvatura de las membranas, lo cual facilitaría procesos de fusión y fisión **(Stancevic & Kolesnick 2010)**. Además, los dominios enriquecidos en ceramidas proveen de una plataforma para la reorganización y compartimentalización de receptores y moléculas de señalización que facilitarían la amplificación de las señales luego de un estímulo **(Stancevic & Kolesnick 2010)**.

Diversos estudios han relacionado a las ceramidas con la resistencia a la insulina **(Chavez & Summers 2012; Holland et al. 2007a; Holland et al. 2007b; Holland & Summers 2008; JeBailey et al. 2007)**. En personas obesas y resistentes a la insulina existe una acumulación de ceramidas en músculo esquelético, al compararlas con personas delgadas y con sensibilidad normal a la insulina **(Adams et al. 2004; Amati et al. 2011)**, existiendo una correlación negativa entre el contenido de ceramidas en músculo y la sensibilidad sistémica a la insulina **(Strackowski et al. 2004)**, y una correlación positiva entre el contenido de ceramidas en músculo y la glicemia **(Ussher et al. 2010)**. Por otra parte, al tratar la resistencia a la insulina farmacológicamente **(Planavila et al. 2005)** o mediante ejercicio físico **(Dobrzyn et al. 2004; Dobrzyn et al. 2004; Dubé et al. 2011)** se reduce significativamente el contenido de ceramidas en los músculos esquelético y cardiaco.

Con respecto al mecanismo mediante el cual las ceramidas alteran la vía de señalización de la insulina, se han descrito efectos a nivel de IRS o de PI-3K **(Summers 2006)**. Hace 15 años, dos grupos de investigación independientes mostraron que las ceramidas inhiben la fosforilación en Tyr de IRS-1 en respuesta a la insulina, en líneas celulares mieloides, adiposas y de hepatoma, alterando así la vía de señalización a través de PI-3K **(Kanety et al. 1996; Peraldi et al. 1996)**. Posteriormente se demostró que la disminución de la fosforilación en Tyr de IRS-1 era causada por un aumento de su fosforilación en residuos de Ser/Thr en respuesta a las ceramidas, teniendo estas modificaciones un efecto inhibitorio de la interacción entre IRS-1 y el receptor de insulina, impidiendo así la fosforilación en Tyr **(Paz et al. 1997)**.

Los resultados con respecto al efecto de las ceramidas sobre IRS-1 o PI-3K no han sido consistentes, ya que varían según el modelo de estudio. La mayoría de las investigaciones muestran un efecto inhibitorio directo de las ceramidas sobre la fosforilación de Akt (**Summers et al. 1998; Zhou et al. 1998**). Dos mecanismos independientes se han descrito mediante los cuales las ceramidas disminuyen la activación de Akt (**Stratford et al. 2004; Chavez & Summers 2012**). El primero consiste en una activación directa de la proteína fosfatasa PP2A (**Dobrowskyss et al. 1993**), la cual tiene una acción predominante en la desfosforilación e inactivación de Akt. El segundo mecanismo implica el bloqueo de la translocación de Akt a la membrana plasmática para su consiguiente activación (**Stratford et al. 2001**). Este evento se produce a consecuencia de la activación de la proteína quinasa PKC $\zeta$ , la cual fosforila a Akt en el dominio PH (residuo Thr<sup>34</sup>), impidiendo su unión a PIP<sub>3</sub> (**Powell et al. 2003; Powell et al. 2004**). Estos mecanismos no son universales y pueden presentarse, uno o ambos, dependiendo del tipo celular en estudio (**Summers 2006; Chavez & Summers 2012**).

### 1.7.2. Papel de las ceramidas en la disfunción y fisión de la red mitocondrial

A pesar de que la síntesis *de novo* de ceramidas ocurre principalmente en el retículo endoplásmico, varias enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo de las ceramidas se encuentran en la mitocondria, por lo que también existe una regulación endógena de los niveles de ceramidas y sus metabolitos dentro de este organelo (**Siskind 2005; Bionda et al. 2004; Summers 2006**).

Las ceramidas alteran la función mitocondrial, inhibiendo al complejo III de la cadena transportadora de electrones, y favoreciendo la producción de ROS en mitocondrias aisladas (**Andrieu-Abadie et al. 2001; García-Ruiz et al. 1997; Gudz et al. 1997**). Asimismo, las ceramidas alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, induciendo la translocación de Bax, proteína relacionada con procesos de apoptosis (**Summers 2006**) o directamente a través de la formación de canales en la membrana mitocondrial externa (**Siskind 2005**). Además, las ceramidas

de cadena corta inducen la liberación de citocromo c desde mitocondrias aisladas **(Ghfourifar et al. 1999)**. En ratones alimentados con dietas altas en lípidos, la inhibición de la síntesis *de novo* de ceramidas, además de mejorar la sensibilidad a la insulina, recupera la tasa de consumo de oxígeno a nivel sistémico, lo que se relaciona con una mejor función mitocondrial **(Ussher et al. 2010)**.

Por otra parte, nuestros estudios han mostrado que el tratamiento con ceramidas de cadena corta (C<sub>2</sub>-ceramida) fragmenta la red mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos **(Parra et al. 2008)**. Adicionalmente, las ceramidas producen una caída del potencial de membrana mitocondrial en este modelo **(Parra et al. 2008)**. Otro de nuestros trabajos en curso busca establecer una relación entre la lipotoxicidad inducida por palmitato, precursor de las ceramidas, y alteraciones en la dinámica y función mitocondrial y la respuesta a insulina (Tesis doctoral J. Kuzmicic, en curso **(Kuzmicic 2011)**).

Los antecedentes presentados plantean la interrogante de si existe alguna relación entre la disfunción y alteración de la morfología de la red mitocondrial y la resistencia a la insulina inducida por el tratamiento con ceramidas de cadena corta en cardiomiocitos. La elección de este modelo busca encontrar un posible mecanismo de lipotoxicidad de las ceramidas que explique el compromiso cardiaco en personas con obesidad y/o resistencia a la insulina.

Por otra parte, ya que se desconoce con certeza la relación causa-efecto entre la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina, se plantea la hipótesis de que las ceramidas, además de alterar directamente la vía de señalización de la insulina, producen resistencia de forma indirecta mediante la alteración de la dinámica y función mitocondrial.

De acuerdo con lo anterior, se plantean algunas interrogantes aún no dilucidadas y que reflejan el estado en que se encuentra esta área de la investigación, en particular en las células cardiacas:

- Se relaciona el fenotipo de fragmentación mitocondrial inducido por ceramidas con alteraciones directas a nivel de la maquinaria de fusión/fisión mitocondrial? ¿
  
- La alteración en la dinámica mitocondrial inducida por ceramidas tienen algún efecto sobre la respuesta a insulina? ¿
  
- ¿Es posible rescatar la sensibilidad a la insulina alterada por las ceramidas manipulando la dinámica mitocondrial?

## **2. HIPÓTESIS**

“Las ceramidas regulan negativamente la respuesta a insulina en cardiomiocitos de ratas neonatas a través de la fragmentación de la red mitocondrial mediada por Drp-1”.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el rol de la dinámica mitocondrial en la disminución de la respuesta a insulina mediada por las ceramidas en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto de las ceramidas sobre la respuesta a insulina, la morfología mitocondrial y la translocación de Drp-1 a la mitocondria.
- Determinar si existe prevención del fenotipo de fragmentación de la red mitocondrial y la disminución de la respuesta a insulina inducidos por ceramidas mediante la expresión de un dominante negativo de Drp-1.
- Estudiar el papel de las ceramidas como mediadores de los efectos nocivos de palmitato en cardiomiocitos.

## 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), insulina, palmitato. El cocktail inhibidor de proteasas cOmplete Mini (11 836 170 001) y el cocktail inhibidor de fosfatasa PhosSTOP (04 906 837 001) se adquirieron en Roche Applied Science (Penzberg, Alemania). La C<sub>2</sub>-ceramida (N-acetil-D-eritro-esfingosina; 110145), dihidro-C<sub>2</sub>-ceramida (N-acetil-D-eritro-esfingosina-dihidro; 219537), mdivi-1 (Mitochondrial división inhibitor, 475856) y los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, Ca, EEUU). Fumonisina B1 (3103) se adquirió en Tocris Biosciences (Minneapolis, EEUU). 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). En Cell Signalling (Danvers, MA, EEUU) se obtuvieron los anticuerpos anti Akt fosforilada (Ser<sup>473</sup>; cat. 9271) y anti Akt (9272). El anticuerpo anti ceramidas (ALX-804-196) se compró en Enzo Life Sciences (NY, EEUU). De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron: colagenasa tipo II, suero fetal bovino (FBS) y suero de ternera (FCS). Mitotracker Green-FM (M7514) 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). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot EZ-ECL (20-500-1000) se adquirió en Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU). La albúmina de suero bovino (BSA) se adquirió en Winkler Ltda. (Santiago, Chile). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). Finalmente, el adenovirus Drp-1K38A

fue facilitado por el Dr. Antonio Zorzano (Institute of Research in Biomedicine, Barcelona Science Park, Universitat de Barcelona, España).

## **5.2. Modelo experimental**

Para la ejecución de esta tesis se utilizó como modelo experimental cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas, 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. 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 y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## **5.3. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas**

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, los corazones de ratas neonatas se removieron y lavaron en medio Hank's estéril a 37 °C. Las aurículas se eliminaron y los ventrículos se disgregaron mecánicamente para ser sometidos a digestiones enzimáticas sucesivas con colagenasa tipo II (0,02 gr/100 mL Hank's) y pancreatina (0,06 gr/100 mL Hank's). Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial a superficies plásticas que presentan los dos tipos celulares presentes en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos). El producto de la digestión enzimática se pre-plaqueó en placas de 100 mm durante 2 h a 37 °C en medio DME:M199 (4:1) (Medio de mantención, MM) 10% FBS. Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron, se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 5 min y se resuspendieron en 20 mL de MM 5% FBS y 10% FCS. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán, el cual permite visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer.

Conocida su concentración, los cardiomiocitos se sembraron en MM 5% FBS-10% FCS a distintas densidades, según las necesidades experimentales, en presencia de 5-

bromo-2'-deoxiuridina 100  $\mu\text{M}$ , sobre placas de cultivo cubiertas previamente con una monocapa de gelatina (2% p/v). Las células se mantuvieron en incubadores termostregulados a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% aire. Luego de aproximadamente 24 h las células se lavaron para retirar los residuos propios del cultivo primario y se mantuvieron en MM 5% FBS al menos por 24 h antes de exponerlos a cualquier estímulo.

#### **5.4. Estímulo con $\text{C}_2$ -ceramida o palmitato**

Las células, mantenidas en MM 5% FBS, se trataron con  $\text{C}_2$ -ceramida 40  $\mu\text{M}$  (o con el análogo inactivo dihidro- $\text{C}_2$ -ceramida 40  $\mu\text{M}$ ) o con un conjugado de palmitato/BSA 500  $\mu\text{M}$  durante 3 h. Para evaluar la respuesta a insulina, en los últimos 15 min de estímulo se adicionó insulina 10 nM al medio de cultivo. Los inhibidores se agregaron 30 min antes y se mantuvieron a lo largo de los estímulos, a las concentraciones indicadas para cada uno de ellos.

#### **5.5. Transducción adenoviral**

Los cardiomiocitos se transdujeron con el adenovirus recombinante que expresa una proteína dominante negativo para Drp-1 (Drp-1K38A) a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.000 partículas virales por célula 48 h antes de recibir los estímulos. Como control de infección se utilizó un adenovirus que codifica para la enzima bacteriana  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) a los mismos tiempos y concentraciones que el adenovirus Drp-1K38A.

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

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células/placa. Una vez finalizado el estímulo, las células se lavaron tres veces con solución de PBS fría y luego se lisaron con 80  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1%; tritón X-100 1% v/v) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasa (Roche). El

homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 20 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo y se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU). Finalmente el extracto se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x, para ser almacenado posteriormente a -20°C.

### **5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas**

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, se cargaron alrededor de 30 µg de extracto proteico total. El gel concentrador se preparó al 3% y el separador al 10% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%) a un voltaje constante de 80 V durante 30 min y luego a 100 V hasta el final de la corrida electroforética.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, EEUU) de 0,45 µm a amperaje constante de 400 mA por 90 min en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM).

### **5.8. Western blot**

Una vez realizada la electrotransferencia, las 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 el anticuerpo primario anti Akt fosforilada a una dilución de 1:500 en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1 %; leche descremada 5% p/v) toda la noche a 4°C y con agitación suave. Luego, las membranas se lavaron durante 15 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanito a una dilución de 1:5.000 en tampón de incubación. Para la detección, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL y se

expusieron en una película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron mediante el programa computacional USI Scan. Después de realizar los ensayos de Western 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 en las cantidades de proteínas cargadas en el gel, se analizaron los niveles de Akt total, mediante reacciones de inmunodetección iguales a las descritas anteriormente.

### **5.9. Inmunofluorescencia indirecta**

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de  $0,25 \times 10^6$  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, para determinar la distribución subcelular de las proteínas de fisión mitocondrial y la morfología de este organelo, las células se incubaron con los anticuerpos anti-Drp-1 (dilución 1:500) y anti-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 por 1 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz con el anticuerpo secundario Alexa 488 o 568, anti IgG de ratón o anti IgG de conejo, según corresponda (dilución 1:500). Por otro lado, para determinar la producción de ceramidas por palmitato las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-ceramidas (dilución 1:100) en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje, el cual además retarda el decaimiento de la fluorescencia. Posteriormente, las preparaciones 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) como se describe en detalle más adelante.

### **5.10. Visualización de la morfología mitocondrial**

Luego de finalizados los estímulos correspondientes, los cardiomiocitos se lavaron tres veces con solución tampón Krebs (NaCl 145 mM; KCl 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,6 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; Hepes 10 mM; Glucosa 5,6 mM) y luego se incubaron por 25 min a 37°C con la sonda Mitotracker Green-FM 400 nM preparada en la misma solución, a partir de un stock al 20% en DMSO. Luego de la incubación, las células se lavaron nuevamente con solución Krebs y los cubreobjetos se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 µL de solución Krebs.

Posteriormente, utilizando un microscopio confocal invertido Carl Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert equipado con una cámara enfriada CCD y un sistema de adquisición de imágenes LSM, se observó la fluorescencia de la red mitocondrial mediante la excitación con 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 0,4 µm, siendo cada secuencia de 10 imágenes. Se utilizó el lente objetivo de 63x el cual posee una apertura numérica de 1,4. Las dimensiones de las imágenes fueron de 1024 x 1024 pixeles.

### **5.11. Análisis digital de imágenes**

Una vez obtenidas las secuencias de imágenes con la sonda MTG éstas se deconvolucionaron, mediante el software Image J, para eliminar la fluorescencia fuera de foco, usando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (*Point Spread Function*) correspondiente a las condiciones experimentales. Al finalizar la deconvolución se cuantificó el número de partículas teñidas con MTG (número de objetos), así como su volumen promedio, utilizando el programa accesorio 3D Object Counter para Image J.

La cuantificación digital de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta se realizó, sobre las imágenes deconvolucionadas, analizando los coeficientes de Manders para cada una de las señales fluorescentes en estudio y asociadas a dos canales diferentes en el microscopio confocal, para lo cual se utilizó el programa accesorio Colocalization Finder para Image J. Para la semi-cuantificación de las ceramidas producidas por la adición de palmitato a las células se determinó la fluorescencia total relativizada por el área celular, mediante el programa Image J.

### **5.12. 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 de Dunnet para determinar la significancia estadística de los resultados, o mediante el test t de Student cuando corresponda, considerándose como significativo un  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

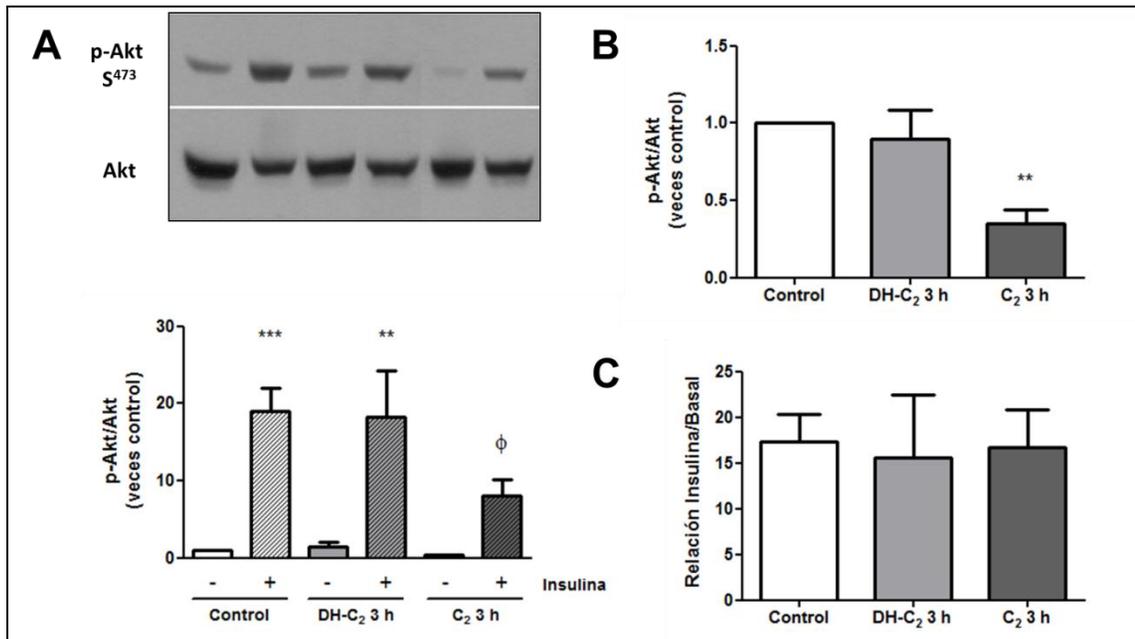
Para dar respuesta al primer objetivo específico, se procedió a evaluar el efecto de las ceramidas sobre la respuesta a insulina y la morfología mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

### 6.1. Efecto de las ceramidas sobre la fosforilación de Akt en respuesta a insulina

Se ha descrito ampliamente en la literatura que las ceramidas actúan como mediadores de la resistencia a la insulina, principalmente en músculo esquelético, afectando directamente la fosforilación de la proteína kinasa Akt en respuesta a esta hormona (**Chavez & Summers 2012; Stratford et al. 2004**). En este objetivo, se evaluaron los efectos de las ceramidas sobre la vía de señalización de la insulina, particularmente a nivel de la fosforilación de Akt, en nuestro modelo de cultivo primario de cardiomiocitos. Para este fin, las células se estimularon con ceramidas de cadena corta (C<sub>2</sub>-ceramida), capaces de atravesar la membrana plasmática, a una concentración de 40 µM, de acuerdo a lo utilizado en la literatura, durante 3 h. Para descartar el posible efecto detergente de las ceramidas sobre las membranas biológicas, se utilizó como control la dihidro-C<sub>2</sub>-ceramida (DH-C<sub>2</sub>-ceramida), un precursor de las ceramidas con una estructura química muy similar, que no tiene efectos biológicos por sí misma (**Bielawska et al. 1993**). Para la evaluación de la respuesta a insulina, en los últimos 15 min del estímulo con C<sub>2</sub>-ceramida se agregó un pulso de insulina 10 nM, similar a la concentración postprandial. Los niveles de Akt fosforilada (p-Akt) en Ser<sup>473</sup> y Akt total se determinaron mediante Western blot.

En la **Figura 4A** se observa una imagen representativa de los resultados obtenidos. Ya a nivel basal hay un efecto importante de la C<sub>2</sub>-ceramida sobre la fosforilación de Akt, reduciéndola considerablemente. En la **Figura 4B** se presenta la cuantificación de este efecto. En respuesta al pulso de insulina se observa un aumento en los niveles de p-Akt en la situación control, sin embargo este aumento disminuye considerablemente

cuando las células son pre-tratadas con C<sub>2</sub>-ceramida (**Figura 4A**), evidenciando una desensibilización de la vía de señalización de la insulina. La DH-C<sub>2</sub>-ceramida no tiene



**Figura 4. Efecto de la C<sub>2</sub>-ceramida sobre la fosforilación de Akt en respuesta a insulina.**

**(A)** Extractos totales de proteínas de cardiomiocitos tratados con C<sub>2</sub>-ceramida 40 μM durante 3 h, o con el análogo inactivo DH-C<sub>2</sub>-ceramida en las mismas condiciones, y luego sometidos a un pulso de insulina 10 nM de 15 min. Los niveles de Akt fosforilada (p-Akt) en Ser<sup>473</sup> y de Akt total se determinaron mediante Western blot. Se observa una imagen representativa y la cuantificación de la relación p-Akt/Akt en estado basal y en respuesta a insulina para cada condición. **(B)** Cuantificación de la relación p-Akt/Akt en estado basal para cada condición. **(C)** Veces de incremento de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina con respecto al estado basal para cada condición. C<sub>2</sub>: C<sub>2</sub>-ceramida; DH-C<sub>2</sub>: Dihidro-C<sub>2</sub>-ceramida; S: Serina. \*\*p<0,01 vs control; \*\*\* p<0,001 vs control; <sup>ϕ</sup> p<0,05 vs Insulina; N=5.

un efecto apreciable en la fosforilación de Akt, ya sea a nivel basal o en respuesta a la insulina (**Figuras 4A-B**).

El hecho de que las ceramidas disminuyan la fosforilación basal de Akt puede inducir a pensar que la respuesta a insulina, entendiéndose como el incremento de la fosforilación de Akt por insulina con respecto a la situación basal, no se vea alterada, y que el efecto observado se deba a una reducción en el tono general de Akt. Debido a

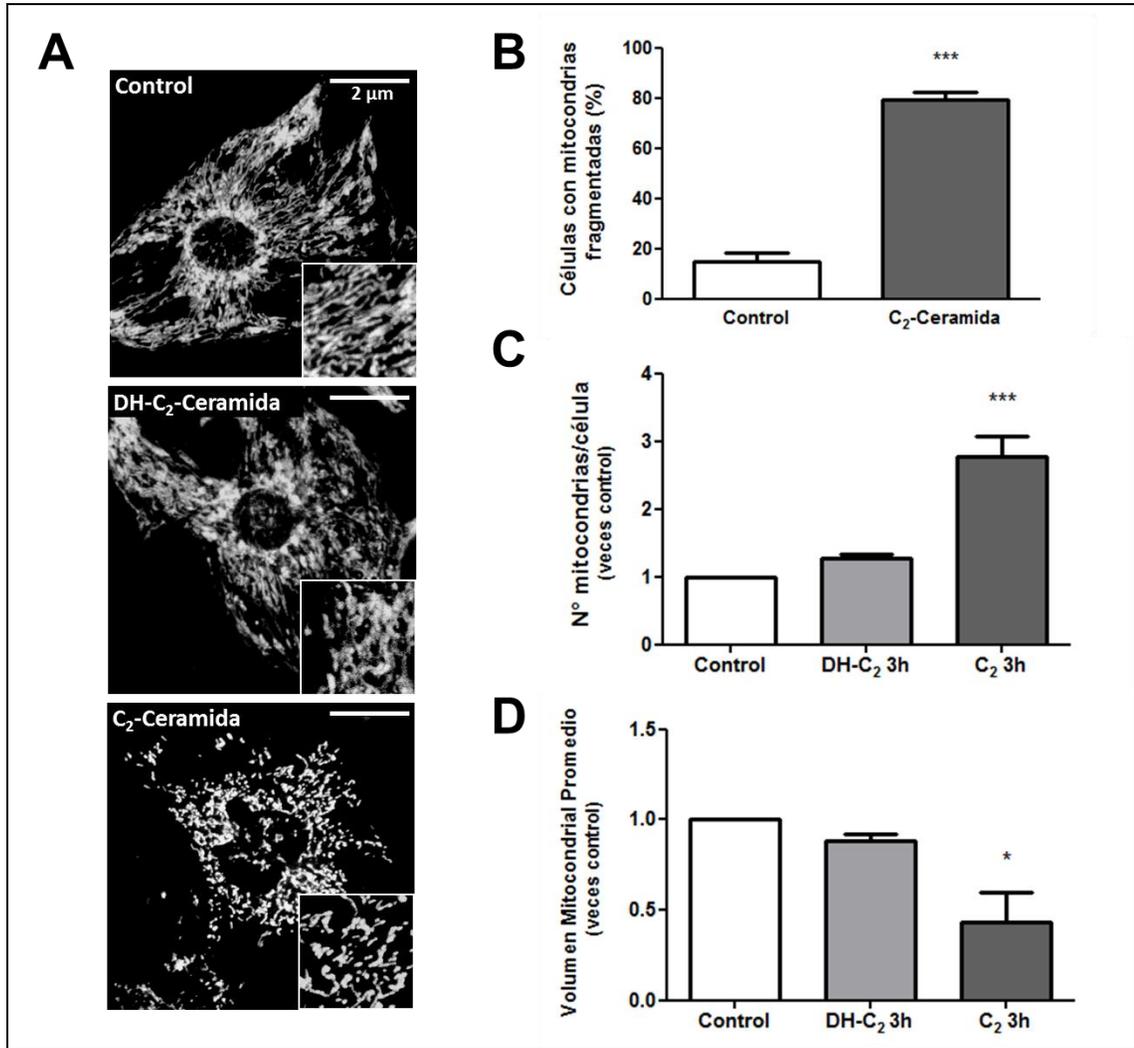
esto se cuantificó la relación entre la fosforilación de Akt al estimular con insulina versus la fosforilación basal para cada condición (**Figura 4C**). Al tratar las células con C<sub>2</sub>-ceramida no se observan diferencias en la respuesta a insulina, sin embargo, es probable que los efectos finales de la insulina (aumento en la captación de glucosa, consumo de oxígeno, etc.) se vean afectados por el pre-tratamiento con ceramidas.

## 6.2. Efecto de las ceramidas sobre la dinámica mitocondrial

Previamente, nuestro laboratorio mostró que las ceramidas fragmentan la red mitocondrial en cardiomiocitos como un proceso previo a la muerte celular (**Parra et al. 2008**). La segunda parte de este objetivo busca determinar si las ceramidas también favorecen la fisión mitocondrial en las condiciones en las que se observa una disminución de la fosforilación de Akt. Con este fin se trataron los cardiomiocitos con C<sub>2</sub>-ceramida 40 μM por 3 h o con DH-C<sub>2</sub>-ceramida en las mismas condiciones, luego las células se tiñeron con la sonda vital Mitotracker Green y se realizaron reconstrucciones 3D de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

La **Figura 5A** muestra una imagen representativa de la morfología mitocondrial observada para cada condición, donde se puede apreciar la marcada fragmentación de la red mitocondrial producida por la C<sub>2</sub>-ceramida, mientras que las células tratadas con DH-C<sub>2</sub>-ceramida presentan una morfología similar al control. Conjuntamente, se determinó el porcentaje de células que presentan este fenotipo de fragmentación, alcanzando cerca de un 80% en las células tratadas con C<sub>2</sub>-ceramida versus un 15% en los controles (**Figura 5B**). Para obtener una perspectiva más objetiva de este fenotipo, se cuantificó este efecto mediante el software Image J, obteniendo los parámetros de número de mitocondrias por célula y volumen mitocondrial promedio. De esta forma, se determinó que el tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida aumenta significativamente el número de partículas mitocondriales por célula (**Figura 5C**) junto con una disminución en el volumen promedio de estas partículas (**Figura 5D**), lo que en conjunto evidencia un predominio del proceso de fisión mitocondrial. En esta cuantificación, también se puede observar que el tratamiento con DH-C<sub>2</sub>-ceramida no produce cambios significativos con respecto al control.





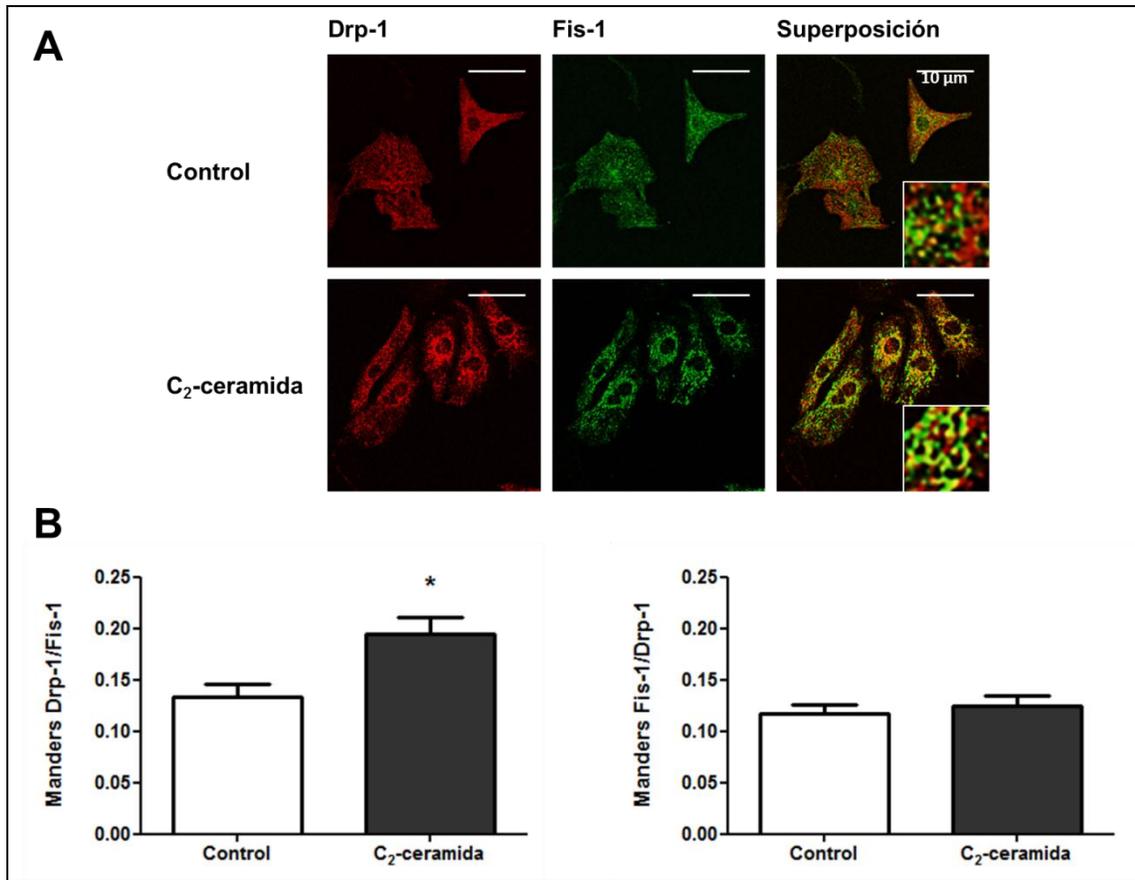
**Figura 5. Efecto de la C<sub>2</sub>-ceramida sobre la morfología mitocondrial.**

(A) Reconstrucción tridimensional de la red mitocondrial de cardiomiocitos tratados con C<sub>2</sub>-ceramida 40  $\mu\text{M}$  durante 3 h, o con el análogo inactivo DH-C<sub>2</sub>-ceramida en las mismas condiciones. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal luego de teñir las células con la sonda vital Mitotracker Green. (B) Cuantificación del porcentaje de células que presentan una red mitocondrial fragmentada. (C) Cuantificación del número de partículas mitocondriales por célula. (D) Cuantificación del volumen mitocondrial promedio para cada condición. C<sub>2</sub>: C<sub>2</sub>-ceramida; DH-C<sub>2</sub>: Dihidro-C<sub>2</sub>-ceramida. \* $p < 0,05$  vs control; \*\*\* $p < 0,001$  vs control; N=3 (excepto B con N=5).

El fenotipo de fragmentación de la red mitocondrial causado por el tratamiento con ceramidas puede deberse tanto a una disminución del proceso de fusión como a un aumento en el proceso de fisión. Debido a que el proceso de fisión mitocondrial está determinado principalmente por la translocación de Drp-1 desde el citosol hacia la mitocondria, se evaluó mediante inmunocitoquímica la colocalización entre Drp-1 y Fis-1, como marcador mitocondrial, como una estrategia para cuantificar este proceso de translocación. Los estudios de colocalización mostraron que existe un aumento en el coeficiente de Manders para la proteína Drp-1 luego del tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida 40 µM por 3 h, indicando un aumento en el reclutamiento de este factor de fisión a la mitocondria (**Figura 6**). Asimismo, se estableció que sólo aumenta la colocalización de Drp-1 con Fis-1 y no al revés (**Figura 6B**), lo cual coincide con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio.

A pesar de haber mostrado el efecto de las ceramidas en la morfología de la red mitocondrial y el reclutamiento de Drp-1, aún queda pendiente determinar el mecanismo por el cual aumenta la translocación de Drp-1. Posiblemente este mecanismo podría involucrar la acción de Ca<sup>2+</sup>/Calcineurina. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se observó que la C<sub>2</sub>-ceramida causaba incrementos de Ca<sup>2+</sup> en los cardiomiocitos. Estos movimientos de Ca<sup>2+</sup> podrían activar a la fosfatasa Calcineurina, la cual se sabe que desfosforila a Drp-1, aumentando su translocación a la mitocondria. A este respecto, se trató de evaluar la fosforilación de Drp-1 en Ser<sup>637</sup> mediante Western blot, sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes, debido al bajo nivel basal de Drp-1 fosforilada y la mala calidad del anticuerpo disponible (datos no mostrados).

Con los resultados obtenidos hasta el momento podemos demostrar que el tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida 40 µM por 3 h causa una disminución en la fosforilación de la kinasa Akt, tanto a nivel basal como en respuesta a insulina, en cultivos primarios de cardiomiocitos. Asimismo, este tratamiento causa la fragmentación de la red mitocondrial en cardiomiocitos, en conjunto con un aumento en la translocación de la proteína de fisión Drp-1.



**Figura 6. Efecto de la C<sub>2</sub>-ceramida sobre la translocación de Drp-1 a la mitocondria.**

**(A)** Inmunofluorescencia indirecta para Drp-1 y Fis-1, como marcador mitocondrial, en cardiomiocitos tratados con C<sub>2</sub>-ceramida 40 μM durante 3 h. **(B)** Cuantificación de los coeficientes de Manders para Drp-1 sobre Fis-1 y viceversa. \*p<0,05 vs control; N=5.

Para estudiar la relación entre ambos efectos causados por el tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida, la fragmentación de la red mitocondrial y la disminución de la fosforilación de Akt, se procedió a investigar el efecto de este esfingolípido sobre la fosforilación de Akt basal y estimulada por insulina en cardiomiocitos previamente transducidos con un vector adenoviral para la sobreexpresión de un dominante negativo de Drp-1, con el cual se espera prevenir el fenotipo de fragmentación de la red mitocondrial.

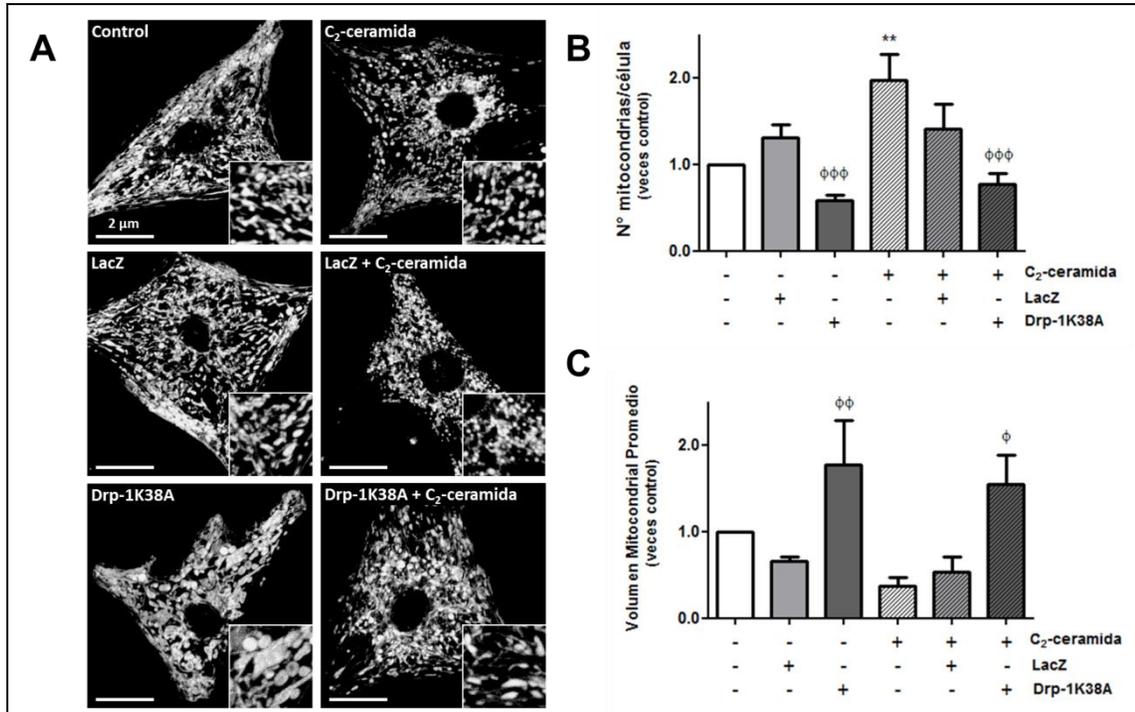
### **6.3. Prevención de la fragmentación de la morfología mitocondrial por ceramidas mediante la sobreexpresión de Drp-1K38A**

Con el fin de recuperar una morfología mitocondrial similar a la normal en las células tratadas con C<sub>2</sub>-ceramida, los cardiomiocitos se transdujeron con vectores adenovirales que codificaban para la mutante Drp-1K38A o para LacZ como control de transducción. La mutante Drp-1K38A presenta defectos a nivel de la actividad GTPasa y actúa como dominante negativo, ya que en los oligómeros activos de Drp-1, la hidrólisis de GTP funciona de manera cooperativa (Yoon et al. 2001; Ingerman et al. 2005). Con este dominante negativo se pretende desplazar el equilibrio de la dinámica mitocondrial hacia el proceso de fusión, con el objetivo de prevenir el aumento en la fisión de la red mitocondrial inducido por el tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida.

La **Figura 7A** muestra una imagen representativa de la morfología mitocondrial observada en cada condición. En las **Figuras 7B-C** se muestra la cuantificación de la morfología mitocondrial medida como número de objetos y su volumen promedio, respectivamente. La transducción adenoviral por sí sola (LacZ) muestra una leve tendencia a causar fragmentación de la red mitocondrial, evidenciado por un aumento en el número de partículas mitocondriales y una disminución en su volumen, sin embargo estos cambios no son significativos con respecto al control. Por su parte, la expresión de Drp-1K38A por sí sola produce un marcado fenotipo de fusión de la red mitocondrial, comprobado por una disminución significativa del número de mitocondrias por célula junto con un aumento en el volumen mitocondrial promedio.

Al igual que lo observado en la **Figura 5**, la C<sub>2</sub>-ceramida produce un marcado fenotipo de fragmentación de la red mitocondrial, lo cual no es afectado por la transducción con el adenovirus control. Sin embargo, la expresión de Drp-1K38A previene considerablemente el aumento de la fisión mitocondrial, observándose un fenotipo similar al de las células control.

Con este procedimiento se pretende prevenir el efecto de las ceramidas sobre la dinámica mitocondrial con el fin de determinar si este proceso es un evento requerido



**Figura 7. Prevención de la fragmentación de la red mitocondrial mediante la sobreexpresión de Drp-1K38A.**

(A) Reconstrucción tridimensional de la red mitocondrial de cardiomiocitos transducidos con un vector adenoviral para la sobreexpresión de Drp-1K38A o LacZ como control de transducción, y luego tratados con C<sub>2</sub>-ceramida 40 μM durante 3 h. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal luego de teñir las células con la sonda vital Mitotracker Green. (B) Cuantificación del número de partículas mitocondriales por célula para cada condición. (C) Cuantificación del volumen mitocondrial promedio para cada condición. \*\*p<0,01 vs control; φp<0,05 vs C<sub>2</sub>-ceramida; φφp<0,01 vs C<sub>2</sub>-ceramida; φφφp<0,001 vs C<sub>2</sub>-ceramida; N=7.

en la desensibilización de la vía de señalización de la insulina en respuesta a estos lípidos.

#### 6.4. Rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina mediante la sobreexpresión de Drp-1K38A

A continuación, se determinó si el rescate de la morfología mitocondrial previene la disminución de la fosforilación de Akt al tratar los cardiomiocitos con C<sub>2</sub>-ceramida. La

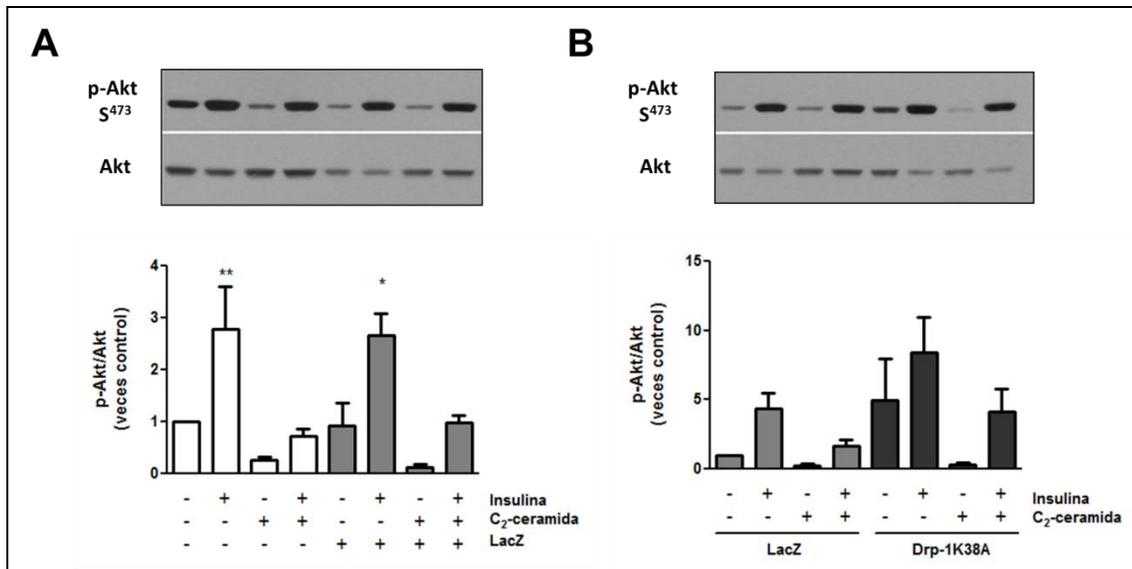
**Figura 8** muestra una imagen representativa de los Western blot obtenidos, con su respectiva cuantificación. Tanto los controles sin transducir como las células transducidas con el adenovirus control (LacZ) muestran la misma tendencia que la observada en la **Figura 4**: la insulina aumenta la fosforilación de Akt, mientras que la C<sub>2</sub>-ceramida disminuye tanto la fosforilación basal de Akt como la inducida por insulina (**Figura 8A**). En los cardiomiocitos que sobreexpresan Drp-1K38A, en primer lugar se observa una tendencia al aumento de la fosforilación en respuesta a insulina; en segundo lugar podemos apreciar que al tratar estas células con C<sub>2</sub>-ceramida no se rescata la fosforilación basal de Akt, sin embargo, la fosforilación en respuesta a insulina aumenta considerablemente con respecto a las células no transducidas tratadas con C<sub>2</sub>-ceramida (**Figura 8B**). Este experimento aún no ha podido ser completado debido a la necesidad de re-amplificar el adenovirus para la sobreexpresión de Drp-1K38A. Hasta el momento sólo podemos hablar de tendencias dado que aún no se cuenta con las repeticiones suficientes como para obtener diferencias estadísticamente significativas.

Debido a las dificultades para completar los ensayos con la sobreexpresión del dominante negativo de Drp-1, se decidió abordar el objetivo específico 2 utilizando en lugar del dominante negativo, un inhibidor químico de Drp-1, conocido como mdivi-1 (*Mitochondrial division inhibitor*), que salió recientemente al mercado y que actúa inhibiendo la actividad GTPasa de este factor de fisión mitocondrial (**Cassidy-Stone et al. 2008**).

### **6.5. Prevención de la fragmentación de la morfología mitocondrial mediante el uso de un inhibidor químico de Drp-1**

Como alternativa al uso del dominante negativo de la proteína Drp-1, se estudió la prevención de la fragmentación de la red mitocondrial frente al estímulo con C<sub>2</sub>-ceramida utilizando un inhibidor químico de Drp-1, conocido como mdivi-1. El inhibidor se agregó a una concentración de 50 µM, 30 min antes del estímulo con C<sub>2</sub>-ceramida, manteniéndose en el medio de cultivo durante todo el estímulo. La **Figura 9A** muestra imágenes representativas de la morfología mitocondrial observada en cada condición.

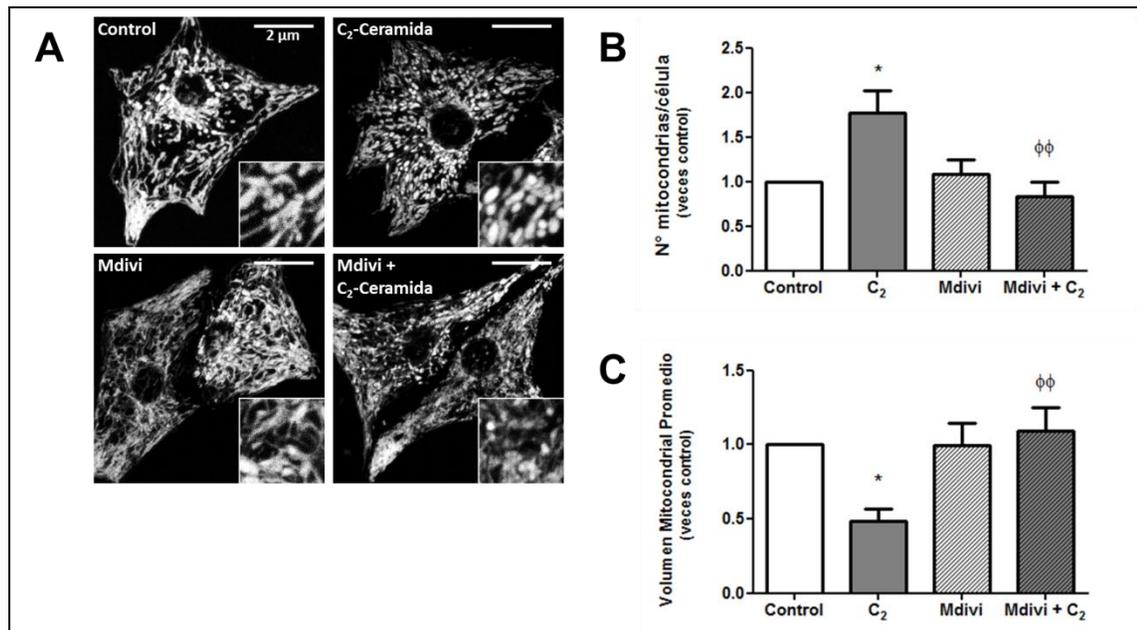
En las **Figuras 9B-C** se muestra la cuantificación de la morfología mitocondrial medida como número de objetos por célula y volumen promedio de los objetos, respectivamente. El uso de mdivi-1 por sí solo muestra una tendencia visual a aumentar la conectividad de la red mitocondrial, sin embargo no se observan diferencias en la cuantificación de los parámetros estadísticos con respecto al control. Al igual que lo observado en los experimentos anteriores, la C<sub>2</sub>-ceramida produce un marcado fenotipo de fragmentación de la red mitocondrial, el cual es prevenido en gran medida por la pre-incubación con mdivi-1, de acuerdo a las **Figuras 9A-C**.



**Figura 8. Rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina mediante la sobreexpresión de Drp-1K38A.**

**(A)** Extractos totales de proteínas de cardiomiocitos transducidos con un vector adenoviral que sobreexpresa LacZ como control de transducción, luego tratados con C<sub>2</sub>-ceramida 40  $\mu$ M durante 3 h y finalmente sometidos a un pulso de insulina 10 nM de 15 min. Los niveles de Akt fosforilada (p-Akt) en Ser<sup>473</sup> y de Akt total se determinaron mediante Western blot. Se observa una imagen representativa y la cuantificación de la relación p-Akt/Akt en estado basal y en respuesta a insulina para cada condición. **(B)** Resultados obtenidos para los extractos totales de proteínas de cardiomiocitos transducidos con el vector adenoviral que sobreexpresa Drp-1K38A y tratados en las mismas condiciones anteriores. Se observa una imagen representativa y la cuantificación de la relación p-Akt/Akt en estado basal y en respuesta a insulina para cada condición. S: Serina. \*p<0,05 vs control; \*\*p<0,01 vs control; N=5.

De esta forma podemos demostrar, que al igual que lo que se observa con la sobreexpresión de Drp-1K38A, el uso de mdivi-1 previene la fisión de la red mitocondrial al estimular los cardiomiocitos con C<sub>2</sub>-ceramida.



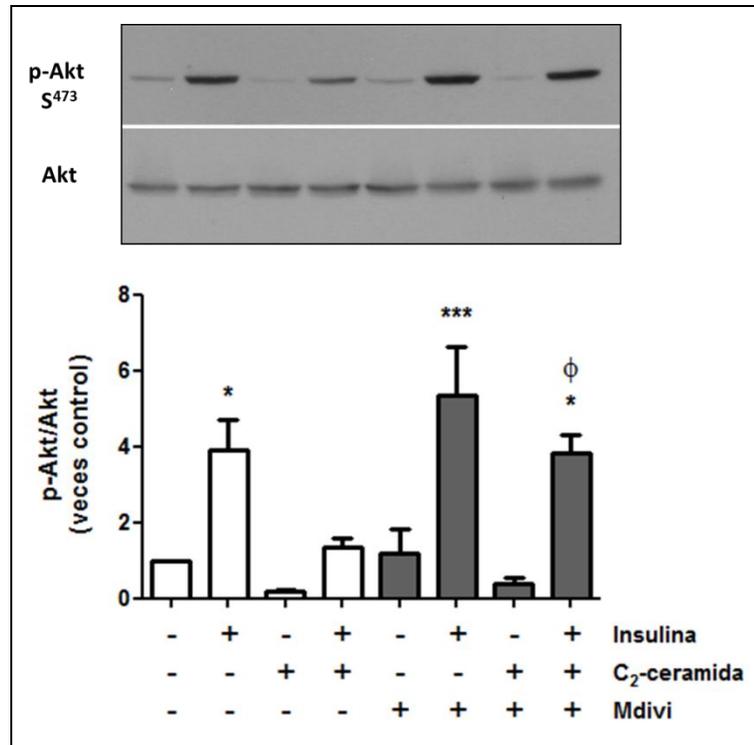
**Figura 9. Prevención de la fragmentación de la morfología mitocondrial mediante el uso de un inhibidor químico de Drp-1.**

**(A)** Reconstrucción tridimensional de la red mitocondrial de cardiomiocitos pre-tratados con mdivi-1 50  $\mu$ M durante 30 min y luego estimulados con C<sub>2</sub>-ceramida 40  $\mu$ M durante 3 h. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal luego de teñir las células con la sonda vital Mitotracker Green. **(B)** Cuantificación del número de partículas mitocondriales por célula para cada condición. **(C)** Cuantificación del volumen mitocondrial promedio para cada condición. C<sub>2</sub>: C<sub>2</sub>-ceramida. \*p<0,05 vs control; <sup>φφ</sup>p<0,01 vs C<sub>2</sub>-ceramida; N=6.

### 6.6. Rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina mediante el uso de un inhibidor químico de Drp-1

A continuación, se determinó si la prevención de la fisión mitocondrial mediante el uso de mdivi-1, es capaz de rescatar la fosforilación de Akt al tratar los cardiomiocitos

con C<sub>2</sub>-ceramida, de forma similar a lo ocurrido al sobreexpresar Drp-1K38A. La **Figura 10** muestra los resultados obtenidos mediante Western blot, con su respectiva cuantificación. En los cardiomiocitos pre-tratados con mdivi-1, se observa en primer lugar una tendencia al aumento de la fosforilación en respuesta a insulina. Por otro lado se puede apreciar que al tratar estas células con C<sub>2</sub>-ceramida no se rescata la fosforilación basal de Akt, sin embargo, la fosforilación en respuesta a insulina aumenta significativamente con respecto a las células tratadas con C<sub>2</sub>-ceramida y luego estimuladas con insulina.



**Figura 10. Rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina mediante el uso de un inhibidor químico de Drp-1.**

Extractos totales de proteínas de cardiomiocitos pre-tratados con mdivi-1 50  $\mu$ M durante 30 min, luego estimulados con C<sub>2</sub>-ceramida 40  $\mu$ M durante 3 h y finalmente sometidos a un pulso de insulina 10 nM de 15 min. Los niveles de Akt fosforilada (p-Akt) en Ser<sup>473</sup> y de Akt total se determinaron mediante Western blot. Se observa una imagen representativa y la cuantificación de la relación p-Akt/Akt en estado basal y en respuesta a insulina para cada condición. S: Serina. \*p<0,05 vs control; \*\*\*p<0,001 vs control; φp<0,05 vs C<sub>2</sub>-ceramida + Insulina; N=5.

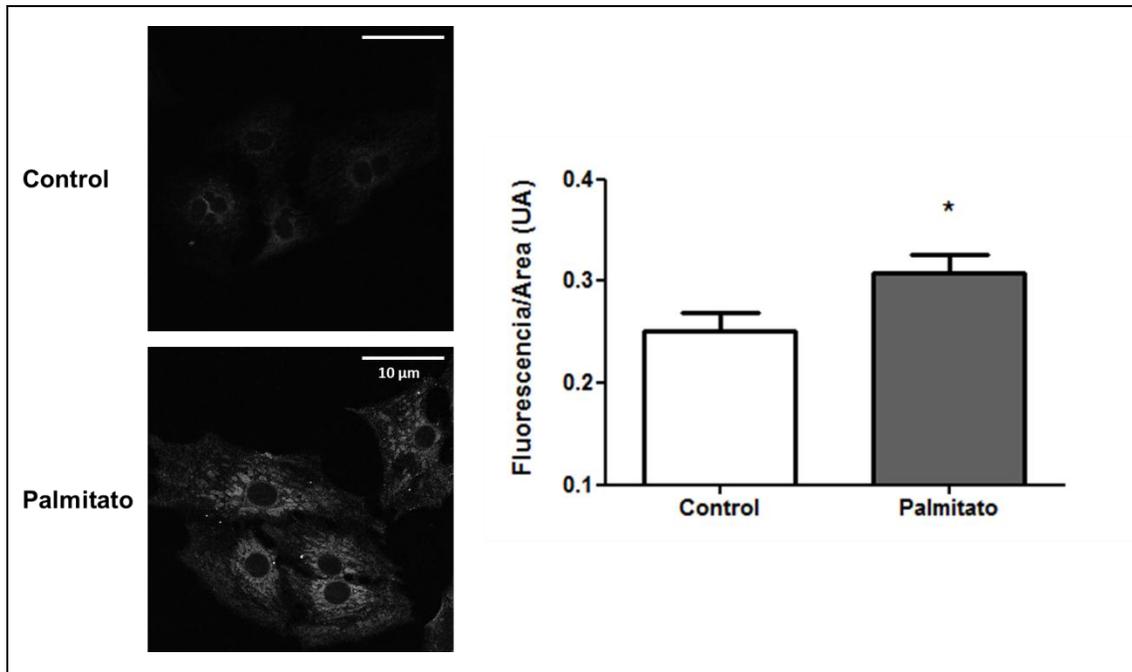
Este resultado confirma los datos obtenidos al sobreexpresar el dominante negativo de Drp-1 y propone un nuevo mecanismo mediante el cual la desensibilización de la vía de señalización de la insulina causada por las ceramidas requiere que se produzca fragmentación de la red mitocondrial, estableciendo una conexión hasta entonces desconocida entre la fosforilación de Akt en respuesta a insulina y la integridad de la red mitocondrial.

### **6.7. Evaluación de la producción de ceramidas por palmitato**

En la tesis doctoral de Jovan Kuzmicic, actualmente en curso en nuestro laboratorio, se estudian los efectos de palmitato sobre la función y dinámica mitocondrial en cardiomiocitos. Los resultados muestran que el tratamiento de los cardiomiocitos con palmitato 500  $\mu$ M durante 3 h fragmenta la red mitocondrial, aumentando la translocación de Drp-1 hacia la mitocondria (**Kuzmicic 2011**). Según los antecedentes planteados anteriormente, la principal vía de síntesis de ceramidas, la vía *de novo*, depende de la disponibilidad de palmitato como sustrato de la etapa limitante. Este antecedente, junto con los resultados obtenidos en este trabajo y en la tesis de Jovan Kuzmicic, nos induce a pensar que las ceramidas pueden estar actuando como mediadores de los efectos observados al tratar los cardiomiocitos con palmitato.

Para investigar esta posibilidad se evaluó en primer lugar si los niveles de ceramidas aumentan al estimular los cardiomiocitos con palmitato. Con este fin, las células se trataron con palmitato 500  $\mu$ M durante 3 h y luego se observó mediante inmunofluorescencia indirecta la cantidad relativa de ceramidas intracelulares utilizando un anticuerpo anti-ceramidas.

En la **Figura 11A** se puede observar una imagen representativa de la fluorescencia relativa y la localización de las ceramidas intracelulares. Se puede apreciar claramente el aumento en la fluorescencia al tratar las células con palmitato, lo cual indica un nivel mayor de ceramidas. Además se puede notar que las ceramidas parecen localizarse



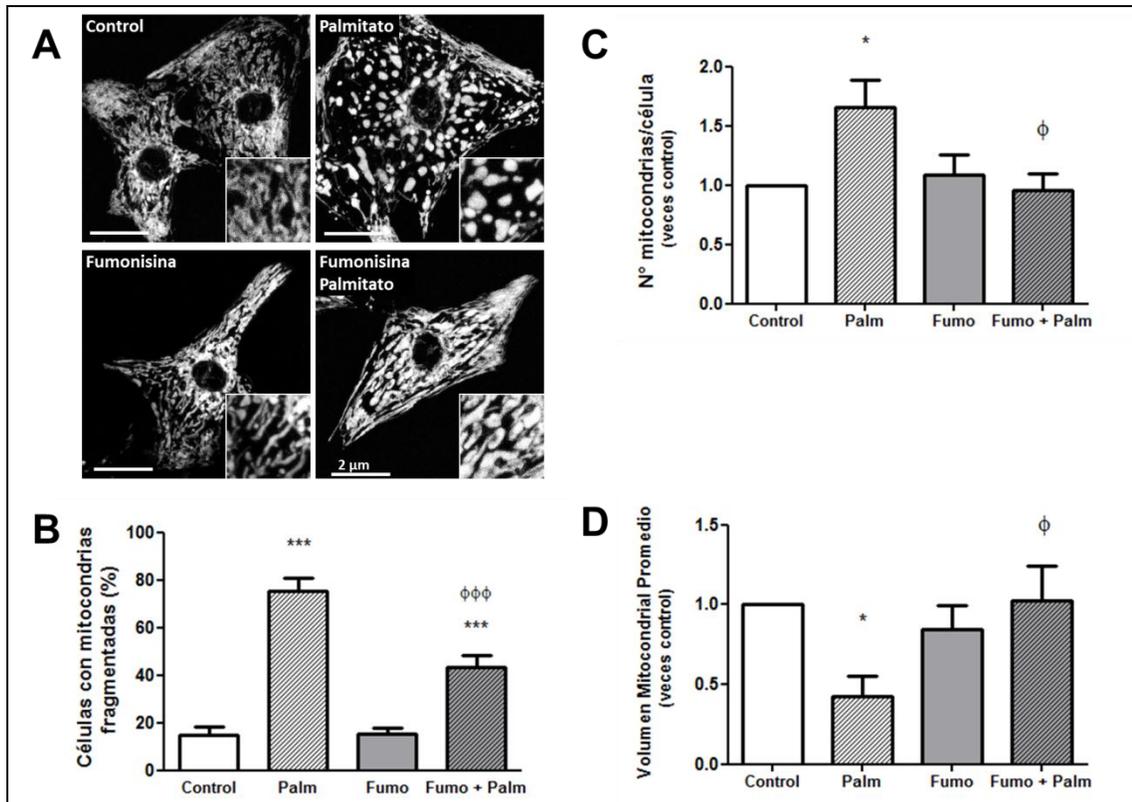
**Figura 11. Evaluación de la producción de ceramidas por palmitato.**

Inmunofluorescencia indirecta para ceramidas en cardiomiocitos tratados con palmitato 500  $\mu$ M durante 3 h. Se observa una imagen representativa y la cuantificación de la fluorescencia relativa para cada condición. \* $p < 0,05$  vs control; N=7.

en estructuras de endomembranas. En la **Figura 11B** se muestra la cuantificación de la fluorescencia relativa para cada condición.

### **6.8. Evaluación del rol de las ceramidas como mediadores de la fragmentación de la red mitocondrial inducida por palmitato**

Para evaluar si la fragmentación de la red mitocondrial inducida por palmitato está mediada, en parte, por la producción de ceramidas, los cardiomiocitos fueron pre-incubados durante 30 min con fumonisina B1, un inhibidor de la enzima ceramida sintasa, que participa en la síntesis de ceramidas a partir de palmitato. Luego de la pre-incubación las células se trataron con palmitato 500  $\mu$ M durante 3 h y se analizó la morfología de la red mitocondrial mediante microscopía confocal. En la **Figura 12A** se



**Figura 12. Evaluación del rol de las ceramidas como mediadores de la fragmentación de la red mitocondrial inducida por palmitato.**

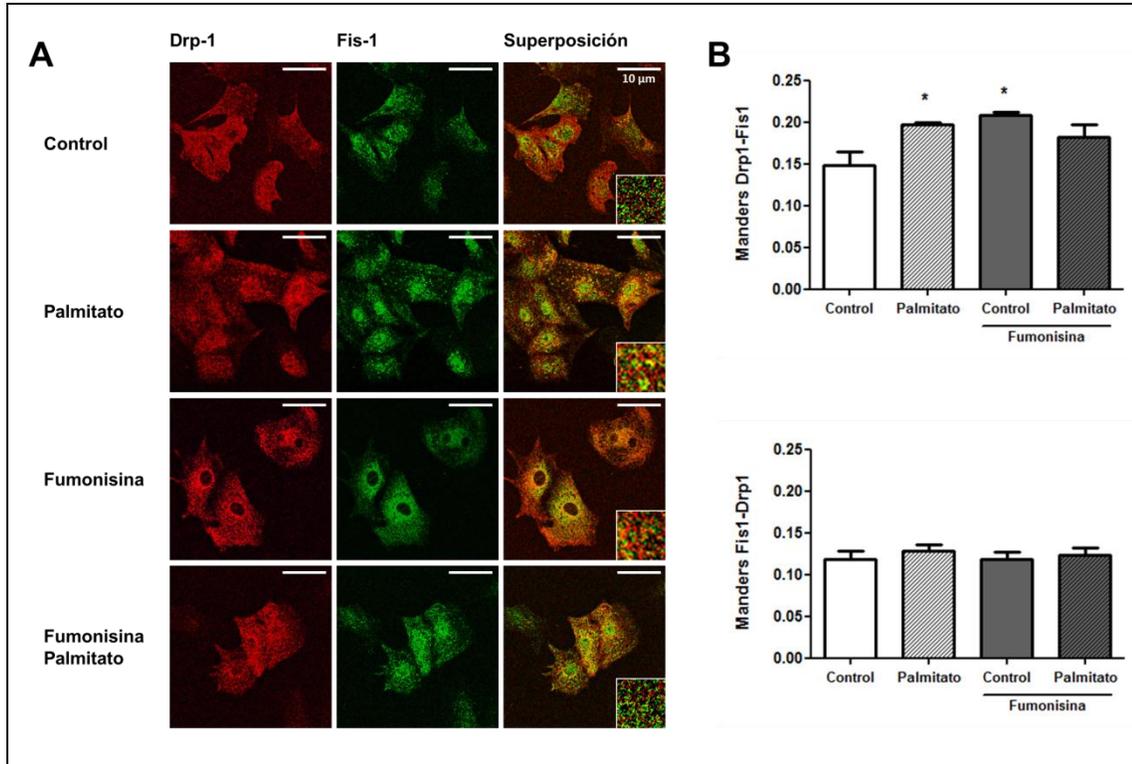
**(A)** Reconstrucción tridimensional de la red mitocondrial de cardiomiocitos pre-tratados con fumonisina B1 50 nM durante 30 min y luego estimulados con palmitato 500  $\mu$ M durante 3 h. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal luego de teñir las células con la sonda vital Mitotracker Green. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células que presentan una red mitocondrial fragmentada. **(C)** Cuantificación del número de partículas mitocondriales por célula. **(D)** Cuantificación del volumen mitocondrial promedio para cada condición. Palm: Palmitato; Fumo: Fumonisin B1. \* $p < 0,05$  vs control; \*\*\* $p < 0,001$  vs control;  $\phi p < 0,05$  vs Palmitato;  $\phi\phi\phi p < 0,001$  vs Palmitato; N=5.

muestran las imágenes obtenidas, donde se puede apreciar la fragmentación de la red mitocondrial al tratar los cardiomiocitos con palmitato y cómo este efecto se previene al pre-incubar las células con fumonisina B1. El porcentaje de células que presentan un fenotipo de fisión mitocondrial se reduce de un 75,46% en las células estimuladas con palmitato, a un 43,16% al pre-tratar las células con fumonisina B1 (**Figura 12B**). Además, en las células donde se previene el efecto del palmitato sobre la dinámica

mitocondrial, se observa una recuperación del número de mitocondrias por célula y del volumen mitocondrial promedio al compararlas con las células control (**Figuras 12C-D**).

### **6.9. Evaluación del rol de las ceramidas como mediadores de la translocación de Drp-1 a la mitocondria inducida por palmitato**

Para determinar si la fragmentación de la red mitocondrial causada por el tratamiento con palmitato se debe a una mayor translocación de Drp-1 a la mitocondria y si este efecto se altera al pre-tratar las células con fumonisina B1, se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta la colocalización entre Drp-1 y Fis-1, utilizado como marcador mitocondrial. Los estudios de colocalización muestran que existe un aumento en el coeficiente de Manders para la proteína Drp-1 luego del tratamiento con palmitato 500  $\mu$ M por 3 h, indicando un aumento en el reclutamiento de este factor de fisión a la mitocondria (**Figura 13**). Asimismo, el tratamiento con fumonisina B1 por sí solo también aumenta el coeficiente de Manders para Drp-1 y al pre-incubar los cardiomiocitos con fumonisina B1 y luego realizar el estímulo con palmitato, no se observan cambios significativos en la colocalización entre Drp-1 y Fis-1 con respecto al palmitato (**Figura 13B**).



**Figura 13. Evaluación del rol de las ceramidas como mediadores de la translocación de Drp-1 a la mitocondria inducida por palmitato.**

**(A)** Inmunofluorescencia indirecta para Drp-1 y Fis-1, como marcador mitocondrial, en cardiomiocitos pre-tratados con fumonisina B1 50 nM durante 30 min y luego estimulados con palmitato 500  $\mu$ M durante 3 h. **(B)** Cuantificación de los coeficientes de Manders para Drp-1 sobre Fis-1 y viceversa. \* $p < 0,05$  vs control; N=3.

## 7. DISCUSIÓN

Las mitocondrias son organelos esenciales para la mantención de la homeostasis celular. Además de proveer de energía a la célula a través de la fosforilación oxidativa, las mitocondrias son el centro de diversas reacciones fundamentales del metabolismo, participan en la homeostasis del calcio celular y cumplen un rol fundamental en el envejecimiento y muerte celular **(Szewczyk & Wojtczak 2002)**. El corazón, al ser un órgano que necesita mantener una actividad permanente de contracción y relajación, requiere de un suministro constante y abundante de energía, la cual proviene en su mayor parte de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos y carbohidratos **(Lopaschuk et al. 2007)**. Es por esto que cualquier alteración de la función mitocondrial en los cardiomiocitos, unidad funcional del corazón, conducirá a fallas en la función de este órgano.

Diversos estudios han relacionado la disfunción mitocondrial con patologías metabólicas como la resistencia a la insulina y la diabetes **(Kim et al. 2008; Brands et al. 2012; Szendroedi et al. 2012)**. En biopsias musculares de pacientes insulino-resistentes se ha observado un menor número, tamaño y densidad de mitocondrias y una menor capacidad funcional de la cadena transportadora de electrones **(Morino et al. 2005; Ritov et al. 2005; Kelley et al. 2002)**. A pesar de haberse observado el menor tamaño de las mitocondrias en pacientes insulino-resistentes y de conocerse la importancia de la morfología en la función mitocondrial, es poco lo que se ha especulado con respecto a alteraciones en la dinámica mitocondrial en esta condición **(Zorzano et al. 2009a; Zorzano et al. 2009b)**. El primer estudio que ha explorado esta posibilidad mostró que en biopsias musculares de pacientes obesos y diabéticos existe una menor expresión de Mfn-2, lo cual podría explicar la disminución en el tamaño y funcionalidad de las mitocondrias **(Bach et al. 2005)**. Un trabajo reciente muestra por primera vez que la fisión mitocondrial contribuye a la insulino resistencia en un modelo de músculo esquelético, apoyando así nuestra hipótesis **(Jheng et al. 2012)**.

## 7.1. Ceramidas y fosforilación de Akt

Las ceramidas han sido descritas como moduladores fundamentales en procesos de estrés celular. Además, diversos estudios han propuesto a las ceramidas como mediadores de la resistencia a la insulina (**Chavez & Summers 2012**). Se sabe que las ceramidas pueden disminuir directamente la fosforilación de Akt, uno de los moduladores centrales de la acción de esta hormona, a través de la activación de la fosfatasa PP2A o de la kinasa PKC $\zeta$  (**Stratford et al. 2004**), sin embargo este efecto no ha sido evaluado en el corazón. En el presente trabajo se investigó por primera vez en cardiomiocitos el efecto de las ceramidas sobre la fosforilación de Akt. Nuestros resultados demuestran que la C<sub>2</sub>-ceramida disminuye fuertemente la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup>, tanto basalmente como en respuesta a la insulina (**Figura 4**). Además podemos deducir que esta disminución de p-Akt al estimular con insulina se debe principalmente a una disminución en el tono general de fosforilación de esta proteína, ya que la relación entre la fosforilación en respuesta a insulina y la basal no cambia entre las condiciones estudiadas (**Figura 4C**).

Con este ensayo hemos demostrado que se reproducen los efectos ya descritos de las ceramidas sobre la fosforilación de Akt en nuestro modelo de cardiomiocitos. Sin embargo, aún queda por determinar si este efecto se produce río arriba de la vía de señalización de la insulina o si el defecto se encuentra directamente a nivel de la proteína Akt. En este último caso, habría que demostrar cuál(es) de los mecanismo(s) descritos para las ceramidas está ocurriendo en nuestro modelo, o si existe un mecanismo aún no descrito para la disminución de la fosforilación de Akt. Igualmente, sería conveniente verificar que esta disminución en la activación de Akt tiene realmente un efecto funcional, por ejemplo en el aumento en la captación de glucosa o el consumo de oxígeno inducidos por insulina.

## 7.2. Ceramidas y fisión mitocondrial

Se ha descrito que las ceramidas inducen disfunción mitocondrial inhibiendo el complejo III de la cadena transportadora de electrones y aumentando la producción de

especies reactivas del oxígeno (**Summers 2006**). Sin embargo, el único trabajo que describe efectos de las ceramidas a nivel de la dinámica mitocondrial fue realizado en nuestro laboratorio y demuestra que la C<sub>2</sub>-ceramida induce fisión de la red mitocondrial en cardiomiocitos como un paso previo a la muerte celular provocada por estímulos a tiempos prolongados (**Parra et al. 2008**). En esta tesis quisimos comprobar si la C<sub>2</sub>-ceramida también causa fisión mitocondrial en las mismas condiciones en las que vemos efectos en la fosforilación de Akt (C<sub>2</sub>-ceramida 40 μM por 3 horas). Pudimos verificar que este tratamiento tiene un profundo efecto sobre la morfología mitocondrial, pasando de una red altamente conectada en las células control a una red totalmente disgregada y con mitocondrias muy pequeñas en los cardiomiocitos tratados con C<sub>2</sub>-ceramida (**Figura 5**). Para dar mayor objetividad a nuestros resultados consideramos como criterio cuantitativo de fisión mitocondrial el aumento en el número de partículas mitocondriales por célula de forma concomitante con una disminución en su volumen promedio al hacer la reconstrucción en tres dimensiones de las imágenes adquiridas mediante microscopía confocal (**Figura 5C-D**).

La fragmentación de la red mitocondrial observada con el tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida implica un desbalance en la dinámica mitocondrial que puede deberse a un aumento en el proceso de fisión mitocondrial y/o a una disminución en el proceso de fusión. En resultados no mostrados en este trabajo se midieron los niveles de la proteína de fusión Opa-1 sin observar cambios al tratar los cardiomiocitos con C<sub>2</sub>-ceramida 40 μM durante 3 h. A pesar de que no se evaluaron los niveles de otras proteínas de la dinámica mitocondrial, los resultados de inmunofluorescencia sugieren que el fenotipo observado se debe principalmente a un aumento en la fisión más que a una disminución en la fusión mitocondrial, ya que observamos una mayor translocación de la proteína de fisión Drp-1 hacia este organelo en las células tratadas con C<sub>2</sub>-ceramida (**Figura 6**).

El proceso de fisión mitocondrial depende tanto de la translocación de Drp-1 hacia este organelo (**Smirnova et al. 2001**) como de su actividad GTPasa (**Zhu et al. 2004**). Ambos procesos son regulados principalmente por modificaciones post-traduccionales de Drp-1. En este trabajo se muestra que existe una mayor presencia de Drp-1

asociado a la mitocondria pero no se pudo establecer el mecanismo por el cual las ceramidas inducen este proceso. Probablemente este mecanismo involucra cambios en el estado de fosforilación de Drp-1. La principal fosforilación descrita para esta proteína es en el residuo Ser<sup>637</sup> mediado por la kinasa PKA (**Cribbs & Strack 2007; Cereghetti et al. 2008; Chang & Blackstone 2007**). Esta fosforilación tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de Drp-1 ya que impide las interacciones intramoleculares entre los dominios GED y GTPasa de esta proteína, disminuyendo así su actividad de hidrólisis de GTP (**Chang & Blackstone 2007**). Esta fosforilación es revertida por la fosfatasa dependiente de calcio Calcineurina, lo cual favorece el proceso de fisión mitocondrial (**Cribbs & Strack 2007; Cereghetti et al. 2008**).

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que la C<sub>2</sub>-ceramida induce aumentos en los niveles de calcio intracelular en los cardiomiocitos (datos no mostrados). Estas evidencias llevan a proponer que la C<sub>2</sub>-ceramida podría activar a la fosfatasa Calcineurina, induciendo la desfosforilación de Drp-1 y favoreciendo su translocación a la mitocondria y su actividad GTPasa. En este trabajo se intentó evaluar la fosforilación de Drp-1 en Ser<sup>637</sup> mediante Western blot en respuesta al tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida, sin embargo, debido a problemas de tipo práctico no se pudieron obtener resultados concluyentes.

### **7.3. Efectos de la inhibición de Drp-1 sobre la morfología mitocondrial**

Debido a la observación de que las ceramidas aumentan la translocación de Drp-1 hacia la mitocondria, propusimos como estrategia experimental el uso de un dominante negativo de esta proteína para prevenir el fenotipo de fragmentación de la red mitocondrial causada por estos esfingolípidos. El adenovirus utilizado como control (LacZ) causa por sí solo un ligero efecto de fragmentación mitocondrial, aunque no significativo con respecto al control, y no tiene mayor efecto sobre la fisión mitocondrial inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida. Por otra parte, el adenovirus que sobreexpresa Drp-1K38A por sí solo tiene un efecto muy marcado sobre la morfología de la red mitocondrial, observándose la aparición de mitocondrias de gran tamaño (**Figura 7A**). En cambio, el uso de mdivi-1, el cual inhibe la actividad GTPasa de Drp-1 (**Cassidy-**

**Stone et al. 2008**), no tiene mayores consecuencias sobre la morfología mitocondrial por sí mismo. Aunque se observa una red mitocondrial con mayor conectividad que en las células control, con el uso de mdivi-1, no existe el aumento considerable del volumen mitocondrial comparado con la sobreexpresión de Drp-1K38A (**Figura 9A**).

Tanto Drp-1K38A como mdivi-1 tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad GTPasa de Drp-1 (**Yoon et al. 2001; Cassidy-Stone et al. 2008**), por lo tanto las diferencias en la morfología mitocondrial basal observadas con el uso de ambas herramientas tal vez pueda explicarse por el alcance de su efecto. El adenovirus que expresa el dominante negativo de Drp-1 genera un fuerte aumento en los niveles de la proteína en comparación con los niveles endógenos, en cambio mdivi-1, que se agrega al medio de cultivo, debe ingresar a la célula y actuar sobre la proteína endógena para ejercer su efecto.

Sin embargo, a pesar de las diferencias observadas en el estado basal de la morfología mitocondrial, tanto la sobreexpresión del dominante negativo de Drp-1 como el uso del inhibidor químico previnieron de forma eficiente la fragmentación de la red mitocondrial causada por el tratamiento con C<sub>2</sub>-ceramida. En ambos casos, esta prevención se manifiesta como una recuperación en el número de partículas mitocondriales por célula y en su volumen promedio, con respecto a los controles (**Figuras 7 y 9**).

#### **7.4. Efectos de la inhibición de Drp-1 sobre la fosforilación de Akt**

A pesar de que se conoce que las ceramidas tienen un efecto inhibitorio directo sobre la fosforilación de Akt (**Chavez & Summers 2012**), nuestra hipótesis planteaba que la alteración de la morfología mitocondrial también estaría jugando un rol en este efecto. Para demostrarlo se utilizó una estrategia experimental en la cual se mantiene una morfología mitocondrial normal en presencia de C<sub>2</sub>-ceramida mediante el dominante negativo de Drp-1 o un inhibidor químico de esta proteína. En ambos casos se observó un rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina (**Figuras 8 y 10**). La observación más interesante de estos experimentos es que sólo existe un

rescate de la fosforilación en respuesta a insulina, mientras que la fosforilación basal sigue manteniéndose por debajo del control en las células tratadas con C<sub>2</sub>-ceramida.

Recientemente, un trabajo realizado en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata y en animales completos mostró que la insulina es capaz de inducir la translocación y activación de Akt hacia la mitocondria en el corazón y que este efecto se ve reducido en animales insulino-resistentes (**Yang et al. 2009**). La translocación de Akt hacia la mitocondria podría explicar los efectos que tiene la insulina sobre el metabolismo mitocondrial, como el aumento en el potencial de membrana mitocondrial, la síntesis de ATP y el consumo de oxígeno que se ha observado en trabajos previos en nuestro laboratorio (**Parra 2011**).

En el presente trabajo sólo se evaluó la fosforilación de Akt en extractos de proteínas totales, por lo tanto se desconoce si hay cambios en su localización intracelular. Sin embargo, al observar nuestros resultados, podemos especular que el rescate de la fosforilación de Akt que se observa al prevenir la fisión mitocondrial inducida por ceramidas puede deberse a una mayor localización intra-mitocondrial de esta kinasa. Es decir, podemos sugerir que la mantención de la conectividad de la red mitocondrial es necesaria para la translocación de Akt inducida por insulina. En este escenario, el uso de Drp-1K38A o mdivi-1 estarían rescatando la fosforilación de Akt estimulada por insulina, favoreciendo la mantención de un subconjunto de Akt mitocondrial.

Los mecanismos propuestos mediante los cuales las ceramidas disminuyen la fosforilación de Akt, ya sea la activación de la fosfatasa PP2A o de la kinasa PKCζ, actúan a nivel citosólico. Esto podría explicar la razón de que no exista rescate de la fosforilación basal de Akt al prevenir la fisión mitocondrial inducida por C<sub>2</sub>-ceramida, ya que estos mecanismos permanecen activos sin importar el estado de la red mitocondrial. En cambio, al estimular con insulina se induce la translocación de Akt hacia la mitocondria, la cual se vería favorecida por la mantención de una red mitocondrial conectada. Este subconjunto de Akt mitocondrial quedaría así protegido de los efectos inhibitorios de las ceramidas sobre su activación.

Sin embargo, se requiere realizar más experimentos para determinar si el rescate de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina también tiene un efecto de rescate sobre los efectos clásicos de la insulina en el metabolismo celular.

### **7.5. Palmitato y producción de ceramidas**

La acumulación ectópica de lípidos, especialmente de ácidos grasos saturados, y la lipotoxicidad han sido propuestas como factores centrales de la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (**Mittra et al. 2008; Unger et al. 2010**). Se ha observado que existe una correlación inversa entre la sensibilidad sistémica a la insulina y el contenido lipídico intramiocelular (**Pan et al. 1997**). En los últimos años se han descrito diversos mecanismos mediante los cuales el exceso de lípidos puede alterar el metabolismo celular y causar resistencia a la insulina (**Samuel et al. 2010; Chavez & Summers 2010**). Uno de los mecanismos propuestos involucra la síntesis de ceramidas como mediadores de los efectos tóxicos de los ácidos grasos (**Chavez et al. 2003; Chavez & Summers 2010; Holland et al. 2007b; Chavez & Summers 2012**). Como se mencionó anteriormente, la principal vía de síntesis endógena de ceramidas depende del suministro de palmitato como sustrato (**Summers 2006**).

En nuestro laboratorio se ha observado previamente que el palmitato induce fragmentación de la red mitocondrial y aumenta la translocación de Drp-1 hacia la mitocondria en cardiomiocitos (**Kuzmicic 2011**), al igual que lo que sucede con la C<sub>2</sub>-ceramida en este trabajo. Debido a esto, el tercer objetivo de esta tesis fue evaluar si la generación de ceramidas participa en la fisión mitocondrial inducida por palmitato en este modelo.

En primer lugar se evaluó si el palmitato aumentaba los niveles de ceramidas en los cardiomiocitos. Para realizar este ensayo, la única herramienta de la que disponemos actualmente es la inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo anti-ceramidas. Este ensayo se realizó solamente de forma exploratoria, ya que al ser éste un anticuerpo dirigido contra lípidos puede no ser tan específico como en el caso de las proteínas.

Además, las ceramidas tienen un metabolismo muy complejo y forman parte de una gran familia de derivados con características moleculares similares. Nuestros resultados muestran que el estímulo con palmitato efectivamente aumenta la fluorescencia relativa en los cardiomiocitos, lo cual nos indica un aumento en los niveles de ceramidas y/o de sus derivados (**Figura 11**). Sin embargo, con este ensayo no podemos establecer cuál es la composición de los derivados de esfingolípidos generados. A pesar de las limitaciones de esta aproximación, podemos observar que las ceramidas producidas por el tratamiento con palmitato se localizan en estructuras definidas dentro de los cardiomiocitos. Aunque no se realizaron estudios al respecto, las estructuras observadas posiblemente corresponden en su mayor parte al retículo endoplásmico, ya que éste es el principal sitio de síntesis *de novo* de ceramidas y desde este organelo son transportados los productos hacia otras estructuras intracelulares (**Hanada et al. 2007**).

#### **7.6. Palmitato y fisión mitocondrial**

Al evaluar el efecto del palmitato sobre la morfología mitocondrial de los cardiomiocitos podemos determinar que, al igual que lo que sucede con la C<sub>2</sub>-ceramida, existe una marcada fragmentación de la red mitocondrial (**Figura 12**). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las ceramidas, el fenotipo observado es distinto. Al tratar los cardiomiocitos con palmitato se observa la aparición de mitocondrias aisladas y de un tamaño relativamente grande en la zona perinuclear, manteniéndose la conectividad de la red mitocondrial en la periferia celular. Por otro lado, al estimular con C<sub>2</sub>-ceramida se puede apreciar que las mitocondrias son de un tamaño muy pequeño y se encuentran aisladas unas de otras de forma pareja en toda la extensión de la célula (**Figura 4**).

#### **7.7. Papel de las ceramidas en la fisión mitocondrial inducida por palmitato**

Para evaluar si la síntesis *de novo* de ceramidas cumple algún rol en la fisión mitocondrial inducida por palmitato en los cardiomiocitos, utilizamos fumonisina B1, la cual inhibe la reacción catalizada por la enzima ceramida sintasa, en una de las últimas

etapas de esta vía de síntesis de ceramidas. El uso de este inhibidor previene en gran medida la fragmentación de la red mitocondrial inducida por palmitato, de lo cual podemos deducir que las ceramidas efectivamente estarían actuando como mediadores de este efecto en los cardiomiocitos (**Figura 12**).

Las diferencias observadas en la morfología mitocondrial al tratar los cardiomiocitos con palmitato o con C<sub>2</sub>-ceramida pueden tener su explicación en la forma en la que se generarían las ceramidas en ambos casos. Al estimular las células con palmitato, las ceramidas se generarían de forma endógena en estructuras subcelulares determinadas, principalmente en el retículo endoplásmico, desde donde pueden ser transportadas hacia la mitocondria o actuar indirectamente sobre la dinámica mitocondrial desde su lugar de síntesis (**Hanada et al. 2007**). También se ha descrito que en la mitocondria existe la maquinaria necesaria para la síntesis *de novo* de ceramidas (**Bionda et al. 2004; Summers 2006**), por lo que estos esfingolípidos podrían estar generándose directamente en este organelo a partir de palmitato. Por lo tanto, el patrón de fisión mitocondrial localizado generado por el tratamiento con palmitato podría deberse a la síntesis localizada de las ceramidas. En cambio, la C<sub>2</sub>-ceramida puede ingresar a la célula y localizarse de forma más generalizada en distintas estructuras subcelulares membranosas, lo que podría explicar el patrón de fisión mitocondrial generalizado que observamos en este trabajo.

Por otra parte, al evaluar la translocación de Drp-1 hacia la mitocondria en células pre-tratadas con fumonisina B1, no observamos mayores diferencias con respecto al estímulo con palmitato. Como se mencionó anteriormente, el proceso de fisión mitocondrial requiere tanto de la translocación de Drp-1 como de la actividad GTPasa de esta proteína. Este resultado podría explicarse por cambios en la actividad de Drp-1 más que en su localización, ya que, al pre-incubar con fumonisina B1 antes del estímulo con palmitato, existe translocación hacia la mitocondria aunque se previene la fisión mitocondrial. Sin embargo se requiere de más evidencias para demostrar esta teoría.

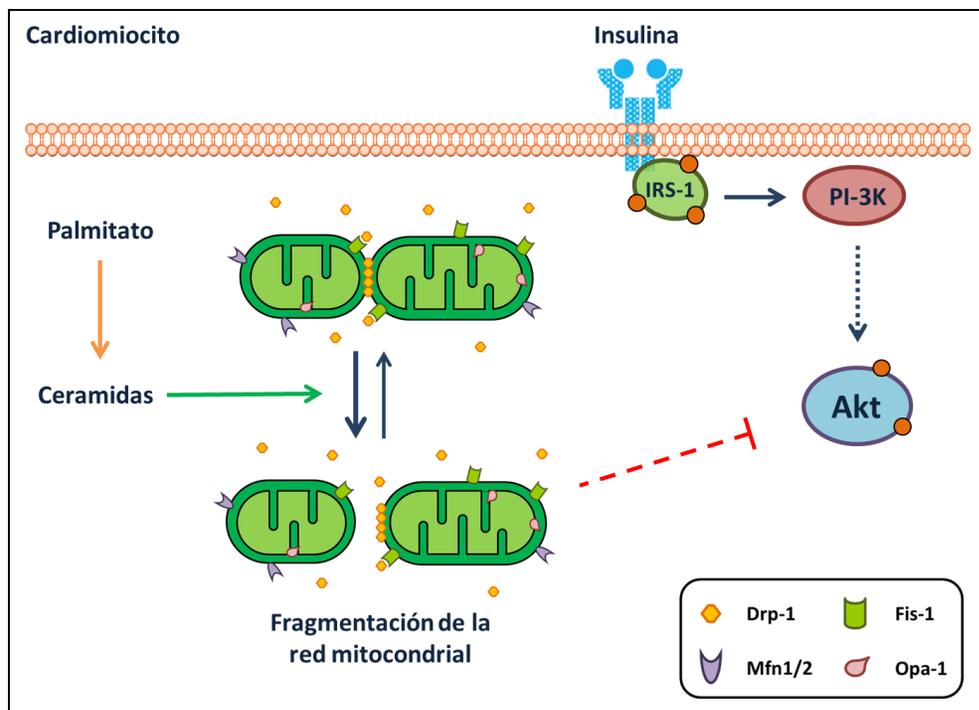
Por otro lado, los cardiomiocitos que sólo fueron tratados con fumonisina B1 también presentan un aumento en la colocalización de Drp-1 con la mitocondria. Este inhibidor de la síntesis *de novo* de ceramidas actúa en una de las últimas etapas de esta vía y también afecta la vía de rescate de las ceramidas, por lo que podría estar causando la acumulación de intermediarios del metabolismo de los esfingolípidos que pueden tener por sí mismos un efecto biológico. Esto tal vez podría explicar por qué observamos un aumento en la translocación de Drp-1 sólo en presencia de este inhibidor. Debido a este efecto, lo más apropiado sería repetir estos ensayos con inhibidores que actúen en las primeras etapas de la vía de síntesis de ceramidas a partir de palmitato, como la miriocina o la cicloserina que inhiben la reacción de la enzima SPT que es específica de esta ruta de síntesis de ceramidas y no debieran tener mayores efectos por sí mismas.

## **7.8. Perspectivas**

Este es el primer trabajo que muestra la relación existente entre la desensibilización de la vía de señalización de la insulina inducida por ceramidas y la dinámica mitocondrial. Los datos presentados en esta tesis abren una nueva línea de investigación sobre la regulación de la transducción de señales y la estabilidad de la red mitocondrial. Nuevos experimentos podrían ayudar a resolver algunas de las preguntas que se desprenden de este trabajo. Aún queda por resolver qué consecuencias tienen en nuestro modelo las ceramidas sobre la disminución de los efectos metabólicos de la insulina y si éstos, al igual que la fosforilación de Akt, pueden ser rescatados al prevenir la fragmentación de la red mitocondrial. También falta por dilucidar si el balance de la dinámica mitocondrial tiene realmente algún efecto sobre la localización intracelular de Akt y si esto contribuye a su activación. Además, a pesar de que se ha observado la localización mitocondrial de Akt en respuesta a insulina, aún no se han descrito todos los blancos directos de esta quinasa al interior de la mitocondria, y cómo esta regulación puede afectar el metabolismo y función mitocondrial.

Finalmente, este trabajo proporciona evidencias de cómo el exceso de lípidos y la producción de metabolitos nocivos como las ceramidas podrían generar daño en el

tejido cardiaco. El corazón, debido a su alto requerimiento energético, tiene una fuerte dependencia de la función mitocondrial. Las ceramidas, al inducir disfunción y fisión mitocondrial, además de la resistencia a la hormona insulina, pueden tener un efecto negativo sobre la función cardiaca y podrían estar actuando como mediadores lipotóxicos en patologías como la cardiomiopatía diabética. Ya que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte entre los pacientes diabéticos, es de gran relevancia la investigación en torno a los mecanismos que generan el daño en este tejido y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de estas patologías.



**Figura 14. Modelo final.**

Las ceramidas favorecen el proceso de fisión mitocondrial en los cardiomiocitos, aumentando la translocación de Drp-1 hacia este organelo. La fragmentación de la red mitocondrial inducida por las ceramidas es necesaria para la desensibilización de la vía de señalización de la insulina a nivel de Akt. Por otra parte, la fisión mitocondrial inducida por palmitato en nuestro modelo, depende, en parte, de la generación endógena de ceramidas. IRS-1, sustrato del receptor de insulina 1; PI-3K, fosfatidilinositol-3 kinasa; PIP3, fosfatidilinositoltrifosfato; Akt, proteína kinasa B.

## 8. CONCLUSIONES

1. La estimulación aguda con C<sub>2</sub>-ceramida disminuyó la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup> tanto a nivel basal como en respuesta a insulina en cultivos de cardiomiocitos de rata, demostrando así, por primera vez, el efecto de desensibilización de esta vía mediado por ceramidas en este modelo.

2. La exposición aguda de los cardiomiocitos a C<sub>2</sub>-ceramida causó fragmentación de la red mitocondrial y aumentó la translocación de la proteína de fisión mitocondrial Drp-1 hacia este organelo, señalando así que existen alteraciones en la dinámica mitocondrial en las mismas condiciones en las cuales se observa la desensibilización de la vía de señalización de insulina en este modelo.

3. La inhibición de Drp-1, ya sea mediante la sobreexpresión de un dominante negativo o un inhibidor químico, previno la fragmentación de la red mitocondrial inducida por C<sub>2</sub>-ceramida en cardiomiocitos, demostrando que es posible mantener una morfología mitocondrial intacta incluso en presencia de ceramidas.

4. La prevención de la fisión mitocondrial mediante la inhibición de Drp-1 en cardiomiocitos tratados con C<sub>2</sub>-ceramida, rescata la fosforilación de Akt en respuesta a insulina, no así la fosforilación basal. Esto demuestra que la fragmentación de la red mitocondrial inducida por ceramidas en nuestro modelo es necesaria para la disminución de la activación de Akt.

5. La inhibición de la síntesis *de novo* de ceramidas en cardiomiocitos estimulados agudamente con palmitato previene la fragmentación de la red mitocondrial, no así la translocación de Drp-1 hacia la mitocondria. Esto nos indica que la fragmentación de la red mitocondrial inducida por palmitato requiere, en parte, de la producción endógena de ceramidas. Además, podemos deducir de nuestros resultados que la translocación de Drp-1 hacia la mitocondria no siempre es acompañada de un aumento en el proceso de fisión mitocondrial, ya que es necesario considerar además su actividad GTPasa.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Adams, J.M. et al., 2004. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53:25–31.

Amati, F. et al., 2011. Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance : another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes* 60:2588–2597.

Andrieu-Abadie, N. et al., 2001. Ceramide in apoptosis signaling: Relationship with oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 31:717–28.

Bach, D. et al., 2005. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle. *Diabetes* 54:2685–93.

Bielawska, A. et al., 1993. Selectivity of ceramide-mediated biology. *J Biol Chem* 268:26226–32.

Bikman, B.T. & Summers, S.A., 2011. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J Clin Invest* 121:4222–30.

Bionda, C. et al., 2004. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J* 382:527–33.

Blaak, E.E., 2005. Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:391–403.

Bonen, A. et al., 2004. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc* 63:245–9.

Brands, M., Verhoeven, A.J. & Serlie, M.J., 2012. Role of mitochondrial function in insulin resistance R. Scatena, P. Bottoni, & B. Giardina, eds. *Adv Exp Med Biol* 942:215–34.

Brownsey, R.W., Boone, A.N. & Allard, M.F., 1997. Actions of insulin on the mammalian heart : metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res* 34:3–24.

Cassidy-Stone, A. et al., 2008. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell* 14:193–204.

- Cereghetti, G.M. et al., 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15803–8.
- Chan, D.C., 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:79–99.
- Chang, C.R. & Blackstone, C., 2007. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282:21583–7.
- Chavez, J.A. et al., 2003. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 278:10297–303.
- Chavez, J.A. & Summers, S.A., 2010. Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1801:252–65.
- Chavez, J.A. & Summers, S.A., 2012. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab* 15:585–94.
- Chen, H. & Chan, D.C., 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14:283–9.
- Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D.C., 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280:6185–92.
- Cheng, L. et al., 2004. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat Med* 10:1245–50.
- Chien, K.R. et al., 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 5:3037–46.
- Chinnery, P.F. & Schon, E.A., 2003. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:1188–99.
- Choi, K. & Kim, Y.B., 2010. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 25:119–29.
- Cipolat, S. et al., 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15927–32.

- Cribbs, J.T. & Strack, S., 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8:939–44.
- Detmer, S.A. & Chan, D.C., 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:870–9.
- Dikov, D. & Reichert, A.S., 2011. How to split up: lessons from mitochondria. *EMBO J* 30:2751–3.
- Dobrowskyss, R.T. et al., 1993. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 268:15523–30.
- Dobrzyn, A., Zendzian-Piotrowska, M & Gorski, J, 2004. Effect of endurance training on the sphingomyelin signalling pathway activity in the skeletal muscle of the rat. *J Physiol Pharmacol* 55:305–13.
- Dobrzyn, A., Knapp, M. & Górski, J., 2004. Effect of acute exercise and training on metabolism of ceramide in the heart muscle of the rat. *Acta Physiol Scand* 181:313–9.
- Dubé, J J et al., 2011. Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide. *Diabetologia* 54:1147–56.
- Dumas, J.F. et al., 2009. Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans? *Diabetes Metab* 35:159–67.
- Figuroa-Romero, C. et al., 2009. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *FASEB J* 23:3917–27.
- Frezza, C. et al., 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126:177–89.
- García-Ruiz, C. et al., 1997. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 272:11369–77.
- Ghafourifar, P. et al., 1999. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 274:6080–4.
- Goldstein, B.J., 2002. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90:3–10.

- Gudz, T.I., Tserng, K.Y. & Hoppel, C.L., 1997. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem* 272:24154–8.
- Gulbins, E. & Li, P.L., 2006. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:11–26.
- Guo, Z., 2007. Intramyocellular lipid kinetics and insulin resistance. *Lipids Health Dis* 6:18-26.
- Guo, Z., 2008. Intramyocellular lipids: maker vs. marker of insulin resistance. *Med Hypotheses* 70:625–9.
- Han, X.J. et al., 2008. CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182:573–85.
- Hanada, K. et al., 2007. CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta* 1771:644–53.
- Hanada, K., 2006. Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide. *Mol Cell Biochem* 286:23–31.
- Hannun, Y.A. & Obeid, L.M., 2011. Many ceramides. *J Biol Chem* 286:27855–62.
- Hannun, YA. & Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139–50.
- Hannun, Y.A. & Obeid, L.M., 2002. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 277:25847–50.
- Harder, Z., Zunino, R. & McBride, H., 2004. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* 14:340–5.
- van Herpen, N.A. & Schrauwen-Hinderling, V.B., 2008. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav* 94:231–41.
- Holland W.L. et al., 2007a. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5:167–79.
- Holland W.L. et al., 2007b. Lipid Mediators of Insulin Resistance. *Nutr Rev* 65:39–46.

Holland, W.L. & Summers, S.A., 2008. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev* 29:381–402.

Hoppins, S., Lackner, L. & Nunnari, J., 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:751–80.

Houtkooper, R.H. & Vaz, F.M., 2008. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65:2493–506.

Hue, L. & Taegtmeyer, H., 2009. The Randle cycle revisited : a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:578–91.

Ingerman, E. et al., 2005. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170:1021–7.

Ingwall, J.S., 2009. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res* 81:412–9.

Instituto Nacional de Estadísticas Chile, 2007. *Evolución de la Mortalidad en Chile 1990-2007*,  
[http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario\\_de\\_publicaciones/pdf/010211/evo90\\_07\\_010211.pdf](http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/010211/evo90_07_010211.pdf).

JeBailey, L. et al., 2007. Ceramide- and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent Rac-activation and actin remodeling in muscle cells. *Diabetes* 56:394–403.

Jheng, H.F. et al., 2012. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 32:309–19.

Kanety, H. et al., 1996. Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 271:9895–7.

Kanzaki, M. & Pessin, J.E., 2001. Signal integration and the specificity of insulin action. *Cell Biochem Biophys* 35:191–209.

Karbowski, M., Neutzner, A. & Youle, R.J., 2007. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* 178:71–84.

Kelley, D.E. et al., 2002. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944–50.

Kim, J.A., Wei, Y. & Sowers, J.R., 2008. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res* 102:401–14.

Kumagai, K. et al., 2005. CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J Biol Chem* 280:6488–95.

Kusminski, C.M. et al., 2009. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis* 14:1484–95.

Kuzmivic, J., 2011. *Regulación de la función y dinámica mitocondrial por palmitato en el cardiomiocito.*

Kuzmivic, J. et al., 2011. [Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure]. *Rev Esp Cardiol* 64:916–23.

Lawlor, D.A., Smith, G.D. & Ebrahim, S., 2006. Obesity and vascular disease. *Diabetologia* 49:41–8.

Liesa, M., Palacín, M. & Zorzano, A., 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89:799–845.

Longo, N., Amat di San Filippo, C. & Pasquali, M., 2006. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 85:77–85.

Lopaschuk, G.D. et al., 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90:207–58.

Lopaschuk, G.D., Folmes, C.D.L. & Stanley, W.C., 2007. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 101:335–47.

Luiken, J.J.F.P. et al., 2004. Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflügers Arch* 448:1–15.

Mathias, S., Peña, L. a & Kolesnick, R.N., 1998. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 335:465–80.

Ministerio de Salud Gobierno de Chile, 2010. Encuesta nacional de salud Chile 2009-2010.

<http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/99c12b89738d80d5e04001011e0113f8.pdf>.

Mittra, S., Bansal, V.S. & Bhatnagar, P.K., 2008. From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. *Drug Discov Today* 13:211–8.

- Morino, K. et al., 2005. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115:3587–93.
- Muniyappa, R. et al., 2007. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 28:463–91.
- Nakamura, N. et al., 2006. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* 7:1019–22.
- Neely, J. & Morgan, H., 1974. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu Rev Physiol* 36:413–59.
- Okamoto, K. & Shaw, J.M., 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39:503–36.
- Otera, H. et al., 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191:1141–58.
- Otera, H. & Mihara, K., 2011. Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases* 2:167–72.
- Palmer, C.S. et al., 2011. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 12:565–73.
- Pan, D.A. et al., 1997. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 46:983–8.
- Park, Y.Y. et al., 2010. Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J Cell Sci* 123:619–26.
- Parra, V., 2011. *Regulación del metabolismo energético cardiaco por insulina y su relación con la fusión y fisión mitocondrial.*
- Parra, V. et al., 2008. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc Res* 77:387–97.
- Parra, V. et al., 2011. The complex interplay between mitochondrial dynamics and cardiac metabolism. *J Bioenerg Biomembr* 43:47–51.
- Paz, K. et al., 1997. A molecular basis for insulin resistance. *J Biol Chem* 272:29911–8.

- Peraldi, P. et al., 1996. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 271:13018–22.
- Perry, R.J. & Ridgway, N.D., 2005. Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim Biophys Acta* 1734:220–34.
- Petersen, K.F. et al., 2003. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300:1140–2.
- Planavila, A. et al., 2005. Increased Akt protein expression is associated with decreased ceramide content in skeletal muscle of troglitazone-treated mice. *Biochem Pharmacol* 69:1195–204.
- Powell, D.J. et al., 2003. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKC $\zeta$ -dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 23:7794–808.
- Powell, D.J. et al., 2004. Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C $\zeta$  activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J* 383:619–629.
- Ritov, V.B. et al., 2005. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54:8–14.
- Samuel, V.T., Petersen, K.F. & Shulman, G.I., 2010. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375:2267–77.
- Samuel, V.T. & Shulman, G.I., 2012. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148:852–71.
- Schrauwen, P. et al., 2010. Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801:266–71.
- Siskind, L.J., 2005. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 37:143–53.
- Smirnova, E. et al., 1998. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143:351–8.
- Smirnova, E. et al., 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12:2245–56.

- Song, Z. et al., 2009. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* 20:3525–32.
- Stancevic, B. & Kolesnick, R., 2010. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS letters* 584:1728–40.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A. & Lopaschuk, G.D., 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85:1093–129.
- Straczkowski, M. et al., 2004. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes* 53:1215–21.
- Stratford, S. et al., 2004. Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* 279:36608–15.
- Stratford, S., DeWald, D.B. & Summers, S.A., 2001. Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem J* 354:359–68.
- Summers, S.A. et al., 1998. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 18:5457–64.
- Summers, S.A., 2006. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 45:42–72.
- Szczepaniak, L.S. et al., 2007. Forgotten but not gone: the rediscovery of fatty heart, the most common unrecognized disease in America. *Circ Res* 101:759–67.
- Szendroedi, J., Phielix, E. & Roden, M., 2012. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 8:92–103.
- Szewczyk, A. & Wojtczak, L., 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 54:101–27.
- Taguchi, N. et al., 2007. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282:11521–9.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, C.R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85–96.

Turner, N. & Heilbronn, L.K., 2008. Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends Endocrinol Metab* 19:324–30.

Unger, R.H. et al., 2010. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1801:209–14.

Unger, R.H. & Orci, L., 2002. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta* 1585:202–12.

Ussher, J.R. et al., 2010. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* 59:2453–64.

Virkamäki, A. et al., 2001. Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes* 50:2337–43.

van der Vusse, G.J., van Bilsen, M. & Glatz, J.F., 2000. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res* 45:279–93.

Weber, K.T. & Brilla, C.G., 1993. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clin Cardiol* 16:10–4.

Wild, S.H. & Byrne, C.D., 2006. Risk factors for diabetes and coronary heart disease. *Diabetologia* 333:1009–11.

Yang, J. et al., 2004. Ceramide and other sphingolipids in cellular responses. *Cell Biochem Biophys* 40:323–50.

Yang, J.Y. et al., 2009. Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 46:919–26.

Yip, C.C. & Ottensmeyer, P., 2003. Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem* 278:27329–32.

Yonashiro, R. et al., 2006. A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 25:3618–26.

Yoon, Y., Pitts, K.R. & McNiven, M. a, 2001. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* 12:2894–905.

- Zhang, L. et al., 2010. Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1801:1–22.
- Zhao, J. et al., 2011. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J* 30:2762–78.
- Zheng, W. et al., 2006. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1758:1864–84.
- Zhou, H. et al., 1998. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273:16568–75.
- Zhou, Y.T. et al., 2000. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1784–9.
- Zhu, P.P. et al., 2004. Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J Biol Chem* 279:35967–74.
- Zorzano, A., Liesa, M. & Palacín, M., 2009a. Mitochondrial dynamics as a bridge between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Arch Physiol Biochem* 115:1–12.
- Zorzano, A., Liesa, M. & Palacín, M., 2009b. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1846–54.
- Zunino, R. et al., 2007. The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* 120:1178–88.