

# Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



## “Estudio de la señalización de insulina en cardiomiocitos hipertróficos”

Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado académico de Magister en Bioquímica en el área de  
especialización Toxicología y Diagnóstico Molecular y  
Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

**Tomás Raúl Gutiérrez Aceituno**

Directores de tesis:

Dr. Mario Chiong L - Dr. Sergio Lavandero G

SANTIAGO- CHILE  
2012

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

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

TOMÁS GUTIÉRREZ ACEITUNO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Bioquímica área de especialización Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_\_ de 2012.

Directores de Tesis:

Dr. Mario Chiong L.

\_\_\_\_\_

Dr. Sergio Lavandero G.

\_\_\_\_\_

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Hernán Lara P. (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Guillermo Díaz A.

\_\_\_\_\_

Dra. Paulina Donoso L.

\_\_\_\_\_

*Dedicada a Francisca,  
mi musa inspiradora.*

Esta tesis de Magister 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 de 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 las siguientes becas y proyectos:

- Beca de Magister en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas (TG).
- Proyecto FONDAP 15010006 (SL).
- Proyecto FONDECYT 1120212 (SL).

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis, así como las metodologías desarrolladas para su realización, han sido publicados y presentados en congresos nacionales. Las publicaciones y congresos se citan a continuación.

- Publicaciones:

Bravo R, **Gutiérrez T**, Paredes F, Gatica D, Rodríguez AE, Pedrozo Z, Chiong M, Parra V, Quest AFG, Rothermel BA, Lavandero S. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol.* 44, 16-20, 2012.

Bravo-Sagua R, Rodríguez AE, Kuzmicic J, **Gutiérrez T**, Lopez-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.* Manuscrito aceptado para publicación, 2012.

Troncoso R, Vasquez-Trincado C, del Campo A, Gatica D, Morales P, Paredes F, **Gutiérrez T**, Lopez-Crisosto C, Torrealba N, Garcia L, Diaz-Araya G, Battiprolu PK, Nemchenko A, Ferdous A, Gillette TG, Hill JA, Lavandero S. Autophagy: Principles, Regulation and Roles in disease. Nikolai Gorbunov (The Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine, Inc. Bethesda, Maryland) Chapter 9. Regulation of autophagy by Insulin/IGF-1 signaling pathways. Nova Publishers, 2011.

Pennanen C, Parra V, López-Crisosto C, Morales P, del Campo A, Verdejo H, **Gutiérrez T**, Rivera P, Zepeda R, Ferreira J, Chiong M, Lavandero S. Mitochondrial dynamics plays a critical role in the development of norepinephrine-induced cardiac hypertrophy in a calcineurin-regulated pathway. Manuscrito en escritura.

**Gutiérrez T**, Parra V, Troncoso R, Lavandero S. Impaired insulin-induced mitochondrial calcium signaling plays a critical role in the reduced insulin response in hypertrophic cardiomyocytes. Manuscrito en escritura.

- Congresos:

**Gutiérrez T**, Parra V, Pennanen C, Troncoso R, Contreras A, Bravo R, Lavadero S. Regulation of insulin-induced calcium response in cultured hypertrophic cardiomyocytes. XXXIV Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 2011.

del Campo A, Parra V, **Gutiérrez T**, Kuzmicic J, Lavadero S. Insulin promotes mitochondrial fusion and enhances mitochondrial metabolism in cultured skeletal muscle cells. XXXIV Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 2011.

## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas que me han acompañado y animado durante el desarrollo de este trabajo y a ellos quisiera expresar mi sincero agradecimiento.

Primero, a mis directores de tesis, Dr. Mario Chiong y Dr. Sergio Lavandero, por su guía, confianza y por haberme dado la oportunidad de formar parte de este increíble laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por el apoyo y la alegría que han compartido conmigo durante todo este tiempo. Especialmente al Grupo Mitocondrias, por su gran capacidad de trabajo e incontables sugerencias. Gracias a ustedes cada día de trabajo fue tremendamente enriquecedor, tanto personal como profesionalmente.

A Valentina y Rodrigo, gracias por su ayuda e infinitos consejos y por impulsarme a llevar este trabajo más lejos que lo que yo nunca habría imaginado. Aprender de ustedes y trabajar a su lado ha sido un verdadero honor.

Muy especialmente a mi familia, mis padres Cecilia y Raúl y mi pequeña hermanita Francisca, su cariño y confianza incondicionales han sido fundamentales en mi desarrollo como persona. También a mi segunda familia, por haberme abierto las puertas de su hogar y recibido como un hijo más. Pocas personas tienen la suerte de tener dos familias como estas.

No puedo terminar sin agradecer a Francisca por todo su amor, paciencia y apoyo. Gracias por estar conmigo en cada momento. Cada instante de los últimos seis años ha sido especial gracias a ti.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS .....	v
RESUMEN.....	vii
SUMMARY .....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipertrofia cardiaca .....	1
1.2. Tipos de hipertrofia cardiaca .....	2
1.3. Estímulos hipertróficos .....	2
1.4. Hipertrofia y metabolismo cardiaco .....	4
1.5. Insulina .....	6
1.6. Señalización de insulina.....	6
1.7. Ca <sup>2+</sup> en la señalización de insulina.....	8
1.8. Efectos de insulina en el corazón.....	8
1.9. Alteración de la respuesta a insulina en el cardiomiocito hipertrófico .....	11
1.10. Señalización de Ca <sup>2+</sup> y mitocondria.....	12
1.11. Regulación de la entrada de Ca <sup>2+</sup> a la mitocondria.....	13
1.12. Ca <sup>2+</sup> como regulador del metabolismo mitocondrial .....	14
2. HIPÓTESIS .....	17
3. OBJETIVO GENERAL .....	17
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Reactivos .....	18
5.2. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata .....	18



5.3. Modelo experimental.....	19
5.4. Preparación de extractos celulares totales.....	19
5.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	20
5.6. Electrotransferencia de proteínas.....	20
5.7. Western blot.....	20
5.8. Determinación de área, perímetro y sarcomerización del cardiomiocito.....	21
5.9. Medición de los niveles intracelulares de $Ca^{2+}$ .....	21
5.10. Estudio de la colocación mitocondria-RE.....	22
5.11. Medición de la velocidad del consumo de oxígeno celular mediante oxigrafía de Clark .....	22
5.12. Análisis estadístico.....	23
6. RESULTADOS .....	24
6.1. Insulina incrementa los niveles de $Ca^{2+}$ mitocondrial.....	24
6.2. El ingreso de $Ca^{2+}$ a la mitocondria inducido por insulina depende del $IP_3R$ .....	25
6.3. Establecimiento del modelo hipertrófico inducido por NA.....	27
6.4. Desensibilización de la respuesta a insulina en el cardiomiocito hipertrófico .....	28
6.5. Incremento de $Ca^{2+}$ citoplasmático inducido por insulina no se altera en los cardiomiocitos hipertróficos.....	29
6.6. El incremento de $Ca^{2+}$ mitocondrial inducido por insulina se atenúa en los cardiomiocitos hipertróficos .....	32
6.7. El incremento de $Ca^{2+}$ mitocondrial inducido por histamina también está atenuado en los cardiomiocitos hipertróficos .....	34
6.8. Los contactos RE-mitocondria están reducidos en los cardiomocitos hipertróficos.....	35
6.9. El bloqueo de la entrada de $Ca^{2+}$ a la mitocondria reduce la respuesta a insulina .....	39

7. DISCUSIÓN .....	41
7.1. Insulina y su relación con el Ca <sup>2+</sup> mitocondrial .....	41
7.2. Señales citoplasmática y mitocondrial de Ca <sup>2+</sup> dependientes de insulina en el cardiomiocito hipertrófico.....	42
7.3. Regulación del consumo de oxígeno y fosforilación de Akt por la señal de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial dependiente de insulina .....	46
7.4. Regulación de los contactos RE-mitocondria.....	48
7.5. Modelo .....	49
8. CONCLUSIONES .....	51
9. BIBLIOGRAFÍA.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Señalización de noradrenalina (NA) en el cardiomiocito .....	5
Figura 2: Señalización de insulina y captación de glucosa .....	10
Figura 3: Acoplamiento RE-mitocondria y traspaso de $Ca^{2+}$ .....	15
Figura 4: Insulina incrementa los niveles del $Ca^{2+}$ mitocondrial en el cardiomiocito de forma independiente del RyR.....	26
Figura 5: Insulina incrementa los niveles del $Ca^{2+}$ mitocondrial mediante una liberación de $Ca^{2+}$ a través del $IP_3R$ .....	30
Figura 6: Modelo de hipertrofia cardiaca inducido por NA.....	31
Figura 7: Desensibilización de la respuesta a insulina en cardiomiocitos hipertróficos.....	33
Figura 8: Incremento del $Ca^{2+}$ citoplasmático inducido por insulina no se altera en hipertrofia .....	34
Figura 9: El incremento del $Ca^{2+}$ mitocondrial inducido por insulina está reducido en los cardiomiocitos hipertróficos .....	36
Figura 10: El incremento de $Ca^{2+}$ mitocondrial inducido por histamina está reducido en los cardiomiocitos hipertróficos.....	36
Figura 11: La colocación entre RE y mitocondria se reduce en los cardiomiocitos hipertróficos .....	38
Figura 12: La respuesta a insulina depende de la entrada de $Ca^{2+}$ a la mitocondria.....	40
Figura 14: Modelo de la participación del $Ca^{2+}$ citoplasmático y mitocondrial en la activación de Akt y el consumo de oxígeno en respuesta a insulina en el cardiomiocito.....	50

## ABREVIATURAS

$\beta$ -MHC:	Cadena pesada de $\beta$ -miosina
AR:	Receptor adrenérgico
CCCP:	Carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona
CN:	Calcineurina
DAG:	Diacilglicerol
h:	Horas
IP <sub>3</sub> :	Inositol-1,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R:	Receptor de inositol-1,4,5-trifosfato
IRS1/2:	Sustrato 1/2 del receptor de insulina
MAPK:	Proteína kinasa activada por mitógenos
mCU:	Uniporter de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial
Mfn2:	Mitofusina 2
min:	Minutos
NA:	Noradrenalina
PDH:	Piruvato deshidrogenasa
PFK-2:	6-fosfofructo-2-kinasa
PI3K:	Fosfatidilinositol 3-kinasa
PIP2:	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3:	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC:	Proteína kinasa C
PLC:	Fosfolipasa C

RE: Retículo endoplasmático  
RyR: Receptor de ryanodina  
seg: Segundos

## RESUMEN

La hipertrofia cardíaca es un proceso fisiopatológico que busca compensar un incremento en la carga de trabajo del corazón. Este proceso se caracteriza por un incremento en el tamaño de los cardiomiocitos, células encargadas de la contracción del corazón, llevando a un aumento en el tamaño de este órgano. En un principio la hipertrofia busca mejorar la función cardíaca, fenómeno conocido como hipertrofia adaptativa. Si esta condición se mantiene en el tiempo se produce hipertrofia patológica, que se caracteriza por ser irreversible y predisponer al desarrollo de arritmias, insuficiencia cardíaca y muerte súbita. Al mismo tiempo, el corazón hipertrófico presenta importantes cambios en su metabolismo energético, homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y un estado de resistencia a la insulina.

La insulina es una hormona fundamental para la regulación del metabolismo energético del organismo y es clave en el control de los niveles plasmáticos de glucosa. En el corazón, su principal función es promover la entrada de glucosa al cardiomiocito y favorecer su uso como fuente energética, promoviendo la glicólisis y su posterior oxidación en la mitocondria. La resistencia a insulina en el corazón como la observada en hipertrofia, se asocia a una menor capacidad de trabajo y constituye un factor de riesgo para insuficiencia cardíaca y muerte post-isquemia, por lo que conocer con mayor profundidad sus características moleculares es de gran importancia.

Recientemente se ha descrito que la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplasmático (principal reservorio intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ) a través de los receptores/canales de inositol-1,4,5-trifosfato es un elemento clave para la acción metabólica de insulina, incluida la captación de glucosa. Por otro lado, se sabe que la mitocondria regula las señales mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , actuando como un amortiguador e incorporando  $\text{Ca}^{2+}$  luego de un incremento de sus niveles en el citoplasma. A su vez, este  $\text{Ca}^{2+}$  es un importante regulador del metabolismo mitocondrial.

A pesar de su capacidad para generar una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma, se desconoce si insulina regula el metabolismo mitocondrial mediante un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria. Por otro lado, se desconoce si la resistencia a insulina generada por hipertrofia ocurre a consecuencia de una menor liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a esta hormona. A fin de responder estas interrogantes, el principal objetivo de esta tesis consistió en evaluar si los cardiomiocitos hipertróficos presentan una menor señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y/o mitocondrial en respuesta a insulina comparado con cardiomiocitos controles.

Para evaluar esta posibilidad, cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se estimularon con noradrenalina, un estímulo clásico para generar hipertrofia patológica, por 24 h y luego se midió la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a insulina. Para comprobar que estos cardiomiocitos presentaban una menor respuesta a insulina se evaluaron la fosforilación de Akt, un marcador de los efectos metabólicos de esta hormona, y el consumo de oxígeno, un marcador de la actividad metabólica mitocondrial. Se observó una reducción de ambos parámetros en cardiomiocitos hipertróficos en respuesta a insulina. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a insulina se midió mediante microscopía confocal y sondas fluorescentes sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  destinadas específicamente al citoplasma y la mitocondria. Los cardiomiocitos hipertróficos mostraron una marcada reducción en el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en respuesta a insulina, mientras que el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático no se modificó.

Mediante un estudio de colocalización usando microscopía confocal y sondas fluorescentes organelo-específicas, se determinó que la menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria se podría deber a un alejamiento entre el retículo endoplasmático y la mitocondria. Luego, mediante el uso de rojo rutenio, un inhibidor de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria, se determinó que este evento es necesario para la fosforilación de Akt y para el incremento en el consumo de oxígeno en respuesta a insulina. De esta forma, el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial surge como un importante intermediario en la respuesta a insulina que regula la respuesta metabólica inducida por esta hormona, mientras que el bloqueo en el traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria podría ser un importante mecanismo patológico que reduce la respuesta a insulina.

## SUMMARY

Cardiac hypertrophy is a pathophysiological process that aims to compensate an increase in the working load of the heart. This process is characterized by an increase in cardiomyocyte size, the cells in charge of heart contraction, leading to an enlargement of this organ. In the beginning, hypertrophy aims to improve cardiac function, a process known as adaptative hypertrophy. If it is maintained in time it can turn into a pathological hypertrophy, which is irreversible and predisposes to arrhythmia, heart failure and sudden death. At the same time, the hypertrophic heart shows significant changes on energy metabolism,  $\text{Ca}^{2+}$  handling and an insulin resistant condition.

Insulin is a key regulator of energy metabolism and plasma glucose levels. In the heart, its main function is to promote glucose entry to the cardiomyocytes and its use as an energy source through the activation of glycolysis and oxidation in the mitochondria. Insulin resistance observed in cardiac hypertrophy is associated with a reduced working capacity and is a risk factor for heart failure and post-ischemic cell death. That is the reason why a better understanding of its molecular characteristics is of great relevance.

Recently, it has been described that  $\text{Ca}^{2+}$  exit from the endoplasmic reticulum (the main reserve of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ) through inositol 1,4,5-triphosphate receptor/channel is a key element for insulin action, including glucose uptake. In addition, it is known that mitochondrion is very important in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  signals, acting as a buffer and up taking  $\text{Ca}^{2+}$  after an increase in its cytoplasmic levels, especially following a release through this channel. At the same time, this  $\text{Ca}^{2+}$  is an important regulator of mitochondrial metabolism.

In spite of its  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing capacity, it is not known if insulin regulates mitochondrial metabolism through an increase in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  levels.



Additionally, it is also unknown if the insulin resistance generated by hypertrophy occurs in response to a reduced  $\text{Ca}^{2+}$  release in response to this hormone. In order to answer these queries, the main objective of this thesis consisted in evaluating if hypertrophic cardiomyocytes show a reduced mitochondrial and/or cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signal after insulin stimulation compared to normal cardiomyocytes.

To evaluate this possibility, neonatal rat cardiomyocytes were stimulated with norepinephrine, a classic stimulus to generate pathologic hypertrophy, for 24 h and then the  $\text{Ca}^{2+}$  signal in response to insulin was measured. In order to confirm the reduced insulin response of these cardiomyocytes, Akt phosphorylation, a marker of the metabolic action of insulin, and oxygen consumption, a measure of mitochondrial metabolic activity, were evaluated after insulin stimulation. Both parameters showed a reduction in hypertrophic cardiomyocytes in response to insulin. Insulin  $\text{Ca}^{2+}$ -signal was measured by confocal microscopy and cytoplasm and mitochondrion-selective  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent probes. Hypertrophic cardiomyocytes showed a reduction in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  increase after insulin stimulation, whereas cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  increase was unaffected.

By a colocalization analysis using confocal microscopy and organelle-specific fluorescent probes, it was determined that a reduction in contacts between both organelles could explain the reduction in  $\text{Ca}^{2+}$  transfer in hypertrophic cardiomyocytes. Finally, pharmacological blocking of  $\text{Ca}^{2+}$  entry to the mitochondria through the use of ruthenium red showed that this process was necessary to the increase of Akt phosphorylation and oxygen consumption after insulin stimulation. In this way, mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake comes as a novel and significant mediator in the regulation of insulin response, while the blockade of  $\text{Ca}^{2+}$  transfer to the mitochondria could be an important pathological mechanism that leads to insulin resistance.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Hipertrofia cardiaca

La hipertrofia cardiaca es un proceso fisiopatológico que se produce para compensar un aumento en la carga de trabajo, lo que genera finalmente un aumento del tamaño del corazón (Ahuja y cols., 2007). La capacidad de contracción de este órgano depende de los cardiomiocitos, células que componen el músculo cardiaco y que ocupan la mayor parte del volumen del corazón (Vliegen y cols., 1991). Ellos corresponden a células terminalmente diferenciadas y con una escasa capacidad de replicación, por lo que el incremento en el tamaño del miocardio se debe al aumento del tamaño de los cardiomiocitos y no a un aumento en su número.

A pesar de que, en principio, la hipertrofia es una respuesta adaptativa que busca mejorar la función cardiaca, al largo plazo se torna irreversible y predispone al desarrollo de diversas patologías cardiacas, entre las cuales se destacan la insuficiencia cardiaca, arritmias y la muerte súbita (Berenji y cols., 2005; Levy y cols., 1990). La hipertrofia cardiaca, además de generar un engrosamiento de las paredes del ventrículo, se acompaña de fibrosis (Deschamps y Spinale, 2006) y muerte de cardiomiocitos (Kang e Izumo, 2003). Paralelamente a nivel celular, se observa un aumento tanto de la síntesis de proteínas como del volumen del cardiomiocito, además de un reordenamiento de su estructura sarcomérica (Koshman y cols., 2010). Molecularmente, los cardiomiocitos hipertróficos presentan una reexpresión de varias proteínas fetales, entre las que se encuentran el factor natriurético auricular (ANF), la cadena pesada de la  $\beta$ -miosina ( $\beta$ -MHC) y la actina de músculo esquelético (SKA), entre otras (Depre y cols., 1998; Sadoshima e Izumo, 1997).

## **1.2. Tipos de hipertrofia cardiaca**

La hipertrofia se puede dividir en dos grupos dependiendo de sus consecuencias sobre la función cardiaca, adaptativa o patológica. La de tipo adaptativa se presenta básicamente en dos casos, durante el desarrollo normal postnatal, proceso conocido también con el nombre de eutrofia, o como un proceso fisiológico como consecuencia de ejercicio físico, por ejemplo, en deportistas (Gupta y cols., 2007). Este tipo de hipertrofia no lleva a una disminución posterior de la función cardiaca ni se asocia al desarrollo de patologías. Su desarrollo genera un engrosamiento de las paredes del ventrículo junto con un aumento del tamaño de la cámara ventricular. El cardiomiocito experimenta un crecimiento longitudinal debido principalmente a la adición de sarcómeros en serie. Este tipo de hipertrofia se conoce como hipertrofia excéntrica (Dorn y Force, 2005). Por otro lado, la hipertrofia cardiaca patológica se produce debido a estímulos dañinos como hipertensión arterial, infarto al miocardio o miocarditis (Frey y cols., 2004). En este tipo de hipertrofia se observa un engrosamiento de las paredes del ventrículo junto con una disminución del volumen de la cámara ventricular, lo que se conoce como hipertrofia concéntrica. En este caso, los sarcómeros se agregan en serie generando un crecimiento lateral del cardiomiocito y, a diferencia de la hipertrofia adaptativa, la hipertrofia patológica es irreversible (Iemitsu y cols., 2003; Kong y cols., 2005).

## **1.3. Estímulos hipertróficos**

Existen principalmente dos tipos de estímulos que pueden llevar a hipertrofia cardiaca: el estiramiento mecánico (Zobel y cols., 2007) y los factores neurohormonales (Esler, 2000; Garcia e Incerpi, 2008; Schaub y cols., 1997). Todos ellos pueden actuar de manera simultánea durante el desarrollo fisiopatológico de la hipertrofia, activando sistemas transduccionales complejos. Entre los factores neurohormonales más importantes se encuentran los que se unen a receptores con actividad tirosina kinasa, como el factor de crecimiento análogo a insulina-I (IGF-1) y otros factores de crecimiento, los cuales llevan a la activación de la cascada de señalización de Akt y de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Actualmente, se conocen varios integrantes de esta familia, entre las cuales se destacan las proteínas ERK, JNK y p38MAPK, todas las cuales han sido en algún grado vinculadas con el desarrollo de la hipertrofia (Rohini y cols., 2009; Sugden, 1999).

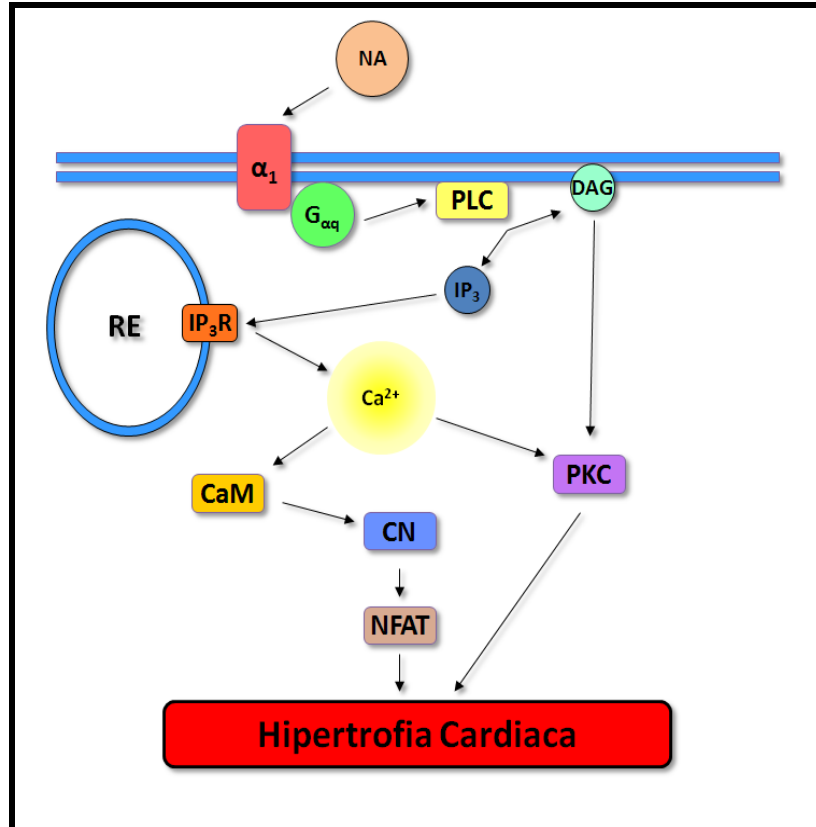
Otro tipo de factores neurohormonales son los que se unen y activan receptores acoplados a proteína G (Lesniak y cols., 1995; Rockmas y cols., 2002; Zimmer y cols., 1995). Como representantes de este grupo, se encuentran dos tipos de receptores adrenérgicos (AR) en el corazón, los  $\alpha$  y los  $\beta$ . De ellos, el más abundante es el  $\beta_1$ -AR, que compone entre el 75 y 80% del total de los receptores  $\beta$ . En cambio, los  $\alpha$ -AR se encuentran en muy baja proporción comparados con los  $\beta$  (relación 10:1), aunque han mostrado tener una mayor participación en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca (Rockman y cols., 2002). El  $\beta_1$ -AR, perteneciente al subgrupo  $G_{\alpha_s}$ , actúa a través de la activación de la adenilato ciclasa, la cual produce adenosin monofosfato cíclico (cAMP) que activa a la proteína kinasa A (PKA). La sobreexpresión de este receptor aumenta la actividad contráctil del corazón, pero a largo plazo lleva al desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardiaca (Bisognano y cols., 2000).

Noradrenalina (NA) junto con adrenalina, angiotensina II y endotelina-1 activan receptores del subtipo  $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$  ( $\alpha_1$ -AR,  $AT_1$  y ET1, respectivamente). Este subtipo de receptores se asocia a la activación de la fosfolipasa C (PLC), que lleva a la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) a partir de la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ). El  $IP_3$  puede viajar al retículo endoplasmático (RE) y unirse al receptor de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) generando una liberación de  $Ca^{+2}$ . El DAG y el  $Ca^{+2}$  activan a la proteína kinasa C (PKC), un intermediario fundamental en la hipertrofia (Molkentin y Dorn, 2001). Por otro lado, los aumentos de  $Ca^{+2}$  en el citoplasma llevan a la activación de otra vía fundamental para la hipertrofia que corresponde a la proteína fosfatasa calcineurina (CN). Esta fosfatasa desfosforila y activa al factor transcripcional NFAT, que lleva a la transcripción de varios genes relacionados con hipertrofia (Wilkins y Molkentin, 2004) (Figura 1). Además, se ha visto que estos receptores pueden llevar a la activación de la vía de las MAPK, mencionadas anteriormente (Sugden, 1999). Estudios *in vivo* han mostrado que la señalización de  $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$  es necesaria para la

hipertrofia producida por sobrecarga de presión (Akhter y cols., 1998; Wettschureck y cols., 2001) y suficiente para generar el fenotipo hipertrófico en ausencia de estímulos perjudiciales (D'Angelo y cols., 1997). Todos estos antecedentes muestran la importancia de los AR en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca.

#### **1.4. Hipertrofia y metabolismo cardiaco**

Se ha descrito que el corazón hipertrófico presenta profundos cambios en su metabolismo energético, principalmente en el uso de sustratos como fuente de energía (Ingwall, 2009). En un corazón normal de rata adulta, la principal fuente energética es la oxidación de ácidos grasos, alcanzando cerca de un 70% de la producción total, mientras que la glucosa sería una fuente secundaria de energía. Cuando existe una mayor demanda energética, aumenta la utilización de glucosa y disminuye la oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, en la hipertrofia cardiaca, la oxidación de ácidos grasos muestra una reducción de aproximadamente un 50% (Allard y cols., 1994). Esta significativa reducción puede ser explicada por diversos mecanismos, incluyendo una reducción en enzimas encargadas de la oxidación, transportadores de ácidos grasos y carnitina (Leong y cols., 2003). En esta transformación metabólica participan diversos receptores nucleares, principalmente ERR, PPAR y PGC-1 $\alpha$ , encargados de la transcripción de diversos genes que codifican proteínas que participan en la captación, transporte a la mitocondria y oxidación de ácidos grasos (Huss y Kelly, 2004). Se ha observado que en los cardiomiocitos hipertróficos, estos receptores nucleares presentan una disminución en sus niveles que es proporcional a la reducción del metabolismo mitocondrial (Barger y cols., 2000; Kanda y cols., 2000). Por otro lado, la sobreexpresión o activación de estos receptores previenen el desarrollo de hipertrofia cardiaca y mejora la actividad contráctil del corazón (Liang y cols., 2003).



**Figura 1: Señalización de noradrenalina (NA) en el cardiomiocito.** El  $\alpha_1$ -AR es el principal receptor de NA asociado al desarrollo de hipertrofia cardíaca. Este receptor pertenece a la familia de receptores acoplado a proteína G del tipo  $\alpha_q$ . La subunidad  $\alpha$  activa a la PLC, formando DAG e  $IP_3$  a partir de  $PIP_2$  en la membrana plasmática. El  $IP_3$  activa al canal de  $Ca^{2+}$   $IP_3R$ , liberando  $Ca^{2+}$  desde el RE al citoplasma. El  $Ca^{2+}$  citoplasmático activa a la fosfatasa CN, la cual desfosforila al factor transcripcional NFAT, favoreciendo su translocación al núcleo. Por otro lado, el  $Ca^{2+}$  citoplasmático junto con el DAG activan a la PKC. Finalmente, estos eventos llevan al desarrollo de hipertrofia cardíaca.

La reducción en el uso de ácidos grasos como fuente de energía generada por la hipertrofia es compensada con un aumento en la captación basal de glucosa (Nascimben y cols., 2004) dada principalmente por un incremento en el transportador de glucosa GLUT1 (Montessuit y Thornburn, 1999). Este aumento en la disponibilidad de glucosa se acompaña de un incremento en la glicólisis (Nascimben y cols., 2004), cuyo aporte a la síntesis de ATP aumenta desde un 7% en la condición control, a prácticamente un 20% en la condición hipertrófica (Allard y cols., 1994). Sin embargo, no se observa un incremento proporcional en la oxidación de la glucosa por parte de la mitocondria. De hecho, algunos estudios muestran una reducción en la oxidación de la glucosa en el corazón hipertrófico (Allard y cols., 1997; Wambolt y cols., 2000). Este desbalance entre la glicólisis y la oxidación de la glucosa se conoce como “desacoplamiento glicolítico” (Leong y cols., 2003). Esta transformación en el metabolismo de la glucosa inducido por hipertrofia se acompaña, además, de una marcada resistencia a la insulina, como se discutirá más adelante.

### **1.5. Insulina**

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células  $\beta$  del páncreas, fundamental para la regulación del metabolismo de la glucosa (MacDonald y cols., 2005). La concentración de glucosa en la sangre está altamente regulada y regresa rápidamente a niveles normales luego de una carga de glucosa externa. Insulina controla este proceso estimulando el transporte de glucosa principalmente hacia el musculo esquelético. Su vida media es de aproximadamente 5 minutos, lo que permite que sus efectos en el organismo estén finamente regulados (Wang y Chien, 1996). En el corazón, insulina controla de manera importante el metabolismo, regulando transporte de glucosa, glicolisis y síntesis de glicógeno (Brownsey y cols., 1997).

### **1.6. Señalización de insulina**

La unión de insulina con su receptor lleva a la auto-transfosforilación de sus subunidades  $\beta$  y a la activación de su dominio tirosina kinasa (Yip y Ottensmeyer, 2003). Una vez activado, el receptor fosforila a la proteína sustrato del receptor de

insulina (IRS), proteína andamio que activa a la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K). PI3K es una kinasa de fosfoinositoles que produce fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) a partir de PIP<sub>2</sub> (Backer y cols., 1992). Una vez que se ha acumulado PIP<sub>3</sub> en la membrana, éste atrae y activa proteínas con dominio de homología a pleckstrina como PDK1, una proteína kinasa que fosforila a Akt en su *loop* de activación (Alessi y cols., 1997; Deprez y cols., 2000). Akt es una serina-treonina kinasa clave en la señalización de insulina que participa en varios procesos fisiológicos, como el crecimiento (DeBosch y cols., 2006b; Dorn y Force, 2005) y captación de glucosa celular (Sakamoto y cols., 2006; Somwar y cols., 2001). Akt fosforila a varias proteínas blanco entre las que se encuentran mTOR (Harris y Lawrence, 2003), complejo proteico que regula principalmente procesos relacionados con hipertrofia y síntesis de proteínas, GSK3 $\beta$  (Cross y cols., 1995), que regula la transcripción génica y el metabolismo de la glucosa, y AS160, que está involucrado en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana, lo que finalmente lleva al ingreso de glucosa a las células (Sano y cols., 2003) (Figura 2).

Interesantemente, IGF-1 e insulina comparten gran parte de su señal transduccional, sin embargo sus efectos en el corazón presentan importantes diferencias. La diferencia clave entre ambas hormonas se encuentra en el tipo de Akt que ellas activan. La familia Akt tiene tres integrantes, mientras que IGF-1 ejerce su acción mediante la activación de Akt1, insulina lo hace principalmente a través de Akt2 (DeBosch y cols., 2006a; DeBosch y cols., 2006b). Estudios previos muestran que Akt1 es necesaria para la señalización del IGF-1 y para el desarrollo de hipertrofia inducida por ejercicio (DeBosch y cols., 2006b), un proceso en el cual IGF-1 es clave (Kim y cols., 2008). Por otra parte, Akt2, pero no Akt1, es necesaria para la captación de glucosa inducida por insulina, mientras que el corazón carente de Akt2 desarrolla hipertrofia de manera normal (DeBosch y cols., 2006a). Estas evidencias sugieren que aunque insulina activa vías transduccionales prohipertróficas, esta hormona no está involucrada en el desarrollo de este proceso celular.



### **1.7. Ca<sup>2+</sup> en la señalización de insulina**

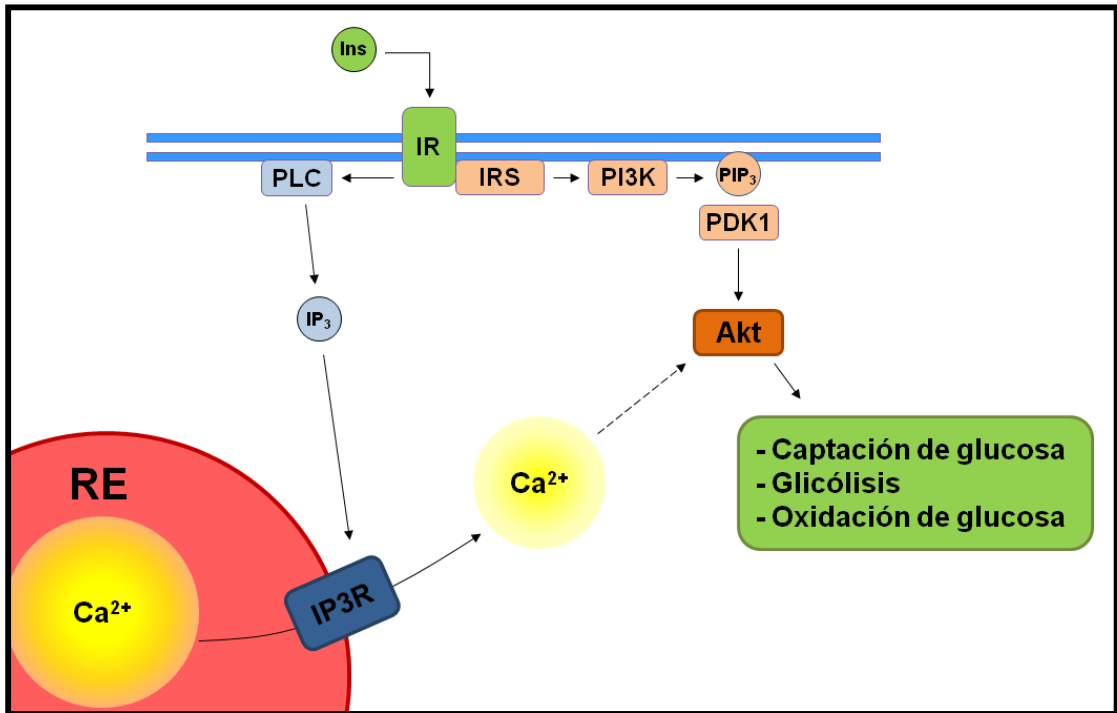
Además de la vía de señalización descrita anteriormente, existen varias evidencias que apuntan al Ca<sup>2+</sup> como un importante actor en la regulación de la captación de glucosa mediada por insulina. Estudios realizados en fibras de musculo esquelético aisladas indican que la ausencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio extracelular o el bloqueo de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la célula reducen significativamente la captación de glucosa inducida por insulina, mientras que la inducción de un influjo de Ca<sup>2+</sup> la favorece (Lanner y cols., 2006). También se han observado resultados similares en adipocitos, donde el uso de quelantes intracelulares de Ca<sup>2+</sup> resulta en la inhibición de la captación de glucosa, translocación de GLUT4 y fosforilación de Akt inducidos por insulina (Whitehead y cols., 2001). Un trabajo reciente de nuestro grupo en cardiomiocitos de rata neonata, mostró que insulina induce la salida de Ca<sup>2+</sup> desde el RE, el principal reservorio intracelular de este ión, a través de los canales receptor de ryanodina (RyR) e IP<sub>3</sub>R, siendo la liberación a través de este ultimo un evento clave en la señalización de esta hormona, regulando la captación de glucosa, translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y fosforilación de Akt inducidos por insulina (Contreras-Ferrat y cols., 2010). En resumen, el Ca<sup>2+</sup> es un elemento importante en la señalización de insulina que regula la captación de glucosa a través del control de eventos tempranos en la señalización, como la fosforilación de Akt, y eventos más tardíos, como la translocación de los transportadores GLUT4 a la membrana plasmática (Lanner y cols., 2008) (Figura 2).

### **1.8. Efectos de insulina en el corazón**

Insulina cumple un importante rol en la regulación del metabolismo energético del corazón, entre los que se destaca el transporte de glucosa, la regulación del metabolismo del glicógeno, la glicolisis y la oxidación de piruvato y ácidos grasos (Brownsey y cols., 1997).

La entrada de glucosa a la célula es un paso clave en su uso como sustrato metabólico. Insulina favorece este proceso a través de la translocación de transportadores de glucosa desde reservorios intracelulares hacia la membrana plasmática (Davey y cols., 2007; Slot y cols., 1991). El corazón posee principalmente dos isoformas del transportador de glucosa. El primero, el transportador GLUT4, es el más abundante, tiene una localización mayoritariamente intracelular y es el que da cuenta en mayor medida del incremento en la captación de glucosa frente a insulina y otros estímulos; mientras que el segundo, GLUT1, se encuentra ubicado principalmente en la membrana plasmática y está encargado de la entrada de glucosa en condiciones basales (Kraegen y cols., 1993).

La glucosa incorporada a la célula puede ser almacenada en forma de glicógeno o ser metabolizada para obtener energía a través de la glicólisis, siendo ambos procesos estimulados por insulina. Esta también favorece la formación de glicógeno mediante la desfosforilación de la glicógeno sintasa principalmente a través de la inhibición de la GSK3 $\beta$  por un mecanismo dependiente de PDK1 y Akt (Mora y cols., 2005). Por otro lado, insulina también aumenta la glicólisis principalmente a través de la fosforilación y activación de la 6-fosfofructo-2-kinasa (PFK-2) por un mecanismo dependiente de Akt (Mouton y cols., 2010). PFK-2 fosforila la fructosa-6-fosfato formando fructosa-2,6-bisfosfato, un potente activador de la fosfofructoquinasa-1, la enzima marcapaso de la glicólisis.



**Figura 2: Señalización de insulina y captación de glucosa.** Por un lado, la unión de insulina a su receptor lleva a la activación de una vía clásica iniciada por la asociación del receptor a IRS, una proteína andamio que se une a PI3K, que forma PIP<sub>3</sub> en la membrana plasmática. La acumulación de PIP<sub>3</sub> en la membrana a trae a PDK1, una quinasa que fosforila y activa a Akt, una proteína quinasa fundamental en la señalización de insulina. Por otro lado, insulina también activa a la PLC, que forma IP<sub>3</sub>. Por su parte, IP<sub>3</sub> activa al IP<sub>3</sub>R que libera Ca<sup>2+</sup> desde el RE al citoplasma, siendo este Ca<sup>2+</sup> clave para la activación de Akt. Finalmente, Akt media los efectos metabólicos inducidos por insulina, incluyendo captación de glucosa, glicólisis y oxidación de glucosa.

Hace ya varias décadas se sabe que insulina regula la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH), la enzima encargada de convertir el piruvato en acetil-CoA, el primer paso del ciclo de Krebs (Seals y Jarett, 1980). La actividad de la PDH es regulada negativamente por fosforilación, siendo esta reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa kinasa; mientras que su activación se lleva a cabo por la desfosforilación catalizada por la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (Wieland y Siess, 1970). La piruvato deshidrogenasa kinasa cardiaca puede ser regulada por la presencia de intermediarios metabólicos activantes como el ATP, mientras que el ADP y el piruvato inhiben su actividad (Cooper y cols., 1974). Por otro lado, la actividad de la piruvato deshidrogenasa fosfatasa depende principalmente de la presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (Denton y cols., 1972). Sin embargo, los intermediarios encargados de regular la actividad de la piruvato deshidrogenasa kinasa en respuesta a insulina se desconocen.

### **1.9. Alteración de la respuesta a insulina en el cardiomiocito hipertrófico**

A pesar de que el consumo basal de glucosa se encuentra incrementado en el corazón hipertrófico, la captación de glucosa al estimular con insulina es significativamente menor (Friehs y cols., 1999; Paternostro y cols., 1999). Bajo estas mismas condiciones, se ha encontrado una menor actividad de PI3K (Friehs y cols., 2001) y un menor contenido del mRNA del GLUT4 (Paternostro y cols., 1995). También se ha visto que el incremento en la disponibilidad de glucosa, aumenta la capacidad de trabajo y protege contra la insuficiencia cardiaca en corazones hipertróficos (Liao y cols., 2002). Adicionalmente, la alteración en la señalización de insulina se ha asociado con un mayor daño isquémico en corazones hipertróficos (Friehs y cols., 2005). Por otro lado, el knockout de GLUT4 en el corazón es suficiente para generar hipertrofia (Kaczmarczyk y cols., 2003) y fibrosis cardiaca acompañada de disfunción contráctil y alteración en el flujo del  $Ca^{2+}$  (Dominighetti y cols., 2009), mientras que la sobreexpresión de GLUT1 en el corazón previene la disfunción contráctil generada por la hipertrofia (Liao y cols., 2002). En consecuencia, el desarrollo de resistencia a insulina y alteración en el metabolismo de la glucosa,

pueden contribuir tanto en las alteraciones funcionales como en el origen mismo de la hipertrofia cardiaca.

### **1.10. Señalización de $\text{Ca}^{2+}$ y mitocondria**

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero ampliamente utilizado y de gran versatilidad a nivel celular, participa en diversos procesos celulares incluyendo excitotoxicidad, contracción, metabolismo, transcripción génica, proliferación y apoptosis. Es crucial para la función cardiaca, pues cumple un rol fundamental en la contracción (Bers, 2002) y, como se menciono anteriormente, es uno de los principales segundos mensajeros involucrados en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca. Debido a su gran importancia, y para su correcto funcionamiento como segundo mensajero, los niveles citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  son estrictamente controlados. Para este fin se dispone de una amplia maquinaria molecular compuesta por diversos canales, bombas y transportadores que se encargan de trasladar el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma hacia reservorios intracelulares, principalmente el RE y la mitocondria, y el espacio extracelular (Berridge y cols., 2003). Además, el RE también cumple una importante función en la generación y amplificación de señales de este mismo ion (Berridge, 2002). Bajo determinados estímulos, el RE libera rápidamente  $\text{Ca}^{2+}$  desde su lumen hacia el citoplasma, principalmente a través del RyR e  $\text{IP}_3\text{R}$ . Por ejemplo, un proceso de gran importancia para la función cardiaca y en el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un rol clave es la contracción. Para que la contracción ocurra, primero un potencial de acción despolariza la membrana plasmática generando la apertura de los canales de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L. Esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  permite la apertura de los RyR ubicados en la cercanía de los canales tipo L, generando una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE. Finalmente, el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde el RE al citoplasma activa a los filamentos contráctiles, permitiendo la contracción del cardiomiocito. Luego este  $\text{Ca}^{2+}$  es rápidamente extraído del citoplasma para que ocurra la siguiente contracción, otro proceso donde el RE cumple una importante función (Bers, 2002). La gran capacidad de captar  $\text{Ca}^{2+}$  del RE se debe principalmente a la actividad de la bomba ATPasa SERCA, que se encuentra ubicada en su membrana y bombea  $\text{Ca}^{2+}$  permanentemente hacia el lumen. Por otro lado, la mitocondria también contribuye al

control del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático gracias a su capacidad de captación, favorecida principalmente por su potencial de membrana negativo y su cercanía al RE. De esta forma, una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE genera rápidamente un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondriales (Csordás y cols., 2001; Rizzuto y cols., 1992).

La capacidad de captar  $\text{Ca}^{2+}$ , junto con una estratégica ubicación subcelular, les da a las mitocondrias una importante función en la regulación espacial y temporal de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. Por ejemplo, en células pancreáticas acinares se han identificado poblaciones mitocondriales con características espaciales y funcionales particulares. La población ubicada en la zona perigranular de estas células forma una barrera que impide el traspaso de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  desde esta zona al resto del citoplasma, mientras que otro grupo ubicado en la zona perinuclear, aísla al núcleo de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Park y cols., 2001). Por otro lado, también se ha descrito que en células musculares esqueléticas las mitocondrias regulan tanto la amplitud como la duración de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, además de la velocidad a la que estas señales se propagan de un núcleo a otro (Eisner y cols., 2010).

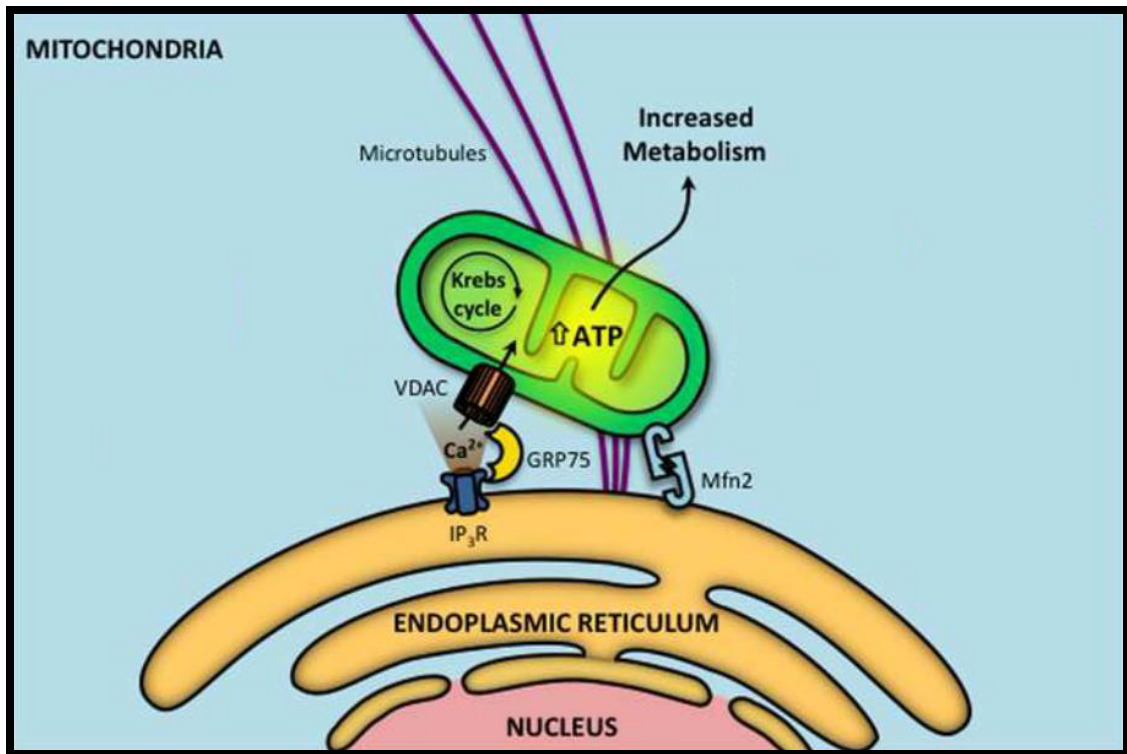
### **1.11. Regulación de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ a la mitocondria**

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la matriz mitocondrial se realiza a través del uniporter de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (mCU), un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicado en la membrana interna de la mitocondria (Baughman y cols., 2011; De Stefani y cols., 2011). Este canal posee una baja afinidad por el ión, lo que hace imposible la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  con las concentraciones normalmente alcanzadas en el citoplasma. Debido a esto, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce en microdominios de alta concentración, ubicados en la cercanía de los sitios de liberación en el espacio ubicado entre el RE y la mitocondria, donde se alcanzan concentraciones varias veces mayores a los alcanzados en el resto del citoplasma (Csordás y cols., 2010; Giacomello y cols., 2010). La distancia entre ambos organelos, medible mediante microscopía electrónica, es un factor clave en la regulación del traspaso de diversas moléculas, incluyendo  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos, a la mitocondria (Sutendra y cols., 2011). Se sabe que existen puentes proteicos que

estructuran la estrecha cercanía entre ambos organelos, pero, la identidad de tales proteínas y los mecanismos que las regulan no se conocen totalmente (Csordás y cols., 2006). Sin embargo, se poseen antecedentes de algunas proteínas que participan en la formación de este contacto. Se sabe que mitofusina 2 (Mfn2), una proteína ubicada tanto en la superficie de la mitocondria como del RE, es capaz de formar dímeros que une a ambos organelos favoreciendo el traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ellos (de Brito y Scorrano, 2008). Además, existe un acoplamiento tanto estructural como funcional entre el  $\text{IP}_3\text{R}$ , ubicado en la membrana del RE, y VDAC, ubicado en la membrana externa de la mitocondria. Estos canales se encontrarían formando un complejo con la chaperona GRP75, cuya presencia es necesaria para el correcto traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ambos organelos (Szabadkai y cols., 2006) (Figura 3).

### **1.12. $\text{Ca}^{2+}$ como regulador del metabolismo mitocondrial**

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria no responde exclusivamente a una regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Este ión tiene también importantes funciones al interior de la mitocondria. Una de sus principales funciones es regular el metabolismo mitocondrial a través del control de la actividad de la PDH y otras tres enzimas del ciclo de Krebs, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y la oxoglutarato deshidrogenasa, llevando finalmente a un incremento de la síntesis de ATP (Denton, 2009). De esta forma, ante un incremento en la demanda energética, el metabolismo de la célula puede ser regulado rápidamente antes de que se genere una caída importante en los niveles de ATP (Griffiths y Rutter, 2009). De hecho, el bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria reduce significativamente el metabolismo mitocondrial y la fosforilación oxidativa, comprometiendo energéticamente a la célula (Cárdenas y cols., 2010).



**Figura 3: Acoplamiento RE-mitocondria y traspaso de  $Ca^{2+}$ .** La unión entre RE mitocondria es clave para un eficiente traspaso de  $Ca^{2+}$  entre ambos organelos. Mfn2, ubicado en la superficie tanto del RE como de la mitocondria, forma dímeros que favorecen la unión entre estos organelos. Además,  $IP_3R$  y VDAC también forman un puente proteico entre RE y mitocondria al formar un complejo con la chaperona GRP75. Es el mismo  $IP_3R$  el principal canal de  $Ca^{2+}$  encargado de la liberación de este ion desde el RE para luego ser captado por la mitocondria. Finalmente, el  $Ca^{2+}$  dentro de la mitocondria favorece el metabolismo mitocondrial y la síntesis de ATP. Imagen modificada de (Bravo y cols., 2012).



Debido a la relación que se establece entre la regulación de la función metabólica mitocondrial y el traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE a la mitocondria y que en estados como la hipertrofia cardiaca se observan deficiencias tanto a nivel del metabolismo mitocondrial como en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , surgen las siguientes interrogantes:

- ¿Inducirá insulina, junto con la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE al citoplasma, una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria?
- ¿Qué rol cumple la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en la respuesta metabólica regulada por insulina?
- ¿Qué efectos tiene la hipertrofia sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por insulina?

## **2. HIPÓTESIS**

La hipertrofia del cardiomiocito atenúa la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y/o mitocondrial, reduciendo la activación de Akt y el consumo de oxígeno inducidos por insulina.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por insulina y su papel en la activación de Akt y en la captación de glucosa en cardiomiocitos hipertróficos de rata neonata.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar si insulina incrementa los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.
- Investigar si la fosforilación de Akt y el consumo de oxígeno inducidos por insulina están disminuidos en los cardiomiocitos hipertróficos.
- Estudiar si los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y mitocondrial inducidos por insulina se encuentran reducidos en los cardiomiocitos hipertróficos.
- Determinar si el aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es necesario para el incremento en la fosforilación de Akt y el consumo de oxígeno inducidos por insulina.

## 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 X100, 5-bromo-2'-deoxiuridina, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP) y anticuerpo anti  $\beta$ -actina (A5441). En Cell Signalling (Danvers, MA, EEUU) se adquirieron los anticuerpos anti Akt (9272) y anti p-Akt (Ser473, cat. 9271). De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron: colagenasa tipo II, suero fetal bovino (FBS) y suero de ternera (FCS). Mito-Tracker Green-FM (M7514), ER-Tracker Red (E34250), Rhod-FF (R23983) y FLUO3-AM (F1242) se compraron en Molecular Probes - Invitrogen (Eugene, OR, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot ECL se adquirió en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a no ser que se especifique lo contrario. El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU).

### 5.2. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata

Los cardiomiocitos de rata neonata se obtuvieron a partir de ratas Sprague Dawley de 2 a 3 días. Para este fin, los corazones se extrajeron y lavaron en medio Hank's y, posteriormente, homogenizados y digeridos con colagenasa tipo II (0,02 g / 100 mL) y pancreatina (0,06 g/100 mL). Una vez finalizada la digestión, las células se pre-plaquearon durante 2 h en medio DMEM:M199 (4:1) que contenía 10% FBS. Finalmente, las células se centrifugaron a 1.000 rpm por 5 min y resuspendieron en medio DMEM:M199 (4:1) que contenía 5% FBS y 10% FCS. La concentración de

cardiomiocitos se determinó por conteo en microscopio óptico, tiñéndolas con azul de Tripan. Las células se sembraron en medio DMEM:M199 (4:1) que contenía 5% FBS y 10% FCS según las necesidades de cada experimento en presencia de 5-bromo-2-deoxiuridina, en placas cubiertas de gelatina (2% p/v) y mantenidas a 37°C en una atmosfera controlada de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio DMEM:M199 (4:1) en presencia de 5-bromo-2-deoxiuridina. Después de 24 h, las células se estimularon según la descripción de cada experimento (Galvez y cols., 2003).

### **5.3. Modelo experimental**

Como modelo de hipertrofia patológica los cardiomiocitos de rata neonata se estimularon con NA por 24 ó 48 h según el experimento, a una concentración de 10 µM y mantenidos en medio DMEM/M199 (4:1).

Se utilizó insulina 100 nM como estímulo durante 15 min ó 3 h según el experimento. Los inhibidores se agregaron 30 min antes del estímulo.

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

Se prepararon extractos de proteínas totales para:

- Evaluar la participación de las proteínas Akt y ERK en la respuesta a insulina mediante Wester blot.
- Medir los niveles de β-MHC como marcador de hipertrofia mediante Western blot.

Los cardiomiocitos sembrados en placas de 35 mm y cubiertas con gelatina (1,5 x 10<sup>6</sup> células por placa) e incubados en medio de mantención se estimularon con NA. En los casos que corresponda, los cardiomiocitos se trataron con insulina 100 nM por 15 min. Una vez finalizado el período de estimulación, los cardiomiocitos se lisaron en 100 µL de amortiguador de lisis NP40 (Tris-HCl 100 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; NP40 0,5%; NaF 20 mM; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Luego, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C,

determinándose su concentración por el método de Bradford. Las fracciones solubles se mezclaron con 0,33 volúmenes de amortiguador desnaturalante 4x (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; glicerol 32% v/v; 2 mercaptoetanol 20%; SDS 9,2%; azul de bromofenol 0,02%) y se incubaron por 5 min a 95°C para el posterior análisis por Western blot.

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

La separación de proteínas según su masa molecular se realizó en geles en gradiente discontinuo de poliacrilamida 5-12% p/v con SDS. Para la detección de Akt, p-Akt,  $\beta$ -MHC y  $\beta$ -actina se cargaron aproximadamente 30  $\mu$ g de proteína por muestra. El gel concentrador se preparó al 3%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis.

### **5.6. Electrotransferencia de proteínas**

Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m (BioRad, Hercules, CA, EEUU) a un amperaje constante de 400 mA durante 1,5 h en tampón de transferencia.

### **5.7. Western blot**

Posteriormente, las membranas se bloquearon con TBS-Tween (Tris pH 7,4 25 mM; NaCl 138 mM; KCl 2,7 mM; Tween 20 0,1% v/v) con leche descremada al 5% p/v por 1 h y se incubaron con el anticuerpo primario (anti p-Akt 1:1.000; anti Akt 1:1.000,  $\beta$ -actina 1:10.000,  $\beta$ -MHC 1:1.000) en TBS-Tween con leche descremada 5% p/v a 4°C durante toda la noche. Una vez finalizada la incubación con anticuerpo primario, las membranas se lavaron en TBS-Tween por 30 min y luego incubadas con anticuerpo secundario anti-IgG (1:5000) de conejo o raton, según corresponda, conjugado a peroxidasa de rabanito en TBS-Tween con leche descremada 5% p/v durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron con TBS-Tween durante 30 min, incubadas por 1 min con una solución quimioluminiscente para Western Blot ECL y expuestas a una película fotográfica Kodak-Biomax. Las películas

se digitalizaron y analizaron con la ayuda del programa UN-SCAN-IT. Luego de la detección de proteínas, las membranas se incubaron en una solución de Rojo Ponceau (rojo Ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) por 1 h para desprender los anticuerpos.

### **5.8. Determinación de área, perímetro y sarcomerización del cardiomiocito**

Esta técnica se utilizó se utilizó para:

- Detectar el desarrollo de hipertrofia de los cardiomiocitos.

Los cardiomiocitos sembrados en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos de 18 mm cubiertos con gelatina ( $0,25 \times 10^6$  células por pocillo) e incubados en medio de mantención, se estimularon con NA. Luego de lavarlos con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 min y permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1%. Posteriormente, se incubaron con faloidina-rodamina (1:500) y Hoescht (1:1000), para visualizar f-actina y núcleos respectivamente, por 1 h y se lavaron nuevamente con PBS. Finalmente, los portaobjetos se montaron utilizando DAKO como medio de montaje. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de epifluorescencia invertido y se analizaron con el software ImageJ.

### **5.9. Medición de los niveles intracelulares de $Ca^{2+}$**

Los cardiomiocitos sembrados en placas de 35 mm sobre cubreobjetos de 25 mm cubiertos con gelatina ( $0,5 \times 10^6$  células por placa) e incubados en medio de mantención, se estimularon con NA. Luego, ellos se lavaron y preincubaron por 30 min con las sondas fluorescentes FLUO3-AM (5,4  $\mu$ M) o RhodFF (5,4  $\mu$ M), para medir  $Ca^{2+}$  citoplasmático y mitocondrial, respectivamente, en medio Krebs (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM HEPES, 1 g/mL glucosa). Posteriormente, los cardiomiocitos se lavaron y montaron en un microscopio confocal invertido (Carl Zeiss Axiovert 135 M LSM Microsystems). En los casos correspondientes, las células se preincubaron con los inhibidores xestospongina C 100  $\mu$ M o rojo rutenio 10  $\mu$ M por 30 min antes de iniciar la medición. Las imágenes fluorescentes se obtuvieron cada

0.985 seg. En cada medición, las células se dejaron sin estimular durante los primeros 100 seg para determinar los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Después, se les agregó un pulso de insulina (100 nM) o histamina (100 mM) para luego capturar imágenes durante 250 seg. Finalmente, se agregó KCl 50 mM o CCCP 50  $\mu\text{M}$  como control positivo para el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y mitocondrial, respectivamente. Para cada secuencia de imágenes obtenida, se determinaron los niveles de fluorescencia en regiones de interés (ROI) de células individuales. Los valores se expresaron como  $\Delta F/\text{Fo}$ , donde  $\Delta F$  corresponde a  $F-\text{Fo}$ , y  $\text{Fo}$  a la fluorescencia basal, respectivamente (Contreras-Ferrat y cols., 2010). Para el análisis de las imágenes se utilizó el software ImageJ.

#### **5.10. Estudio de la colocación mitocondria-RE**

Los cardiomiocitos sembrados en placas de 35 mm sobre cubreobjetos de 25 mm cubiertos con gelatina ( $0,5 \times 10^6$  células por placa) e incubados en medio de mantención se estimularon con NA por 24 h. Luego, ellos se lavaron y preincubaron simultáneamente con las sondas Mito-Tracker Green (400 nM) y ER-Tracker Red (1  $\mu\text{M}$ ), para teñir mitocondrias y RE, respectivamente, por 30 min en medio Krebs. Posteriormente, las células se lavaron y montaron en un microscopio confocal invertido (Carl Zeiss Axiovert 135 M LSM Microsystems). Para la cuantificación digital de la colocación entre RE y mitocondria se calcularon los coeficientes de Manders entre ambas señales, utilizando el programa ImageJ. Para este objetivo, las imágenes obtenidas se deconvolucionaron utilizando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (Point Spread Function) correspondiente para cada condición de lente objetivo y fluorescencia utilizada y se les restó el ruido de fondo.

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

Los cardiomiocitos sembrados en placas de 60 mm cubiertas con gelatina ( $3 \times 10^6$  células por placa) e incubados en medio de mantención y previamente estimulados, se lavaron con PBS y soltaron utilizando una solución tripsina-EDTA 1x, disuelta en PBS durante 5 min a  $37^\circ\text{C}$ . Esta reacción se detuvo con FBS 1:10. Posteriormente, las

células se centrifugaron por 5 min a 1.600 rpm, eliminándose el sobrenadante y resuspendiendo la pella en 200  $\mu$ L de PBS y luego traspasadas a una cámara con un volumen final de 600  $\mu$ L acoplada a un sistema de electrodos. La velocidad del consumo de oxígeno se registró en un electrodo de Clark 5331 (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EEUU), acoplado a un sistema de registro digital, mediante la utilización del programa WinDaq Data Acquisition Software (Akron, OH, EEUU) a 25°C. Una vez extraídas las pendientes de las curvas obtenidas para cada condición, los resultados se expresaron como promedios de las mediciones normalizadas con respecto a las células control o sin tratamiento. Adicionalmente como un control interno, antes de que las células consumieran el 100% del oxígeno presente en la cámara, se evaluó la velocidad de respiración desacoplada (Uncoupled Respiration Ratio, UCR), la cual corresponde al inverso de la denominada tasa de control respiratorio y que da cuenta de la capacidad total de la cadena transportadora de electrones en relación a la respiración basal parcialmente acoplada. Para ello, una vez que las células habían consumido aproximadamente el 75% del oxígeno de la cámara, se les agregó CCCP a una concentración final de 2 nM (Brand y Nicholls, 2011).

#### **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. Para determinar la significancia estadística de los datos, estos fueron analizados por t-Student, cuando se compararon dos grupos, o por ANOVA y la prueba Tuckey, cuando se compararon tres o más grupos. La colocalización RE-mitocondria en las diferentes regiones subcelulares se analizo con ANOVA de dos vías. Se consideró como significativo un  $p < 0,05$ .



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Insulina incrementa los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial

Antecedentes previos de la literatura muestran que insulina aumenta los niveles citoplasmáticos del  $\text{Ca}^{2+}$  mediante su liberación desde el RE a través del  $\text{IP}_3\text{R}$  (Contreras-Ferrat y cols., 2010). También se sabe que la mitocondria actúa como un amortiguador del  $\text{Ca}^{2+}$ , captándolo luego de su liberación desde este reservorio intracelular (Rizzuto y cols., 1992). Sin embargo, se desconoce si esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por insulina posee, además del componente citoplasmático, un componente mitocondrial. Para probar esta posibilidad, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  se midieron directamente en este compartimento subcelular en células vivas por microscopia confocal, usando la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  con destinación mitocondrial Rhod-FF ( $K_d = 19 \mu\text{M}$ ). Para comprobar que Rhod-FF poseía una destinación específicamente mitocondrial, se realizó una cotinción con la sonda mitocondrial específica Mito-Tracker Green. El grado de colocalización entre ambas señales se midió calculando el coeficiente de Pearson ( $R = 0,915$ ), indicando un alto grado de colocalización entre ambas señales (Figura 4D).

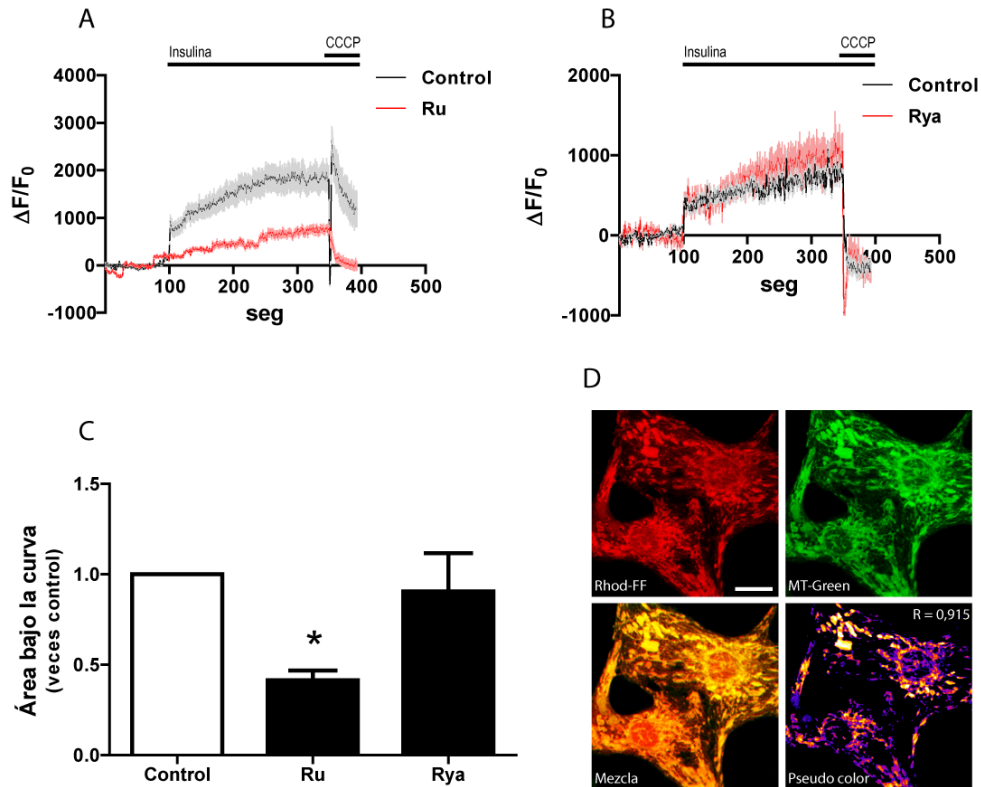
Para medir la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por insulina en tiempo real, primero se capturó la fluorescencia en condiciones basales, sin estimular. Luego, al haber transcurrido 100 seg, las células se estimularon con insulina 100 nM. El incremento en la fluorescencia indica el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial (Figura 4A, línea negra). Cuando transcurrieron 350 seg se agregó carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP) como control positivo. El CCCP es un protonóforo que disipa el potencial mitocondrial, generando una masiva salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria, por lo que se observa una brusca caída en la señal de fluorescencia. Para comprobar que la señal observada correspondía efectivamente a un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, se inhibió la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria con rojo rutenio, que bloquea el paso de

$\text{Ca}^{2+}$  a través del mCU. La cinética muestra que el incremento en la fluorescencia fue mucho menor en presencia de rojo rutenio (Figura 4A, línea roja). La cuantificación del área bajo la curva comprueba que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria fue mucho menor en presencia de rojo rutenio, indicando que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria fue efectivamente bloqueada y que la señal registrada corresponde al  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Figura 4C).

## **6.2. El ingreso de $\text{Ca}^{2+}$ a la mitocondria inducido por insulina depende del $\text{IP}_3\text{R}$**

Con el objetivo de caracterizar esta señal, se estudió qué canales de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían estar participando en el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inducido por insulina. Como se mencionó anteriormente, insulina induce una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma a través de los canales  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$ , aunque solo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del  $\text{IP}_3\text{R}$  es determinante en la captación de glucosa inducida por esta hormona (Contreras-Ferrat y cols., 2010). Ambos canales se han relacionado con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en diversos modelos (Rizzuto y cols., 1993; Csordas y cols., 2001), por lo que se evaluó su participación en este efecto de insulina.

Para estudiar la participación del  $\text{RyR}$  en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina, se midió la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en tiempo real mediante microscopia confocal, tal como se explicó previamente, pero inhibiendo la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE a través del  $\text{RyR}$  mediante la preincubación los cardiomiocitos con ryanodina a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . La cinética muestra que el incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en respuesta a insulina fue similar en presencia o ausencia de ryanodina (Figura 4B). Del mismo modo, el área bajo la curva de esta cinética comparada con el control no muestra diferencias significativas (Figura 4C). Estos resultados indican que el  $\text{RyR}$  no participa en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina en los cardiomiocitos.



**Figura 4: Insulina incrementa los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en el cardiomiocito de forma independiente del RyR.** A) Cinética de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en cardiomiocitos control (línea negra) o preincubados con rojo ruténio (Ru, 10  $\mu\text{M}$  por 30 min, línea roja). Se agregó insulina (100 nM) y CCCP (50  $\mu\text{M}$ , control positivo) a los 100 y 350 seg, respectivamente. B) Cinética de los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en cardiomiocitos control (línea negra) o preincubados con ryanodina (Rya, 50  $\mu\text{M}$  por 30 min, línea roja). Se agregó insulina (100 nM) y CCCP (50  $\mu\text{M}$ , control positivo) a los 100 y 350 seg, respectivamente. C) Áreas bajo la curva de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en condiciones control y tratados con rojo ruténio y ryanodina entre los 100 y 350 seg. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes, donde se registraron un mínimo de 5 células por campo. \* =  $p \leq 0,05$  vs Control. D) Imágenes confocales representativas de cardiomiocitos teñidos con la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial Rhod-FF (rojo, panel superior izquierdo), la sonda específica para mitocondria Mito-Tracker Green (verde, panel superior derecho), superposición de ambos canales (amarillo, panel inferior izquierdo) y pseudo color de la mezcla (panel inferior derecho). El valor de coeficiente de Pearson (R) se muestra parte superior de este último panel. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Para estudiar la participación del IP<sub>3</sub>R en el incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial inducido por insulina, se midieron los niveles de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial en tiempo real en cardiomiocitos previamente tratados con xestospongina C, que inhibe la salida de Ca<sup>2+</sup> desde el RE a través del IP<sub>3</sub>R, y U73, un inhibidor de la PLC que impide la síntesis de IP<sub>3</sub> y posterior activación del IP<sub>3</sub>R (Figura 5). La cinética muestra que el incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a insulina en presencia de xestospongina C (Figura 5A, línea roja) fue menor que la condición control (Figura 5A, línea negra). De forma similar, el incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial en respuesta a insulina fue menor al preincubar las células con U73 (Figura 5B, línea roja) comparado con la condición control (Figura 5B, línea negra). La cuantificación del área bajo la curva de las cinéticas de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial en presencia de xestospongina C y U73 muestra que, en ambos casos, la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la mitocondria fue significativamente menor que el control (Figura 5C), indicando que el IP<sub>3</sub>R tienen una participación clave en la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la mitocondria en respuesta a insulina.

### **6.3. Establecimiento del modelo hipertrófico inducido por NA**

Nuestro modelo de trabajo consistió en la inducción de hipertrofia del cardiomiocito mediante la estimulación por tiempos prolongados con NA. Para comprobar que los cardiomiocitos efectivamente están desarrollando un fenotipo hipertrófico, se midieron varios parámetros. La Figura 6A muestra imágenes representativas de cardiomiocitos tratados con NA (10 μM por 24 y 48 h) y teñidos con faloidina-rodamina, colorante que se une a los filamentos de actina, y Hoescht, que marca el núcleo. A la derecha de cada una de las imágenes se muestra el perfil de fluorescencia de una línea trazada sobre las estructuras sarcoméricas en cada una de las condiciones. Los cardiomiocitos tratados con NA por 24 y 48 h muestran un perfil de fluorescencia con intervalos regulares de intensidad, lo que evidencia el reordenamiento de la estructura sarcomérica en estas condiciones. En cambio, los cardiomiocitos de la condición control muestran un perfil de fluorescencia desordenado debido a que sus sarcómeros se encuentran menos estructurados. Luego se evaluó el tamaño celular, midiendo área y perímetro de los cardiomiocitos. Los resultados muestran un incremento dependiente del tiempo en ambos parámetros (Figura 6B-C). Para evaluar el grado de

sarcomerización se contó el número de cardiomiocitos que presentan este fenotipo a las 24 y 48 h de estimulación con NA. Los resultados muestran un evidente incremento en el porcentaje de cardiomiocitos que presentan este fenotipo a partir de las 24 h (Figura 6D). Finalmente, se midieron los niveles de la proteína  $\beta$ -MHC por Western blot, donde se observó un aumento tiempo dependiente y significativo a las 48 h de los niveles de esta proteína luego del tratamiento con NA (Figura 5E).

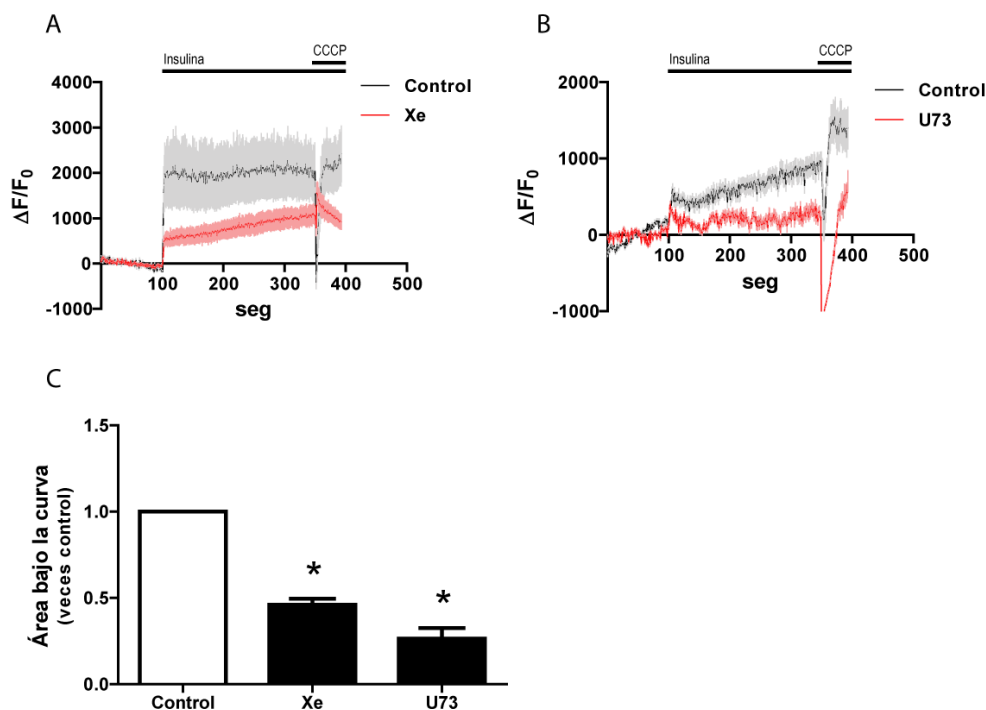
En conjunto, estos resultados muestran que a partir de las 24 h de tratamiento con NA ya es posible observar el establecimiento del fenotipo hipertrófico, por lo que se utilizó esta condición experimental en los experimentos subsiguientes.

#### **6.4. Desensibilización de la respuesta a insulina en el cardiomiocito hipertrófico**

Para demostrar que en este modelo de hipertrofia existe una reducción en la respuesta a insulina, se midieron dos parámetros del sistema transduccional de esta hormona. Primero se midió la fosforilación de Akt, un intermediario clave en la señalización transduccional de insulina, en cardiomiocitos controles e incubados por 24 h con NA. Se observó una reducción significativa en los niveles de Akt fosforilado en los cardiomiocitos hipertróficos en respuesta a insulina comparado con el control, indicando que bajo esta condición, la señalización a esta hormona se encuentra reducida (Figura 7A). Un segundo parámetro a medir fue el efecto de hipertrofia en la inducción del metabolismo mitocondrial en respuesta a insulina. Para esto se midió el consumo de oxígeno, un indicador directo del metabolismo mitocondrial, en respuesta a insulina tanto en células control como hipertróficas luego de un estímulo de insulina de 3 h, tiempo en el cual se alcanza el máximo efecto de esta hormona sobre el metabolismo mitocondrial. El resultado muestra que insulina incrementó en un 40% el consumo de oxígeno en cardiomiocitos en condiciones normales. Sin embargo, los cardiomiocitos hipertróficos muestran un incremento significativamente menor en el consumo de oxígeno en respuesta a insulina comparados con la condición control (Figura 7B). En resumen, estos resultados indican que la hipertrofia inducida por NA genera una desensibilización de la respuesta a insulina tanto a nivel de la transducción de la señal como en los efectos metabólicos finales en el cardiomiocito.

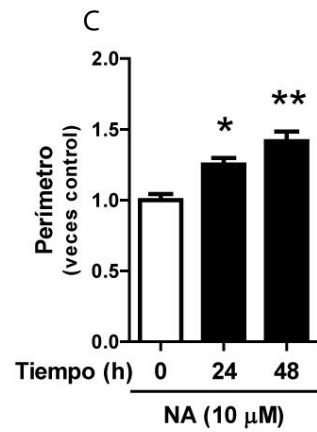
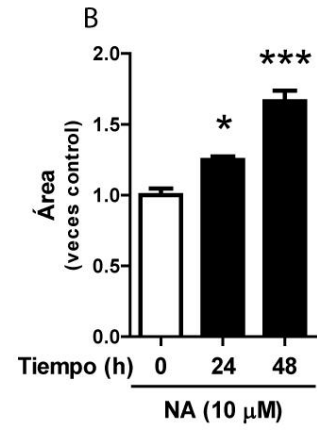
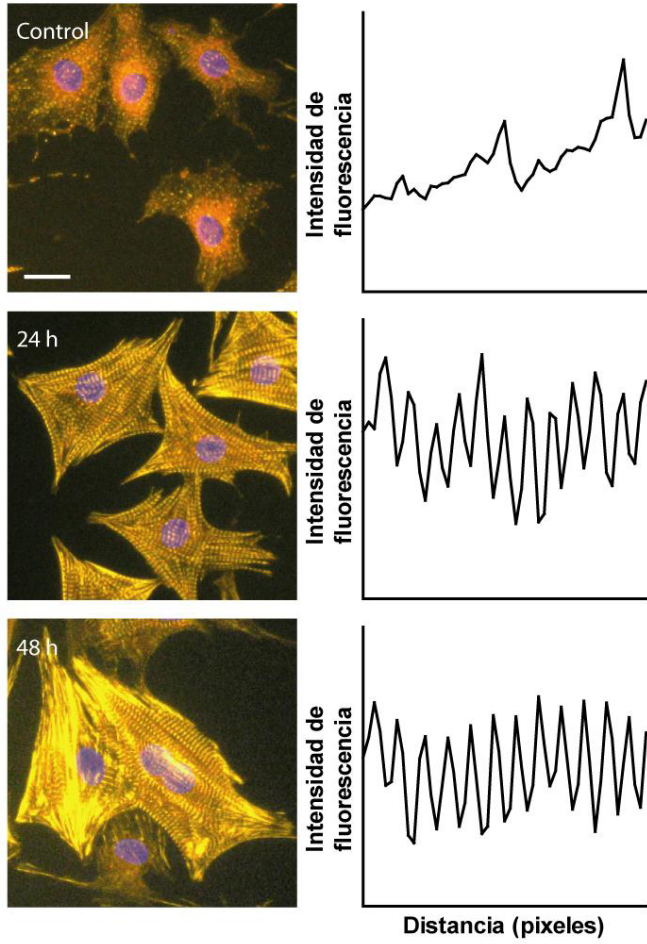
### **6.5. Incremento del $\text{Ca}^{2+}$ citoplasmático inducido por insulina no se altera en los cardiomiocitos hipertróficos**

En la literatura existen antecedentes que indican que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero fundamental en la señalización de insulina en cardiomiocitos, participando en los efectos finales como incorporación de glucosa, y en la activación de intermediarios como la fosforilación de Akt (Contreras-Ferrat y cols., 2010). Sin embargo, se desconoce si en estados patológicos que presentan una reducción en la respuesta a insulina, como hipertrofia, el incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático inducido por insulina se encuentra alterado. Para evaluar esta posibilidad, se comparó el incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático inducido por insulina en cardiomiocitos normales e hipertróficos. Para este fin, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático se midieron directamente en células vivas mediante microscopia confocal y la sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  de localización citoplasmática FLUO3 AM ( $K_d = 325$  nM). Para medir la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático inducida por insulina a tiempo real, primero se capturó la fluorescencia en condiciones basales, sin estimular. Luego de 100 seg, las células se estimularon con insulina 100 nM. El incremento en la fluorescencia indica el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Figura 8A). Cuando transcurrieron 350 seg se agregó KCl como control positivo, que despolariza la membrana permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. La cinética muestra que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a insulina en cardiomiocitos hipertróficos (Figura 8A, línea roja) no mostró cambios respecto a los cardiomiocitos controles (Figura 8A, línea negra). Del mismo modo, al comparar el área bajo la curva de la condición control y la hipertrófica, no se encontraron diferencias significativas, lo que sugiere que la menor respuesta a insulina observada en esta condición patológica no se debe a una reducción en el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático inducido por esta hormona (Figura 8B).

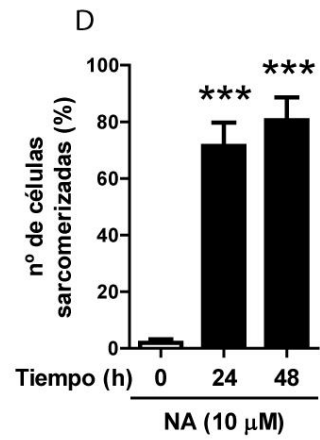
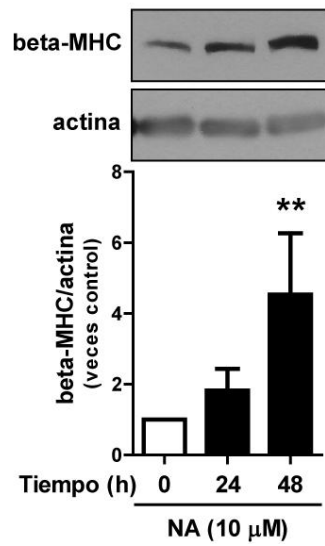


**Figura 5: Insulina incrementa los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial mediante una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del  $\text{IP}_3\text{R}$ .** A) Cinética de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en cardiomiocitos control (línea negra) o preincubados con xestospongina C (Xe, 100  $\mu\text{M}$  por 30 min, línea roja). Se agregó insulina (100 nM) y CCCP (50  $\mu\text{M}$ , control positivo) a los 100 y 350 seg, respectivamente. B) Cinética de los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en cardiomiocitos control (línea negra) o preincubados con U73 (U73, 10  $\mu\text{M}$  por 30 min, línea roja). Se agregó insulina (100 nM) y CCCP (50  $\mu\text{M}$ , control positivo) a los 100 y 350 seg, respectivamente. C) Áreas bajo la curva de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en condiciones control y tratados con xestospongina C y U73 entre los 100 y 350 seg. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, donde se registraron un mínimo de 5 células por campo. \* =  $p \leq 0,05$  vs Control y \*\* =  $p \leq 0,01$  vs Control.

A



E

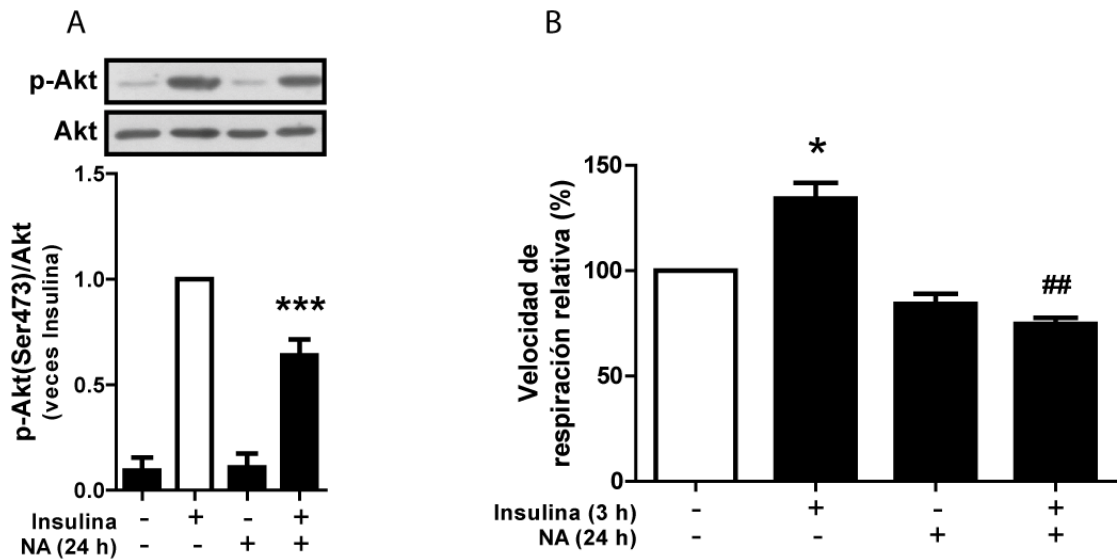




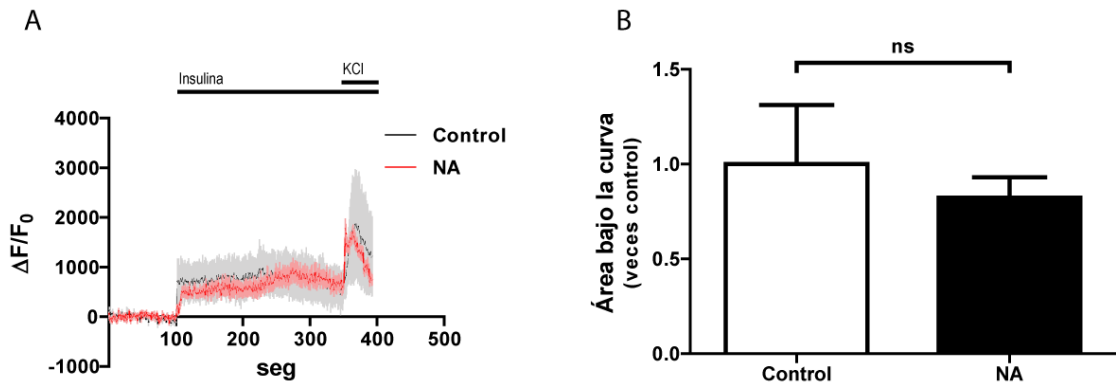
**Figura 6: Modelo de hipertrofia cardiaca inducido por NA.** A) Imágenes representativas de cardiomiocitos tratados por 24 y 48 h con NA 10  $\mu\text{M}$ . Las fibras de actina se tiñeron con faloidina-rodamina (naranja) y los núcleos con Hoescht (azul). A la derecha se muestra el perfil de fluorescencia de una línea trazada sobre las estructuras sarcoméricas en cada una de las condiciones. B) Cuantificación del área de cardiomiocitos estimulados por 24 y 48 h con NA 10  $\mu\text{M}$ . C) Cuantificación del perímetro de cardiomiocitos estimulados por 24 y 48 h con NA 10  $\mu\text{M}$ . D) Cuantificación del número de células sarcomerizadas de cardiomiocitos estimulados por 24 y 48 h con NA 10  $\mu\text{M}$ . Se contaron, al menos, 100 células por condición. E) Western Blot representativo de  $\beta$ -MHC y actina obtenidos a partir del extracto proteico de cardiomiocitos incubados por 24 y 48 h con NA 10  $\mu\text{M}$  (arriba). Densitometría de  $\beta$ -MHC normalizado por actina (abajo). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  y \*\*\* =  $p \leq 0,0001$  vs control. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

#### **6.6. El incremento del $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial inducido por insulina se atenúa en los cardiomiocitos hipertróficos**

Para evaluar si el incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inducido por insulina se encuentra alterado en los cardiomiocitos hipertróficos, se realizó la misma medición de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial a tiempo real descrita previamente, pero esta vez comparando cardiomiocitos normales con cardiomiocitos hipertróficos. En la cinética de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial se observa que tanto los cardiomiocitos normales como los hipertróficos responden a insulina. Sin embargo, la respuesta de los cardiomiocitos hipertróficos fue menor (Figura 9A). Al cuantificar esta respuesta y comparar el área bajo la curva, se observó que la respuesta fue aproximadamente la mitad y significativamente menor que el control (Figura 9B). Estos resultados indican que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina se encuentra reducida en los cardiomiocitos hipertróficos y sugieren que la menor respuesta a insulina observada podría ser explicada por un menor ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria.



**Figura 7: Desensibilización de la respuesta a insulina en cardiomiocitos hipertróficos.** A) Western blot de p-Akt y Akt (arriba) y densitometría de p-Akt relativizada por Akt (abajo) de extractos proteicos de cardiomiocitos hipertróficos (NA 10  $\mu$ M por 24 h) y luego estimulados con insulina (100 mM por 15 min). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 8 experimentos independientes. \*\*\* =  $p \leq 0,0001$  vs insulina. B) Velocidad de respiración relativa de cardiomiocitos hipertróficos (NA 10  $\mu$ M por 24 h) y luego estimulados con insulina 100 mM por 3 h medido por un electrodo de Clark. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*  $p \leq 0,01$  vs control y ##  $p \leq 0,0001$  vs insulina 3 h.



**Figura 8: Incremento del  $Ca^{2+}$  citoplasmático inducido por insulina no se altera en hipertrofia.** A) Cinética de los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplasmático en cardiomiocitos control (línea negra) e hipertróficos (NA 10  $\mu$ M 24 horas, línea roja). Se agregó insulina 100 nM a los 100 seg y KCl 50 mM como control positivo a los 350 seg. B) Áreas bajo la curva de las señales de  $Ca^{2+}$  citoplasmático de cardiomiocitos control e hipertróficos entre los 100 y 350 seg. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. ns = no significativo.

### 6.7. El incremento del $Ca^{2+}$ mitocondrial inducido por histamina también está atenuado en los cardiomiocitos hipertróficos

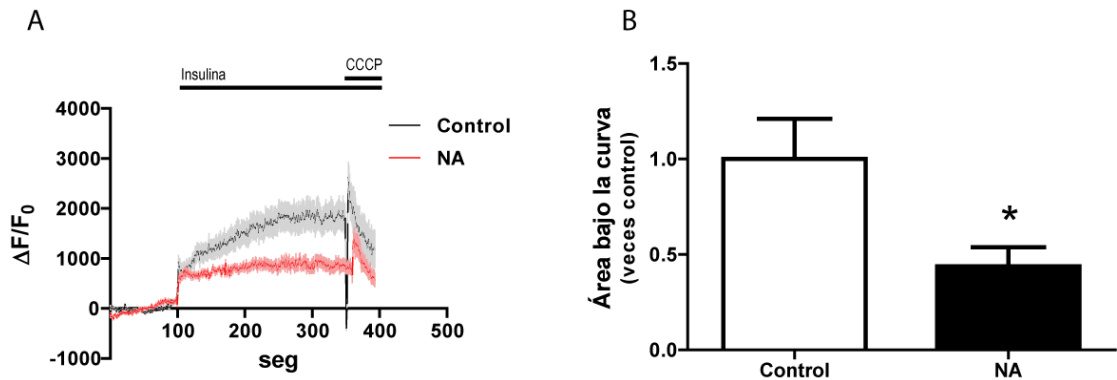
Para demostrar que es el traspaso de  $Ca^{2+}$  desde el RE a la mitocondria el que se encuentra reducido en los cardiomiocitos hipertróficos, se midió la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria usando histamina, un estímulo ampliamente usado en la literatura para inducir la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el RE a la mitocondria que actúa mediante la liberación de  $Ca^{2+}$  dependiente de  $IP_3/IP_3R$  (Rizzuto y cols., 1992). Las cinéticas de  $Ca^{2+}$  mitocondrial utilizando histamina como estímulo muestran que la respuesta de los cardiomiocitos hipertróficos fue menor que las observadas en los cardiomiocitos controles (Figura 10A). La cuantificación de las áreas bajo la curva mostró que la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria en cardiomiocitos hipertróficos es aproximadamente la mitad y significativamente menor a la observada en cardiomiocitos control en respuesta histamina (Figura 10B). Este resultado sugiere que en los cardiomiocitos hipertróficos está bloqueado de algún modo el traspaso de  $Ca^{2+}$  desde el RE a la mitocondria a

través del IP<sub>3</sub>R y que este bloqueo no se observa sólo en respuesta a insulina sino también frente a otros estímulos como histamina.

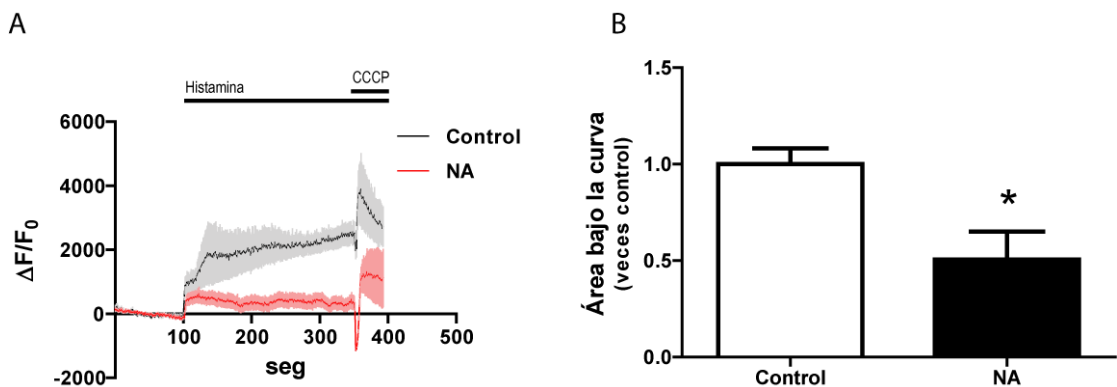
### **6.8. Los contactos RE-mitocondria están reducidos en los cardiomiocitos hipertróficos**

El contacto entre RE y mitocondria es un proceso altamente regulado y la distancia entre ambos es un factor clave en la eficiencia del traspaso de Ca<sup>2+</sup> (Rizzuto y cols., 1998). Uno de los mecanismos que podrían explicar el menor traspaso de Ca<sup>2+</sup> desde el RE a la mitocondria en cardiomiocitos hipertróficos es un mayor distanciamiento entre ambos organelos. Para evaluar esta posibilidad, se realizó un estudio de colocalización mediante microscopía confocal. Para este fin, primero se tiñeron ambos organelos con dos sondas organelo-específicas (Mito-Tracker Green para mitocondrias y ER-Tracker Red para RE) de manera simultánea. Luego se obtuvieron dos imágenes de la misma célula, una para el canal rojo, donde se ve al RE, y otra para el canal verde, donde se observan las mitocondrias (Figura 11A). Finalmente se evaluó el grado de colocalización entre ellos. Si el grado de colocalización entre ambos organelos es mayor, entonces están formando un contacto más estrecho y, por lo tanto, el traspaso de Ca<sup>2+</sup> será más eficiente. Por otro lado, si el grado de colocalización entre ambos organelos decrece, entonces estarán más distanciados y el traspaso de Ca<sup>2+</sup> entre ambos será menor.

Para medir el grado de colocalización entre RE y mitocondria se calculó el coeficiente de Manders, que entrega dos valores que permiten evaluar la colocalización de ambos canales, uno que indica la proporción de señal roja se encuentra al mismo tiempo sobre la señal verde, es decir, RE sobre mitocondria, y otro que muestra la proporción de señal verde que se encuentra al mismo tiempo sobre la señal roja, es decir, mitocondria sobre RE. Aparentemente estos dos coeficientes entregan la misma información, sin embargo, no necesariamente tienen el mismo valor. El coeficiente de Manders siempre tiene un valor entre 0, que significa que el canal analizado nunca se encuentran al mismo tiempo en el mismo lugar que el otro; ó 1, que significa que la totalidad del canal analizado se encuentra al mismo tiempo sobre el otro.



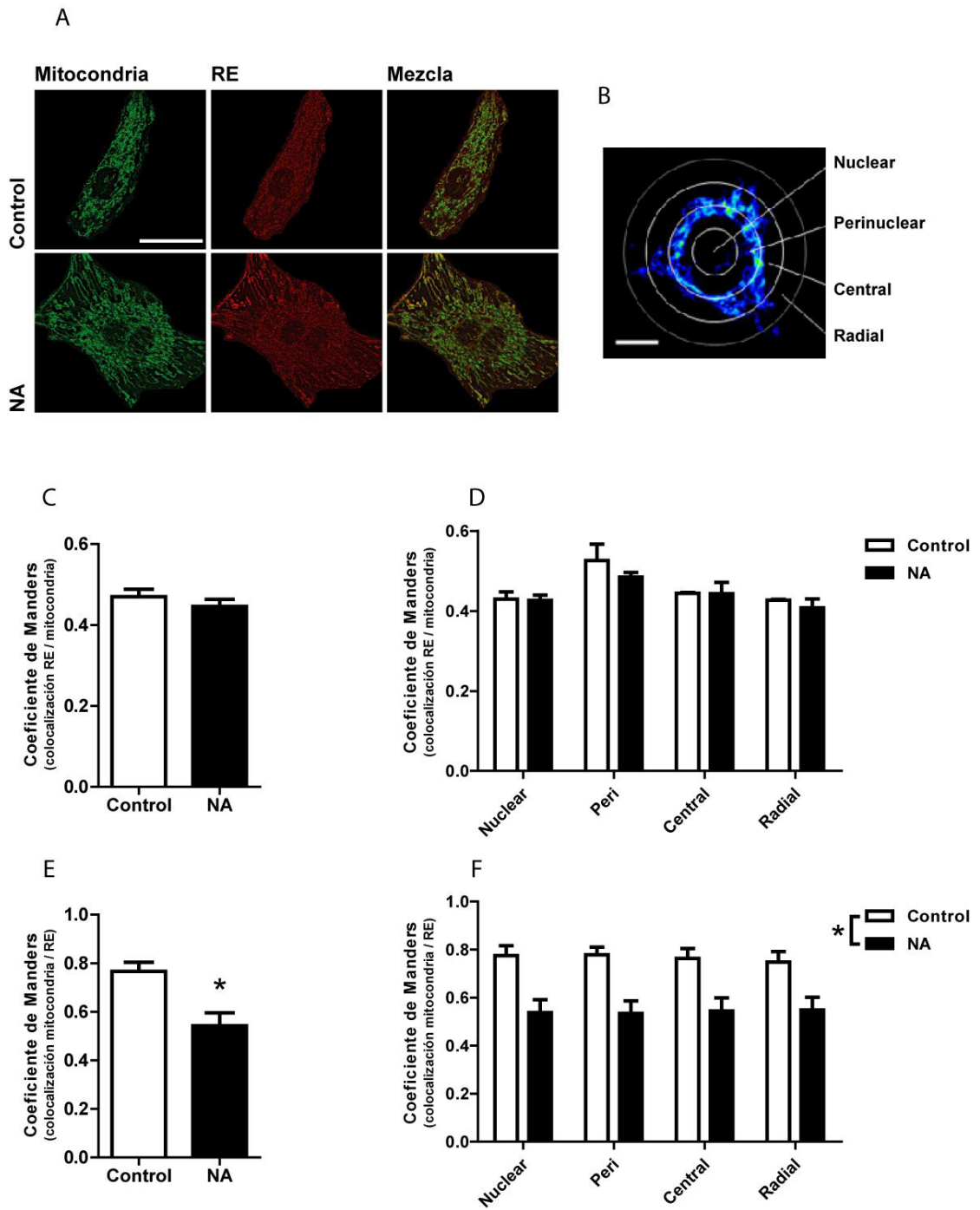
**Figura 9: El incremento del  $Ca^{2+}$  mitocondrial inducido por insulina está reducido en los cardiomiocitos hipertroficados.** A) Cinética de los niveles de  $Ca^{2+}$  mitocondrial en cardiomiocitos controles (línea negra) e hipertroficados (NA 10  $\mu$ M por 24 h, línea roja). Se agregó insulina 100 nM a los 100 seg y CCCP 50  $\mu$ M como control positivo a los 350 seg. B) Áreas bajo la curva de las señales de  $Ca^{2+}$  mitocondrial de cardiomiocitos control e hipertroficados entre los 100 y 350 seg. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes. \* $p \leq 0,05$  vs control.



**Figura 10: El incremento de  $Ca^{2+}$  mitocondrial inducido por histamina está reducido en los cardiomiocitos hipertroficados.** A) Cinética de los niveles de  $Ca^{2+}$  mitocondrial en cardiomiocitos control (línea negra) e hipertroficados (NA 10  $\mu$ M 24 h, línea roja). Se agregó histamina 100 mM a los 100 seg y CCCP 50  $\mu$ M como control positivo a los 350 seg. B) Áreas bajo la curva de las señales de  $Ca^{2+}$  mitocondrial de cardiomiocitos control e hipertroficados entre los 100 y 350 seg. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p \leq 0,05$  vs Control.

A pesar de que tanto el RE como las mitocondrias se encuentran distribuidos a lo largo de toda la célula, ambos organelos son altamente dinámicos y cambian de estructura, forma y posición constantemente. Por este motivo es posible que el cambio en el grado de colocalización se encuentre confinado a una zona particular de la célula o que los cambios observados sean diferentes en distintas regiones celulares. Para evaluar la posible diferencia entre las distintas zonas de la célula se aplicó un análisis radial del coeficiente de Manders previamente descrito, que permite analizar el grado de colocalización en varias zonas concéntricas separadas (Figura 11B) (Bravo y cols 2011). De esta manera se evaluó si la diferencia en los contactos RE-mitocondria es un fenómeno que ocurre de manera homogénea a lo largo de la célula o si se encuentra restringido a alguna región en particular.

El análisis del coeficiente de Manders muestra que el desarrollo de hipertrofia no altera la colocalización del RE con respecto a la mitocondria (RE/mitocondria), es decir, la fracción del RE que está colocalizando con la mitocondria se mantiene inalterado (Figura 11C). Al aplicar el análisis radial, no se observaron diferencias entre las distintas regiones subcelulares ni tampoco entre la condición control y la hipertrófica (Figura 11D). Por otro lado, interesantemente, el análisis del coeficiente de Manders de la mitocondria con respecto al RE (mitocondria/RE), es decir, la fracción de la mitocondria que está colocalizando con el RE, mostro una significativa reducción en la condición hipertrófica con respecto a la condición control (Figura 11E). Esto quiere decir que en hipertrofia existe un alejamiento o desacoplamiento de las mitocondrias con el RE. Al realizar este análisis en las distintas regiones subcelulares, se observó que hipertrofia induce una reducción de similar magnitud en todas las regiones sin generar diferencias entre ellas. Por otro lado, hipertrofia sí tiene un efecto significativo en el conjunto total de datos, lo que concuerda con el resultado anterior en el que se analiza la célula en su totalidad (Figura 11F). La diferencia entre los resultados de la colocalización de RE/mitocondria con mitocondria/RE probablemente se deba a que el RE es una estructura mucho más extensa que las mitocondrias y, por lo tanto, el alejamiento de las mitocondrias no afecta de forma importante su grado de colocalización.



**Figura 11: La colocalización entre RE y mitocondria se reduce en los cardiomiocitos hipertróficos.** A) Imágenes confocales de cardiomiocitos controles e hipertróficos (NA 10  $\mu$ M por 24 h) teñidos con sondas fluorescentes organelo-específicas ER-Tracker Red (RE, rojo) y Mito-Tracker Green (mitocondria, verde) y la mezcla de ambas tinciones. Barra = 20  $\mu$ M. B) Esquema de análisis radial utilizado para dividir la célula en las diferentes regiones subcelulares. C) Coeficiente de Manders para la colocalización RE/mitocondria, es decir, la fracción de la región ocupada por el RE que esta colocalizando con la mitocondria, en la totalidad de la célula. D) Coeficiente de Manders para la colocalización RE/mitocondria en diferentes regiones subcelulares. E) Coeficiente de Manders para la colocalización mitocondria/RE, es decir, la fracción de la región ocupada por la mitocondria que esta colocalizando con el RE, en la totalidad de la célula. F) Coeficiente de Manders para la colocalización mitocondria/RE en diferentes regiones subcelulares. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p \leq 0,05$  vs control.

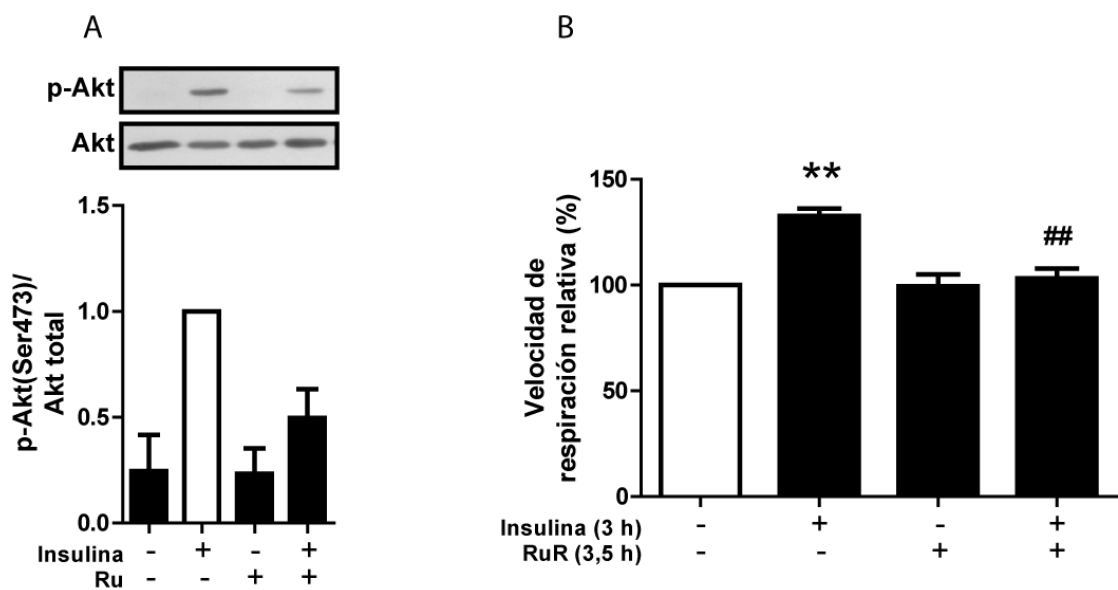
En conclusión, existe un menor contacto RE-mitocondria en los cardiomiocitos hipertróficos y este evento podría explicar, en parte, porque hay un menor traspaso de  $Ca^{2+}$  entre estos organelos.

### **6.9. El bloqueo de la entrada de $Ca^{2+}$ a la mitocondria reduce la respuesta a insulina**

Con el objetivo de determinar si la menor entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria observada en los cardiomiocitos hipertróficos afecta la respuesta a insulina, se determinó la fosforilación de Akt y el consumo de oxígeno en respuesta a esta hormona usando rojo rutenio para simular la menor entrada de  $Ca^{2+}$  observada en esta condición patológica. El análisis de Wester blot muestra que el bloqueo de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria redujo considerablemente el incremento en la fosforilación de Akt en respuesta a insulina, aunque no de manera significativa. Esto sugiere que la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria regula de alguna forma la fosforilación de Akt (Figura 12A). Se observó un efecto similar al medir el consumo de oxígeno en respuesta a insulina, indicando que esta hormona controla el metabolismo mitocondrial a través de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria (Figura 12B). En resumen, tanto la señal



transduccional como los efectos metabólicos finales inducidos por insulina dependen de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria.



**Figura 12: La respuesta a insulina depende de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria.** A) Western blot de p-Akt y Akt (panel superior) y densitometría de p-Akt relativizada por Akt (panel inferior) de extractos proteicos de cardiomiocitos estimulados con rojo rutenio (Ru) 10  $\mu\text{M}$  por 30 min y luego estimulados con insulina 100 mM por 15 min. Sin diferencias significativas. B) Velocidad de la respiración relativa de cardiomiocitos estimulados con rojo rutenio (10  $\mu\text{M}$  por 3,5 h) y luego con insulina 100 mM por 3 h medido por un electrodo de Clark. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*\* =  $p \leq 0,01$  vs control y ## =  $p \leq 0,01$  vs insulina 3 h.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Insulina y su relación con el $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial

La insulina corresponde a una hormona con importantes funciones en el corazón, principalmente promoviendo el uso de glucosa como sustrato energético. En las últimas décadas, se han hecho importantes avances en el conocimiento sobre las vías de señalización involucradas en los efectos de insulina a nivel celular, siendo la cascada transduccional más estudiada la constituida por PI3K/Akt, la cual controla tanto la captación de glucosa como los eventos metabólicos y transduccionales inducidos por insulina (Taniguchi y cols., 2006). Recientemente también se ha descrito la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE a través del  $\text{IP}_3\text{R}$  como un importante participante de la señalización de esta hormona (Contreras-Ferrat y cols., 2010). Particularmente, en esta tesis se describe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria como un nuevo evento clave en esta vía transduccional. Nuestros resultados sugieren la participación de dos actores claves en esta acción: a) el canal mCU, que permite el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la mitocondria y b) el  $\text{IP}_3\text{R}$ , principal canal de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrado en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina. Interesantemente, este mismo canal participa en la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma que fuera identificado previamente (Contreras-Ferrat y cols., 2010), sugiriendo que la misma señalización genera ambas señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, como se discutirá más adelante, estas señales, a pesar de tener el mismo origen, poseen mecanismos regulatorios particulares.

La metodología utilizada en esta tesis para evaluar la participación del mCU en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria fue su inhibición farmacológica mediante rojo rutenio. A pesar de que este compuesto se utiliza ampliamente en la literatura, presenta interacciones inespecíficas, principalmente el bloqueo del RyR y la inhibición de la bomba SERCA (Xu y cols., 1999). Por esto, los resultados presentados en la Figura 4, donde se observa que ryanodina no inhibe la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria,

permiten no solo descartar la participación del RyR en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina, sino que además permite descartar que la inhibición de esta señal por rojo rutenio se deba a alguna inhibición inespecífica. Adicionalmente en la literatura hay antecedentes que muestran la presencia del RyR en la membrana interna de la mitocondria (mRyR), los que estarían encargados de permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a este organelo (Beutner y cols., 2001). De esta forma, el hecho de que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina no sea inhibida con ryanodina descarta la participación del mRyR en este proceso.

Finalmente, a pesar de que sus propiedades funcionales se conocen hace varias décadas, los componentes proteicos del mCU han sido recientemente identificados (Baughman y cols., 2011 y De Stefani y cols., 2001). Esto permitirá el desarrollo de nuevas herramientas con las que se podrá evaluar la participación del mCU de manera más específica.

## **7.2. Señales citoplasmática y mitocondrial de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de insulina en el cardiomiocito hipertrófico**

A pesar de que la participación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la señalización de insulina ya se conocía previamente tanto en el cardiomiocito como en otros modelos celulares, los efectos que puedan tener diversos estados patológicos sobre esta señalización se desconocen hasta la fecha. En esta tesis se evaluó si las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto a nivel citoplasmático como mitocondrial dependientes de insulina se alteran en el cardiomiocito hipertrófico. En la literatura existen antecedentes que muestran que hipertrofia induce cambios en la expresión de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y desregulación en señales citoplasmáticas de este ion (Anger y cols., 1998; Yatani y cols., 2001; Zwadlo y Borlak, 2005). Este proceso celular es un excelente modelo para estudiar posibles alteraciones en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, los resultados presentados en la Figura 8 muestran que no hay alteraciones en la forma, temporalidad ni intensidad de la señal del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático inducida por insulina en los cardiomiocitos hipertróficos. Por otro lado, este resultado, aunque sorprendente, no descarta la posibilidad de que existan alteraciones circunscritas a alguna región celular en

particular. Considerando la fina regulación con la que se maneja el  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, es posible que la medición de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando FLUO3 y microscopia confocal no sea lo suficientemente sensible ni posea la suficiente resolución como para evaluar pequeñas variaciones en la espacialidad y/o temporalidad de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por insulina. Tampoco FLUO3 es una sonda con la que se puede determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sino sólo permite medir cambios relativos, por lo que no se pueden descartar variaciones en la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, tampoco permite evaluar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en compartimientos celulares distintos al citoplasma como por ejemplo la mitocondria. Por estos antecedentes se decidió medir el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial además del citoplasmático. La Figura 9 muestra que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial descrita anteriormente está alterada en los cardiomiocitos hipertróficos. Adicionalmente, la Figura 10 muestra que se obtuvo un resultado similar al estimular los cardiomiocitos con histamina, indicando que el efecto observado se podría deber a una alteración directa sobre la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE en los cardiomiocitos hipertróficos, probablemente a través del  $\text{IP}_3\text{R}$ , o sobre la maquinaria encargada de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria, y no a un efecto particular sobre la señalización de insulina previa a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este resultado concuerda con el trabajo de Fauconnier y cols. donde se estudió la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y mitocondrial en respuesta a estímulo eléctrico en cardiomiocitos obtenidos de ratones obesos, otra patología donde se observa una marcada resistencia a la insulina en el corazón (Fauconnier y cols., 2005). En ese trabajo se observó que cardiomiocitos tratados con insulina y estimulados eléctricamente mostraban un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria comparados con cardiomiocitos no tratados con insulina. Sin embargo, los cardiomiocitos obtenidos de ratones obesos no mostraron tal incremento. Estos resultados sugieren que insulina no solo genera directamente una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino que además favorece la entrada inducida por otros estímulos. Por otro lado, este trabajo lleva a pensar que en otros modelos de resistencia a la insulina sería posible observar una reducción en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria similar a la observada en el presente trabajo, lo que podría indicar un elemento común a los mecanismos de resistencia a la insulina.

Aunque en la literatura ya está descrito el mecanismo a través del cual las mitocondrias captan  $\text{Ca}^{2+}$  luego de una liberación desde el RE, y se han identificado algunos componentes reguladores de este proceso, se desconocen los posibles mecanismos patológicos que pueden estar interviniendo en este proceso a nivel celular. Existen varias alternativas que podrían explicar esta alteración en la comunicación entre RE y mitocondria. Una de ellas puede ser una pérdida de contacto entre ambos organelos a causa de un alejamiento físico. Este factor es de gran importancia puesto que la distancia entre ambos organelos es clave para un correcto traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ellos (Rizzuto y cols., 1998). Además, ambos organelos son altamente dinámicos y pueden cambiar de forma y/o distribución frente a distintos estímulos. Por ejemplo, el trabajo de Bravo y cols. mostró que en las etapas tempranas del estrés de RE, tanto las mitocondrias como el RE migran a la región perinuclear de la célula, generando un incremento de los contactos y del traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ambos organelos, lo que culmina en un incremento del metabolismo mitocondrial (Bravo y cols., 2011). Estos antecedentes nos llevaron a explorar la posibilidad de que un mecanismo similar, pero inverso, estuviera ocurriendo en los cardiomiocitos hipertróficos, donde un desacoplamiento de ambos organelos podría impedir el traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a insulina. Los resultados de la Figura 11 muestran que efectivamente ambos organelos colocalizan menos en cardiomiocitos hipertróficos comparados con los normales, lo que indica que los contactos entre ambos están reducidos. En este caso el desacoplamiento funcional es un evento que ocurre de manera homogénea a lo largo de toda la célula, y no se restringe a una región subcelular en particular. El distanciamiento entre RE y mitocondria impediría que se alcanzara la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria en la superficie de la mitocondria para permitir el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a esta en el momento de su liberación a través del  $\text{IP}_3\text{R}$ . Sin embargo, existen otros eventos que podrían estar ocurriendo y que podrían explicar por qué ocurre esta menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina que no fueron abordados en esta tesis.

Otra alternativa sería que la regulación esté ocurriendo a nivel del  $\text{IP}_3\text{R}$ , por ejemplo, disminuyendo su expresión, actividad o localización. En este sentido, es importante considerar que existen tres subtipos de  $\text{IP}_3\text{R}$ , todos con distribución

subcelular y propiedades particulares (Pantazaka y Taylor, 2011; Zhang y cols., 2011). En particular, en el cardiomiocito de rata neonata, el modelo de estudio de esta tesis, se han encontrado los tres tipos de IP<sub>3</sub>R, aunque con distinta distribución subcelular. Los IP<sub>3</sub>R del tipo I y III se encontraron principalmente en la región nuclear mientras que el tipo II se localizó casi exclusivamente en el citoplasma (Ibarra y cols., 2004). En otro trabajo realizado en el mismo modelo celular también se logró identificar a los IP<sub>3</sub>R del tipo I y II, ubicándose el primero en gran cercanía con las mitocondrias, especialmente en la región perinuclear (Jaconi y cols., 2000). En el caso de los cardiomiocitos de rata adulta, se ha identificado al IP<sub>3</sub>R tipo II como el más abundante (Perez y cols., 1997). Por otro lado, se sabe que, en respuesta a la activación de receptores de siete dominios transmembrana como los AR, el IP<sub>3</sub>R puede ser ubiquitinado y degradado por el proteosoma (Wojcikiewicz, 2004). Sin embargo, estudios realizados en diferentes modelos de hipertrofia cardiaca en animales muestran que los niveles de IP<sub>3</sub>R se encuentran aumentados (Harzheim y cols., 2009). No obstante, en este trabajo sólo se estudió la expresión de un tipo particular de IP<sub>3</sub>R, el tipo II, mientras que la expresión de los otros tipos de IP<sub>3</sub>R, los tipos I y III, aun se desconoce. Por otro lado, en el mismo trabajo se muestra que existe una redistribución del IP<sub>3</sub>R del tipo II desde una localización mayormente nuclear a una más citoplasmática. Interesantemente, en el trabajo de Contreras-Ferrat y cols. se indica al IP<sub>3</sub>R tipo II como el canal clave en la liberación de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma en respuesta a insulina en cardiomiocitos de rata neonata, por lo que es muy probable que este mismo canal, al menos en parte, participe en la entrada de este ion a la mitocondria.

Con respecto a las mitocondrias, se han identificado dos subpoblaciones en el cardiomiocito adulto, unas ubicadas justo debajo del sarcolema (subsarcolemales) y otras ubicadas entre las miofibrillas (intermiofibrilares) (Palmer y cols., 1977; Riva y cols., 2005). Además de estar ubicadas en regiones celulares distintas, las mitocondrias intermiofibrilares son metabólicamente más activas y tienen una mayor capacidad de incorporar Ca<sup>2+</sup> (Palmer y cols., 1977; Palmer y cols., 1986). Por estos antecedentes, probablemente sean estas las mitocondrias que se encuentran más acopladas al RE y las que incorporan el Ca<sup>2+</sup> en respuesta a insulina. Finalmente, es fundamental estudiar la participación de los tres diferentes tipos de IP<sub>3</sub>R en la entrada

de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria inducida por insulina, pues su expresión, distribución y cercanía a la mitocondria podría ser regulada de manera independiente en el cardiomiocito hipertrófico. Esto último podría además explicar por qué se observa una alteración evidente en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria mientras que en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático no se observan cambios, ya que podrían estar participando distintas poblaciones o tipos de  $\text{IP}_3\text{R}$  en cada uno de los casos.

### **7.3. Regulación del consumo de oxígeno y fosforilación de Akt por la señal de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial dependiente de insulina**

Un aspecto interesante de los resultados obtenidos en esta tesis es la relación entre la reducción de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en respuesta a insulina en los cardiomiocitos hipertróficos (Figura 9) con un menor consumo de oxígeno (Figura 7). Sin duda estos dos eventos están relacionados directamente debido a que una de las funciones más importantes del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria es la regulación de la PDH y el ciclo de Krebs, favoreciendo el metabolismo mitocondrial. Estos resultados junto con la inhibición del incremento del consumo de oxígeno en respuesta a insulina con rojo rutenio (Figura 12) demuestran que el incremento en el consumo de oxígeno dependiente de insulina está mediado por una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria mediante el mecanismo descrito en esta tesis. Este es un nuevo proceso involucrado en la regulación del metabolismo celular por insulina, el cual no había sido descrito previamente en la literatura.

De manera similar al consumo de oxígeno, la menor fosforilación de Akt en respuesta a insulina en cardiomiocitos hipertróficos (Figura 7) también correlaciona con la menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria bajo las mismas condiciones (Figura 9). Además, la menor fosforilación de Akt en respuesta a insulina en cardiomiocitos tratados con rojo rutenio (Figura 12) muestra que ambos eventos están íntimamente relacionados, y que la fosforilación de Akt depende, al menos en parte, de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria. Este resultado es sorprendente pues no existen antecedentes que evidencien la existencia de tal relación, además de ir en contra de la temporalidad previamente descrita para este tipo de los eventos, donde la mitocondria ha sido

clásicamente considerada como un blanco final de la respuesta a insulina y no como un importante intermediario capaz de regular la bioactividad de la hormona. Sin embargo, existen algunas posibles explicaciones para esta regulación.

Un mecanismo que tiene la célula para regular la fosforilación de Akt son las fosfatasa (Taniguchi y cols., 2006). En la literatura existen antecedentes que indican que en el corazón, CN se puede unir a Akt, desfosforilándola y reduciendo su activación en respuesta a insulina (Ni y cols., 2007). Como se discutió previamente, CN es un importante intermediario en la señalización de hipertrofia que es activado por  $Ca^{2+}$ , por lo que es posible que se encuentre activada y constituya un mecanismo de reducción de la respuesta insulina en cardiomiocitos hipertróficos. Sin embargo, no hay antecedentes que permitan postular que CN está preactivada en los cardiomiocitos tratados con rojo rutenio. Tal vez lo que podría estar ocurriendo es que cuando se produce la salida de  $Ca^{2+}$  inducida por insulina desde el RE, como el  $Ca^{2+}$  no puede entrar a la mitocondria, este ión se esté escapando hacia el citoplasma, generando un incremento mayor al inducido por insulina en una condición normal. Es decir, el bloqueo de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria generaría una alteración en la señal citoplasmática de  $Ca^{2+}$  inducida por insulina, lo que podría llevar a una activación de CN. Esta idea coincide con otros trabajos que muestran que la mitocondria tiene un importante rol en la regulación de las señales de  $Ca^{2+}$  citoplasmático, y que el bloqueo de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria puede alterar la señal de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma (Eisner y cols., 2010). Sin embargo, para comprobar esta hipótesis será necesario establecer si la presencia de rojo rutenio altera efectivamente la señal de  $Ca^{2+}$  citoplasmático inducido por insulina, y si esta alteración lleva a una activación de nuevos señalizadores como CN, proceso que no ha sido previamente relacionado con la señalización de esta hormona.

Otra fosfatasa recientemente descrita es PHLPP, que, a diferencia de CN, presenta una mayor especificidad por Akt (Brognard y Newton, 2008). Miyamoto y cols. establecieron que PHLPP es un importante regulador de la fosforilación de Akt y, en particular, de la fosforilación en el residuo Ser473, fosforilación estudiada en esta tesis (Miyamoto y cols., 2010). Sin embargo, se desconocen mecanismos de regulación



directos de PHLPP y es poco probable que sea regulada directamente por  $\text{Ca}^{2+}$  pues carece de sitios de unión a este ión. Interesantemente, tanto PHLPP como Akt se pueden encontrar en la mitocondria (Miyamoto y cols., 2010; Bijur y Jope, 2003). La entrada de Akt a la mitocondria es un proceso dinámico favorecido por la estimulación con insulina, IGF-1 y estrés celular (Bijur y Jope, 2003). Además, la entrada de Akt a la mitocondria en respuesta a insulina es un importante estimulador del metabolismo mitocondrial y también tiene un efecto antiapoptótico en los cardiomiocitos (Yang y cols., 2009; Su y cols., 2011). Probablemente el  $\text{Ca}^{2+}$  no regula directamente la actividad de Akt ni PHLPP, pero es posible que regule la distribución e interacción entre ambas proteínas, controlando finalmente la activación de Akt. Sin embargo, con los resultados obtenidos en esta tesis no es posible distinguir si la reducción en la fosforilación de Akt ocurre en el citoplasma, mitocondria o en ambos compartimentos ni tampoco se conoce si la Akt mitocondrial participa en otros efectos inducidos por insulina además del metabolismo mitocondrial como la captación de glucosa. Ambas ideas corresponden a blancos próximos e interesantes para el estudio, pudiendo dar indicios de cuáles son los mecanismos encargados de regular los eventos observados en esta tesis.

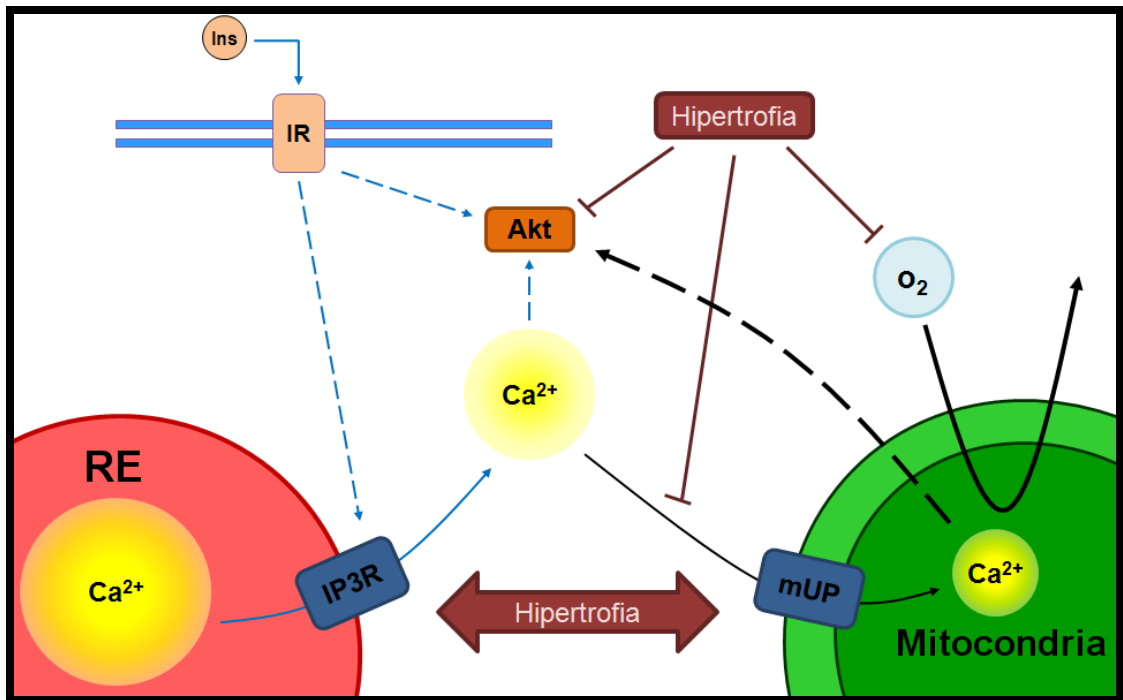
#### **7.4. Regulación de los contactos RE-mitocondria en hipertrofia**

Un resultado interesante de esta tesis es que, por primera vez, se muestra una reducción en los contactos RE-mitocondria en cardiomiocitos hipertróficos (Figura 11), lo que conduce no sólo a un desacoplamiento físico si no que también funcional, evidenciado por una reducida transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre estos organelos en respuesta tanto a insulina como a histamina (Figuras 9 y 10). En la literatura no existen antecedentes que expliquen directamente este fenómeno, sin embargo, se ha descrito que cardiomiocitos hipertróficos, tanto *in vivo* como *in vitro*, presentan una reducción en la expresión de Mfn2 (Fang, 2007). Como se mencionó previamente, Mfn2 es un importante regulador de los contacto RE-mitocondria, además de ser necesario para un correcto traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ellos (de Brito y Scorrano, 2008). Estos antecedentes sugieren que el desacoplamiento entre RE y mitocondria en el cardiomiocito hipertrófico se debe a una menor expresión de Mfn2, lo que causaría una reducción en

los contactos y explicaría el menor traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  entre estos organelos. Interesantemente, antecedentes en la literatura muestran que la sobreexpresión de Mfn2 previene el desarrollo de hipertrofia en cardiomiocitos, indicando que esta proteína tiene un rol clave en el desarrollo de esta patología (Yu y cols., 2011). Estos datos sugieren que el desacoplamiento RE-mitocondria no es una consecuencia del fenotipo de hipertrofia, sino más bien un paso crítico en la regulación y desarrollo de la hipertrofia. Descubrir los elementos que regulan el acoplamiento RE-mitocondria permitiría entender mejor las causas y el desarrollo de la hipertrofia cardiaca además de la menor respuesta a insulina observada en esta condición, como se discutió anteriormente, lo que lo transforma en un interesante blanco de futuros estudios.

### **7.5. Modelo**

Finalmente, el modelo del papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la señalización de insulina y los efectos de hipertrofia cardiaca elaborados a partir de los resultados obtenidos en esta tesis se muestran en la Figura 14. La unión de insulina a su receptor lleva por un lado a la fosforilación y activación de Akt por la vía canónica IR-IRS-PI3K-Akt y por otro lado genera una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a través del  $\text{IP}_3\text{R}$ , que también lleva a la fosforilación de Akt. Este  $\text{Ca}^{2+}$  liberado entra a la mitocondria regulando el metabolismo mitocondrial, aumentando el consumo de oxígeno y la fosforilación y activación de Akt. En el cardiomiocito hipertrofico se genera un desacoplamiento entre RE y mitocondria, lo que impide un correcto traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  entre estos organelos. Este menor traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina genera un menor consumo de oxígeno y fosforilación de Akt. Sin embargo la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por insulina se encuentra inalterada.



**Figura 14: Modelo de la participación del Ca<sup>2+</sup> citoplasmático y mitocondrial en la activación de Akt y el consumo de oxígeno en respuesta a insulina en el cardiomiocito.** En los cardiomiocitos hipertroficados disminuyen los contactos RE-mitocondria, alterando el traspaso de Ca<sup>2+</sup>, fosforilación de Akt y consumo de oxígeno en respuesta a insulina.

## 8. CONCLUSIONES

- Insulina incrementa los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos por un mecanismo dependiente del  $\text{IP}_3\text{R}$  e independiente del  $\text{RyR}$ , y su ingreso a este organelo es bloqueada por inhibidor del mCU rojo rutenio.
- Existe desensibilización del sistema transduccional de insulina en los cardiomiocitos hipertrofiados con el agonista NA, evidenciada por una reducción en los niveles de Akt fosforilado y un menor consumo de oxígeno en respuesta a esta hormona.
- Existe una reducción selectiva de la señal del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (pero no en  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático) generada por insulina e histamina en los cardiomiocitos hipertróficos.
- Los contactos RE-mitocondria disminuyen en los cardiomiocitos hipertróficos, lo que podría ser una de las causas de la menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a insulina e histamina.
- La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria es necesaria para la fosforilación de Akt y el incremento del consumo de oxígeno inducidos por insulina. En consecuencia, la menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria observada en los cardiomiocitos hipertróficos podría explicar la menor fosforilación de Akt y consumo de oxígeno en respuesta a insulina.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Ahuja P, Sdek P y MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev.* 87, 521-44. (2007).

Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ y Koch, WJ. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science.* 280, 574-7. (1998).

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB y Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 261-9. (1997).

Allard MF, Henning SL, Wambolt RB, Granleese SR, English DR y Lopaschuk GD. Glycogen metabolism in the aerobic hypertrophied rat heart. *Circulation.* 96, 676-82. (1997).

Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, English DR y Lopaschuk GD. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 267, 742-50. (1994).

Anger M, Lompré AM, Vallot O, Marotte F, Rappaport L y Samuel JL. Cellular distribution of Ca<sup>2+</sup> pumps and Ca<sup>2+</sup> release channels in rat cardiac hypertrophy induced by aortic stenosis. *Circulation.* 98, 2477-86. (1998).

Backer JM, Myers MG, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY y Schlessinger J. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 11, 3469-79. (1992).

Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ y Kelly DP. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest.* 105, 1723-30. (2000).

Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V y Mootha VK. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 476, 341-345. (2011).

Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA y Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289, 8-16. (2005).

Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 32, 235-49. (2002).

Berridge MJ, Bootman MD y Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 517-29. (2003).

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415, 198-205. (2002).

Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI y Sheu SS. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 276, 21482-8. (2001).

Bijur G y Jope R. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem.* 87, 1427-35. (2003).

Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR y Port DJ. Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 32, 817-30. (2000).

Brand MD y Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 435, 297-312. (2011).

Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, Gatica D, Rodriguez AE, Pedrozo Z, Chiong M, Parra V, Quest AFG, Rothermel BA y Lavandero S. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol.* 44, 16-20. (2012).

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

Brognard J y Newton AC. PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 19, 223-30. (2008).

Brownsey RW, Boone AN y Allard MF. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res.* 34, 3-24. (1997).

Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, Vais H, Cheung KH, Yang J y Parker I. Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP3 Receptor Ca<sup>2+</sup> Transfer to Mitochondria. *Cell.* 142, 270-283. (2010).

Contreras-Ferrat AE, Toro B, Bravo R, Parra V, Vásquez C, Ibarra C, Mears D, Chiong M, Jaimovich E, Klip A y Lavandero S. An inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-IP3 receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology.* 151, 4665-77. (2010).

Cooper RH, Randle PJ y Denton RM. Regulation of heart muscle pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem J.* 143, 625-41. (1974).

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M y Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378, 785-9. (1995).

Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA y Hajnóczky G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*. 174, 915-21. (2006).

Csordás G, Thomas AP y Hajnóczky G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria in cardiac muscle. *Trends Cardiovasc Med*. 11, 269-75. (2001).

Csordás G, Várnai P, Golenár T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T y Hajnóczky G. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell*. 39, 121-32. (2010).

D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB y Dorn GW. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 8121-6. (1997).

Davey KAB, Garlick PB, Warley A y Southworth R. Immunogold labeling study of the distribution of GLUT-1 and GLUT-4 in cardiac tissue following stimulation by insulin or ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292, 2009-19. (2007).

de Brito OM y Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 456, 605-10. (2008).

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I y Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 336-340. (2011).

DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M y Muslin AJ. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem*. 281, 32841-51. (2006a).



DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M y Muslin AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 113, 2097-104. (2006b).

Denton, RM. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta*. 1787, 1309-16. (2009).

Denton RM, Randle PJ y Martin BR. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J*. 128, 161-3. (1972).

Depre C, Shipley GL, Chen W, Han Q, Doenst T, Moore ML, Stepkowski S, Davies PJ y Taegtmeyer H. Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 4, 1269-75. (1998).

Deprez J, Bertrand L, Alessi DR, Krause U, Hue L y Rider MH. Partial purification and characterization of a wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase that activates heart 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochem J*. 347, 305-12. (2000).

Deschamps AM y Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res*. 69, 666-76. (2006).

Domenighetti AA, Danes VR, Curl CL, Favalaro JM, Proietto J y Delbridge LMD. Targeted GLUT-4 deficiency in the heart induces cardiomyocyte hypertrophy and impaired contractility linked with  $Ca^{2+}$  and proton flux dysregulation. *J Mol Cell Cardiol*. 48, 663-672. (2009).

Dorn GW y Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*. 115, 527-537. (2005).

Eisner V, Parra V, Lavandero S, Hidalgo C y Jaimovich E. Mitochondria fine-tune the slow  $Ca^{2+}$  transients induced by electrical stimulation of skeletal myotubes. *Cell Calcium*. 48, 358-70. (2010).

Esler M. The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens.* 13, 99-105. (2000).

Fang L, Moore XL, Gao XM, Dart AM, Lim YL y Du XJ. Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Science.* 80, 2154-60. (2007).

Fauconnier J, Lanner JT, Zhang SJ, Tavi P, Bruton JD, Katz A y Westerblad H. Insulin and inositol 1,4,5-trisphosphate trigger abnormal cytosolic  $Ca^{2+}$  transients and reveal mitochondrial  $Ca^{2+}$  handling defects in cardiomyocytes of ob/ob mice. *Diabetes.* 54, 2375-81. (2005).

Frey N, Katus HA, Olson EN y Hill JA. Hypertrophy of the Heart. A new therapeutic target? *Circulation.* 109, 1580-1589. (2004).

Friehs I, Cao-Danh H, Nathan M, McGowan FX y del Nido PJ. Impaired insulin-signaling in hypertrophied hearts contributes to ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 331, 15-22. (2005).

Friehs I, Moran AM, Stamm C, Colan SD, Takeuchi K, Cao-Danh H, Rader CM, McGowan FX y del Nido PJ. Impaired glucose transporter activity in pressure-overload hypertrophy is an early indicator of progression to failure. *Circulation.* 100, 187-93. (1999).

Friehs I, Stamm C, Cao-Danh H, McGowan FX y del Nido PJ. Insulin-like growth factor-1 improves postischemic recovery in hypertrophied hearts. *Ann Thorac Surg.* 72, 1650-6. (2001).

Galvez AS, Ulloa JA, Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros LF y Lavandero S. Aldose reductase induced by hyperosmotic stress mediates cardiomyocyte apoptosis: differential effects of sorbitol and mannitol. *J Biol Chem.* 278, 38484-94. (2003).

Garcia JAD y Incerpi EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol.* 90, 409-16. (2008).

Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P y Pozzan T.  $Ca^{2+}$  hot spots on the mitochondrial surface are generated by  $Ca^{2+}$  mobilization from stores, but not by activation of store-operated  $Ca^{2+}$  channels. *Mol Cell.* 38, 280-290. (2010).

Griffiths EJ y Rutter GA. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1787, 1324-33. (2009).

Gupta S, Das B y Sen S. Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling.* 9, 623-52. (2007).

Harris TE y Lawrence JC. TOR signaling. *Sci STKE.* 2003, re15. (2003).

Harzheim D, Movassagh M, Foo RSY, Ritter O, Tashfeen A, Conway SJ, Bootman MD y Roderick HL. Increased  $InsP_3Rs$  in the junctional sarcoplasmic reticulum augment  $Ca^{2+}$  transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 11406-11. (2009).

Huss JM y Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res.* 95, 568-78. (2004).

Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Díaz-Araya G, Jaimovich E y Lavandero S. Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 279, 7554-65. (2004).

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, Kakinuma Y, Matsuda M y Yamaguchi I. Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res.* 26, 829-37. (2003).

Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res.* 81, 412-419. (2009).

Jaconi M, Bony C, Richards SM, Terzic A, Arnaudeau S, Vassort G y Puc at M. Inositol 1,4,5-trisphosphate directs  $Ca^{2+}$  flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic  $Ca^{2+}$  spiking. *Mol Biol Cell.* 11, 1845-58. (2000).

Kaczmarczyk SJ, Andrikopoulos S, Favaloro J, Domenighetti AA, Dunn A, Ernst M, Grail D, Huggins CE, Delbridge LM, Zajac JD y Proietto J. Threshold effects of glucose transporter-4 ( GLUT4 ) deficiency on cardiac glucose uptake and development of hypertrophy. *J Mol Endocrinol.* 31, 449-459. (2003).

Kanda H, Nohara R, Hasegawa K, Kishimoto C y Sasayama SA. Nuclear complex containing PPARalpha/RXRalpha is markedly downregulated in the hypertrophied rat left ventricular myocardium with normal systolic function. *Heart Vessels.* 15, 191-6. (2000).

Kang PM y Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol Med.* 9, 177-82. (2003).

Kim J, Wende AR, Sena S, Theobald HA, Soto J, Sloan C, Wayment BE, Litwin SE, Holzenberger M, LeRoith D y Abel ED. Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol.* 22, 2531-43. (2008).

Kong SW, Bodyak N, Yue P, Liu Z, Brown J, Izumo S y Kang PM. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics*. 21, 34-42. (2005).

Koshman YE, Piano MR, Russell B y Schwertz DW. Signaling responses after exposure to 5 alpha-dihydrotestosterone or 17 beta-estradiol in norepinephrine-induced hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes. *J Appl Physiol*. 108, 686-96. (2010).

Kraegen EW, Sowden JA, Halstead MB, Clark PW, Rodnick KJ, Chisholm DJ y James DE. Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4. *Biochem J*. 295, 287-93. (1993).

Lanner JT, Bruton JD, Katz A y Westerblad H. Ca<sup>2+</sup> and insulin-mediated glucose uptake. *Curr Opin Pharmacol*. 8, 339-45. (2008).

Lanner JT, Katz A, Tavi P, Sandström ME, Zhang SJ, Wretman C, James S, Fauconnier J, Lännergren J, Bruton JD y Westerblad H. The role of Ca<sup>2+</sup> influx for insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes*. 55, 2077-83. (2006).

Leong HS, Brownsey RW, Kulpa JE y Allard MF. Glycolysis and pyruvate oxidation in cardiac hypertrophy--why so unbalanced? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 135, 499-513. (2003).

Lesniak W, Schaefer C, Grueninger S y Chiesi M. Effect of alpha adrenergic stimulation and carnitine palmitoyl transferase I inhibition on hypertrophying adult rat cardiomyocytes in culture. *Mol Cell Biochem*. 142, 25-34. (1995).

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB y Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 322, 1561-6. (1990).

Liang F, Wang F, Zhang S y Gardner DG. Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) $\alpha$  agonists inhibit hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *Endocrinology*. 144, 4187-94. (2003).

Liao R, Jain M, Cui L, D'Agostino J, Aiello F, Luptak I, Ngoy S, Mortensen RM y Tian R. Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice. *Circulation*. 106, 2125-31. (2002).

MacDonald PE, Joseph JW y Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 360, 2211-25. (2005).

Miyamoto S, Purcell NH, Smith JM, Gao T, Whittaker R, Huang K, Castillo R, Glembocki CC, Sussman MA, Newton AC, Brown JH. PHLPP-1 negatively regulates Akt activity and survival in the heart. *Circ Res*. 107, 476-84. (2010).

Molkentin JD y Dorn GW Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*. 63, 391-426. (2001).

Montessuit C y Thorburn A. Transcriptional activation of the glucose transporter GLUT1 in ventricular cardiac myocytes by hypertrophic agonists. *J Biol Chem*. 274, 9006-12. (1999).

Mora A, Sakamoto K, McManus EJ y Alessi DR. Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. *FEBS Lett*. 579, 3632-8. (2005).

Mouton V, Toussaint L, Vertommen D, Gueuning MA, Maisin L, Havaux X, Sanchez-Canedo C, Bertrand L, Dequiedt F, Hemmings BA, Hue L y Rider MH. Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin requires PKB (protein kinase B), but not SGK3 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 3). *Biochem J*. 431, 267-75. (2010).

Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH, Pinz I, Schultz V, Tornheim K y Tian R. Mechanisms for Increased Glycolysis in the Hypertrophied Rat Heart. *Hypertension*. 44, 662-667. (2004).

Ni YG, Yan G, Wang, N, Cao DJ, Sachan N, Morris DJ, Gerard RD, Kuro-O M, Rothermel BA y Hill JA. FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 20517-22. (2007).

Palmer JW, Tandler B y Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem*. 252, 8731-9. (1977).

Palmer JW, Tandler B y Hoppel CL. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 250, 741-8. (1986).

Pantazaka E y Taylor CW. Differential distribution, clustering, and lateral diffusion of subtypes of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*. 286, 23378-87. (2011).

Park MK, Ashby MC, Erdemli G, Petersen OH y Tepikin AV. Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J*. 20, 1863-74. (2001).

Paternostro G. Insulin resistance in patients with cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 42, 246-253. (1999).

Paternostro G, Clarke K, Heath J, Seymour AM y Radda GK. Decreased GLUT-4 mRNA content and insulin-sensitive deoxyglucose uptake show insulin resistance in the hypertensive rat heart. *Cardiovasc Res*. 30, 205-11. (1995).

Perez PJ, Ramos-Franco J, Fill M y Mignery GA. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 272, 23961-9. (1997).

Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E y Hoppel C. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289, 868-72. (2005).

Rizzuto R, Brini M, Murgia M y Pozzan T. Microdomains with high  $Ca^{2+}$  close to  $IP_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* 262, 744-7. (1993).

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA y Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $Ca^{2+}$  responses. *Science.* 280, 1763-6. (1998).

Rizzuto R, Simpson AW, Brini M y Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial  $Ca^{2+}$  revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature.* 358, 325-7. (1992).

Rockman HA, Koch WJ y Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature.* 415, 206-12. (2002).

Rohini A, Agrawal N, Koyani CN y Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res.* 61, 269-80. (2009).

Sadoshima J y Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 59, 551-71. (1997).

Sakamoto K, Arnolds DE, Fujii N, Kramer HF, Hirshman MF y Goodyear LJ. Role of Akt2 in contraction-stimulated cell signaling and glucose uptake in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291, 1031-7. (2006).



Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW y Lienhard GE. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 278, 14599-602. (2003).

Schaub MC, Hefti MA, Harder BA y Eppenberger HM. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med.* 75, 901-20. (1997).

Seals JR y Jarett L. Activation of pyruvate dehydrogenase by direct addition of insulin to an isolated plasma membrane/mitochondria mixture: evidence for generated of insulin's second messenger in a subcellular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 77-81. (1980).

Slot JANW, Geuze HJ, Gigengack S, Jamest DE y Lienhardt GE. Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 7815-7819. (1991).

Somwar R, Niu W, Kim DY, Sweeney G, Randhawa VK, Huang C, Ramlal T y Klip A. Differential effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition on intracellular signals regulating GLUT4 translocation and glucose transport. *J Biol Chem.* 276, 46079-87. (2001).

Su CC, Yang JY, Leu HB, Chen Y y Wang PH. Mitochondrial Akt-regulated mitochondrial apoptosis signaling in cardiac muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302, 716-23. (2012).

Sugden PH. Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ Res.* 84, 633-46. (1999).

Sutendra G, Dromparis P, Wright P, Bonnet S, Haromy A, Hao Z, McMurtry MS, Michalak M, Vance JE, Sessa WC y Michelakis ED. The role of nogo and the mitochondria-endoplasmic reticulum unit in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med.* 3, 88ra55. (2011).

Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T y Rizzuto R. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial  $Ca^{2+}$  channels. *J Cell Biol.* 175, 901-11. (2006).

Taniguchi CM, Emanuelli B y Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature.* 7, 85-96. (2006).

Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ y Eulderink F. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J.* 12, 488-94. (1991).

Wambolt RB, Lopaschuk GD, Brownsey RW y Allard MF. Dichloroacetate improves postischemic function of hypertrophied rat hearts. *J Am Coll Cardiol.* 36, 1378-85. (2000).

Wang PR y Chien YW. Day-night differences in the kinetics and dynamics of insulin: diabetic versus normal Yucatan minipigs. *Chronobiol Int.* 13, 213-25. (1996).

Wettschureck N, Rütten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR y Offermanns S. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nature Med.* 7, 1236-40. (2001).

Whitehead JP, Molero JC, Clark S, Martin S, Meneilly G y James DE. The role of  $Ca^{2+}$  in insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 276, 27816-24. (2001).

Wieland O y Siess E. Interconversion of phospho- and dephospho- forms of pig heart pyruvate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 65, 947-54. (1970).

Wilkins BJ y Molkenin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 322, 1178-91. (2004).

Wojcikiewicz RJH. Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 25, 35-41. (2004).

Xu L, Tripathy A, Pasek DA y Meissner G. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *J Biol Chem.* 274, 32680-91. (1999).

Yang JY, Yeh HY, Lin K y Wang PH. Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 46, 919-26. (2009).

Yatani A, Honda R, Tymitz KM, Lalli MJ y Molkenin JD. Enhanced  $Ca^{2+}$  channel currents in cardiac hypertrophy induced by activation of calcineurin-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 33, 249-59. (2001).

Yip CC y Ottensmeyer P. Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem.* 278, 27329-32. (2003).

Yu H, Guo Y, Mi L, Wang X, Li L y Gao W. Mitofusin 2 inhibits angiotensin II-induced myocardial hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 16, 205-11. (2011).

Zhang S, Fritz N, Ibarra C y Uhlén P. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype-specific regulation of calcium oscillations. *Neurochem Res.* 36, 1175-85. (2011).

Zimmer HG, Kolbeck-Ruhmkorff C y Zierhut W. Cardiac hypertrophy induced by alpha- and beta-adrenergic receptor stimulation. *Cardioscience.* 6, 47-57. (1995).

Zobel C, Rana OR, Saygili E, Bölc B, Saygili E, Diedrichs H, Reuter H, Frank K, Müller-Ehmsen J, Pfitzer G y Schwinger RHG. Mechanisms of  $Ca^{2+}$ -dependent calcineurin activation in mechanical stretch-induced hypertrophy. *Cardiology.* 107, 281-90. (2007).

Zwadlo C y Borlak J. Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca(2+)-handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207, 244-56. (2005).