

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Papel del calcio mitocondrial en el remodelado del
cardiomiocito inducido por IGF-1”**

Pablo Ignacio Sánchez Aguilera

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Directores de Tesis:

Dres. Mario Chiong - Sergio Lavandero

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA**

ESCUELA DE POSTGRADO

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

PABLO IGNACIO SÁNCHEZ AGUILERA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 de marzo de 2022.

Prof. Mario Chiong
Director de Tesis

Prof. Sergio Lavandero
Director de Tesis

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DRA. PAULINA DONOSO

PROF. DR. VERÓNICA EISNER

PROF. DRA. PAOLA LLANOS

PROF. DR. MANUEL ESTRADA
Presidente Comisión de Examen

... Esa alegría de darte cuenta de que la respuesta ya la tenías y que solo había que ordenar las piezas de otra manera...

Dedicado a mi mentora y amiga Pao...

... a mi compañero y referente, Alexis...

... a mi amor, alegría y soporte, Jose.

AGRADECIMIENTOS

Cada párrafo y frase escrita en esta tesis esconden todas las alegrías y frustraciones, miedos y certezas, contratiempos y éxitos que colmaron cada momento de este viaje, viaje que no hubiera sido posible sin el apoyo y presencia de personas que me permitieron dar cada paso hasta este punto.

Agradezco a mis padres, por darme las herramientas necesarias para desarrollarme como persona y como profesional. A mis tres hermanos, por enseñarme a ver la vida distinta y por cuidar al Layno. A mis suegros, por su apoyo, alegría y buena comida. Al Javi, por su constante empuje y enseñarme parte de lo que él ama. A mis amigos argentinos, Sara, Jero, Rami, Lu, Chamo y Marina, que me acogieron y me permitieron avanzar.

Quiero agradecer también a mis compañeros del “Labcito” y el “Labsote” que con su alegría y compañerismo hacían las cosas más fáciles y entretenidas. Al profesor Sergio por creer en mí y darme una oportunidad. Al profesor Mario, por sus consejos, buenas ideas y mejores historias. A la Cecy, por su alegría, vocación y apoyo incondicional, siempre estuvo ahí para tenderme una mano. A la Pao, por contagiarme su amor por la ciencia y mostrarme un camino a seguir. Al Oscar, al Javi, al Pablo, al Mati y al Alexis por demostrarme que las cosas salen mejor cooperando y estrechando lazos.

Por último, dejo estas últimas palabras para ti Jose, por tu amor, tu entrega y tu sacrificio. Te agradezco porque dejaste muchas cosas atrás para acompañarme en esta aventura, porque siempre creíste en mí y no me dejaste abandonar. Por escucharme practicando las presentaciones y aguantarme en los maratónicos días de lectura y escritura. Esta tesis también es tuya.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis de doctorado se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales del Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero y en el Laboratorio de Cardiología Experimental, en el Centro Médico Universitario de Groningen (UMCG) de la Universidad de Groningen (RUG) en los Países Bajos, bajo la supervisión del Dr. Daan Westenbrink.

La realización de este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de:

- Beca para estudios de Doctorado en Chile, ANID 2018 – 2021 (P.S.)
- Proyectos FONDECYT regulares 1161156 y 1200490 (S.L.)
- Proyecto FONDAP 15130011 (S.L., M.C.)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	14
RESUMEN	17
ABSTRACT	20
INTRODUCCIÓN	23
Características de la hipertrofia cardiaca fisiológica y patológica	25
IGF-1 como inductor de la hipertrofia cardiaca fisiológica.....	27
El manejo de Ca ²⁺ mitocondrial y su papel en la fisiología cardiaca	29
El complejo uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial como regulador de las características morfo-funcionales de la mitocondria y el cardiomiocito	31
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	38
Objetivo general	39
Objetivos específicos	39
MATERIALES Y MÉTODOS	40
Cultivo de cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias pluripotentes humanas (CM-CMEH).....	41
Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas (CMRN).....	42
Estímulo hipertrófico con IGF-1	43
Producción lentiviral	44
Transfección de los cardiomiocitos	44
Transcripción reversa y PCR cuantitativo en tiempo real.....	45
Lisado de células y extracción de proteínas	46
Electroforesis, electrotransferencia y Western blot de proteínas	46
Captación de Ca ²⁺ mitocondrial.....	47
Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	49
Determinación de la tasa de consumo de oxígeno (TCO)	49
Determinación de la viabilidad celular	51
Visualización y análisis de la morfología celular	51
Análisis estadístico y visualización de resultados	52
RESULTADOS	53
IGF-1 incrementa la captación y el contenido de Ca ²⁺ mitocondrial en cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas (CM-CMEH) .	54

IGF-1 modifica la expresión de MICU1, MCUR1 de MCUC e incrementa la diferencia de potencial de membrana mitocondrial.....	57
IGF-1 incrementa el consumo de oxígeno de los cardiomiocitos por un mecanismo dependiente de la captación de Ca ²⁺ mitocondrial	60
IGF-1 incrementa la captación de Ca ²⁺ mitocondrial en CMRN	62
DISCUSIÓN	66
IGF-1 incrementa la captación mitocondrial Ca ²⁺ y reduce la fosforilación de PDH	67
IGF-1 modifica la expresión de los elementos regulatorios de MCUC	70
IGF-1 incrementa el consumo de oxígeno de los cardiomiocitos por un mecanismo dependiente de la captación mitocondrial de Ca ²⁺	73
Preguntas abiertas y perspectivas futuras	75
CONCLUSIÓN	79
BIBLIOGRAFÍA	81
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	89
ANEXOS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS PRINCIPALES

Figura 1. Hipertrofia cardiaca patológica y fisiológica.....	26
Figura 2. Efectos cardiacos del IGF-1	28
Figura 3. El complejo uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial (MCUC) y el papel del Ca ²⁺ en la bioenergética mitocondrial	33
Figura 4. IGF-1 incrementa la captación y el contenido de Ca ²⁺ mitocondrial en CM-CMEH.	56
Figura 5. Efecto de IGF-1 sobre expresión de los componentes de MCUC y el potencial de membrana mitocondrial en CM-CMEH.....	59
Figura 6. IGF-1 incrementa la respiración mitocondrial por un mecanismo dependiente de la entrada de Ca ²⁺ a la mitocondria	61
Figura 7. IGF-1 incrementa la captación y contenido de Ca ²⁺ mitocondrial en CMRN.....	64
Figura 8. Efecto de IGF-1 en los niveles proteicos de MCU y la $\Delta\Psi_{mt}$	65

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura S1. Estado de fosforilación de Akt en el residuo serina 473 inducido por IGF-1 en CMRN y CM-CMEH	90
Figura S2. IGF-1 promueve la hipertrofia de los CMRN	90
Figura S3. Efecto de ru360 en la viabilidad de CM-CMEH expuestos a ru360.....	91

ABREVIATURAS

αCGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa
$\Delta\Psi_{mt}$	Diferencia de potencial de membrana mitocondrial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
Akt	Proteína quinasa B
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca²⁺	Ion calcio
[Ca²⁺]_m	Concentración de Ca ²⁺ en la matriz mitocondrial
CAMKII	Proteína quinasa activada por Ca ²⁺ /calmodulina II
CM-CMEH	Cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas
CMRN	Cardiomiocitos de rata neonata
Cn	Calcineurina
CoA	Coenzima A
DNP	2,4-dinitrofenol
Drp1	Proteína GTPasa análogo a dinamina 1
EIM	Espacio intermembrana
EMRE	Elemento regulador esencial de MCU
ERG1	Factor transcripcional de respuesta de crecimiento temprano 1
ERK1/2	Proteína quinasa activada por mitógenos 1 y 2
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FCS	Suero de ternera
H⁺	Protones
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
IGF-1	Factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1
IGF-1R	Receptor de IGF-1
IP₃	Inositol trifosfato
IP₃R	Receptor de IP ₃
IRS1	Sustrato del receptor de insulina 1
Iso	Isoproterenol
MCU	Uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial
MCUb	Uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial b
MCUC	Complejo MCU
MCUR1	Proteína reguladora de MCU 1
MEF2 y 2c	Factor potenciador específico de miocito 2 y 2c
MICU1/2/3	Proteína de captación de Ca ²⁺ 1, 2 y 3
MM	Matriz mitocondrial
MMI	Membrana mitocondrial interna
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTG	Sonda fluorescente MitoTracker green
mTORC1	Proteína blanco mecanístico de rapamicina tipo 1
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NFAT	Factor nuclear de linfocitos T activados
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción de polimerización en cadena

PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK4	Quinasa de PDH 4
PDP1	Fosfatasa de PDH 1
PGC1α	Coactivador del receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas 1 α
Pi	Fosfato inorgánico
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PLC	Fosfolipasa C
R-R	Rojo rutenio
ru360	Rutenio 360
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SMDT1	Gen codificante de la proteína EMRE
SP1	Factor de transcripción proteína de especificidad 1
TBS	Amortiguador Tris salino
TCO	Tasa de consumo de oxígeno
TMRE⁺	Éster etílico de tetrametilrodamina
URF	Unidad de fluorescencia relativa
VDAC	Canal aniónico voltaje dependiente

RESUMEN

Introducción: La hipertrofia cardiaca adaptativa o fisiológica es la respuesta del corazón para adaptar su función y estructura frente a estímulos fisiológicos, incluidos el ejercicio y el embarazo. Recientemente, se mostró que la hipertrofia cardiaca adaptativa correlaciona con incrementos en la expresión de la proteína uniportador de calcio (Ca^{2+}) mitocondrial (MCU), lo cual se asocia con una mayor captación de Ca^{2+} y oxidación de sustratos en la mitocondria. La activación de la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1) es responsable de gran parte de los cambios adaptativos observados en la hipertrofia cardiaca fisiológica. Sin embargo, aún se desconoce el papel de IGF-1 en la captación de Ca^{2+} y función mitocondrial, y si estos cambios juegan un papel relevante en la hipertrofia cardiaca fisiológica.

Objetivo: Determinar el papel de la captación de Ca^{2+} y función mitocondrial en la hipertrofia del cardiomiocito inducida por IGF-1.

Métodos: Para abordar este objetivo se utilizaron los modelos *in vitro* de cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas y cardiomiocitos de ratas neonatas. En ambos modelos se evaluó el efecto de IGF-1 sobre el manejo de Ca^{2+} mitocondrial por medio de microscopía de fluorescencia e indirectamente por medio del análisis de la expresión de proteínas relacionadas al manejo del Ca^{2+} y bioenergética mitocondrial. Los efectos funcionales se analizaron a través del potencial de membrana mitocondrial y la tasa de consumo de oxígeno, utilizando microscopía de fluorescencia y un analizador de flujo metabólico, respectivamente.

Resultados: IGF-1 (10 nM por 24 h) incrementó la captación de Ca^{2+} mitocondrial y disminuyó la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa (PDH) en ambos modelos celulares. A pesar de estos efectos, no se detectaron cambios en los niveles de mRNA

ni proteína de MCU. En su lugar, IGF-1 redujo significativamente la expresión de la proteína de captación de Ca^{2+} 1 (MICU1) e incrementó la proteína reguladora de MCU 1 (MCUR1), sin cambios en las otras subunidades del complejo MCU (MCUC). A nivel funcional, IGF-1 incrementó la diferencia de potencial de membrana mitocondrial y también la tasa de consumo de oxígeno, las cuales se previnieron al bloquear farmacológicamente la captación de Ca^{2+} mediada por MCUC.

Conclusión: La estimulación con IGF-1 incrementa la captación de Ca^{2+} mitocondrial y la actividad de PDH, incrementando el consumo de oxígeno de los cardiomiocitos. Estos cambios se relacionan con la regulación transcripcional de las subunidades MICU1 y MCUR1 del MCUC.

ABSTRACT

“Role of mitochondrial calcium uniporter on IGF-1-induced cardiomyocyte remodeling”

Introduction: The adaptive or physiological cardiac hypertrophy is a stereotyped response of the heart to adapt its shape and function to increased workloads as a result of physiological stimuli like exercise or pregnancy. Recently, physiological cardiac hypertrophy has been related to higher protein levels of the mitochondrial calcium (Ca^{2+}) uniporter (MCU), which has a positive effect on Ca^{2+} uptake and substrate oxidation in the mitochondria. The insulin like growth factor type 1 (IGF-1) receptor signaling pathway is responsible for a great part of the adaptive changes observed in physiological hypertrophy. However, the role of IGF-1 on mitochondrial Ca^{2+} uptake and function, and its relationship with cardiomyocyte hypertrophy is still unknown.

Objective: to determine the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake and function in IGF-1-induced cardiomyocyte hypertrophy.

Methods: to tackle this goal, we used two different *in vitro* models of cardiomyocytes, the embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and neonatal rat ventricular myocytes. We evaluated the effect of IGF-1 incubation on mitochondrial Ca^{2+} uptake by fluorescence microscopy and indirectly, by the analysis of mRNA or protein levels of molecular targets related to mitochondrial Ca^{2+} handling and bioenergetics. As mitochondrial functional parameters, we measured the mitochondrial membrane potential and oxygen consumption rate using fluorescence microscopy and a metabolic flux analyzer, respectively.

Results: 10 nM of IGF-1 for 24 h increased the mitochondrial Ca^{2+} uptake and reduced the pyruvate dehydrogenase (PDH) phosphorylation in both *in vitro* models. Despite these results, we did not see changes in MCU mRNA and protein levels. Interestingly, we observed a drop in the mRNA levels of the mitochondrial Ca^{2+} uptake protein 1 (MICU1) and higher levels of the MCU regulator 1 (MCUR1) transcripts, without other changes in the MCU complex (MCUC) subunits. At the functional level, IGF-1 increased the mitochondrial membrane potential and the oxygen consumption rate, this latest one was prevented by blocking MCUC-mediated Ca^{2+} uptake.

Conclusion: IGF-1 stimulation enhances the mitochondrial Ca^{2+} uptake and PDH activity, increasing the oxygen consumption rate of the cardiomyocytes. These changes are related to the transcriptional regulation of MICU1 and MCUR1 subunits of MCUC.

INTRODUCCIÓN

El corazón es un órgano formado por diversos tipos celulares, entre los cuales el cardiomiocito representa el 85% de la masa miocárdica.¹ Los cardiomiocitos son células excitables y altamente especializadas en un estado de diferenciación terminal, por lo que su capacidad de proliferación es muy baja.¹⁻³ Esta condición determina la capacidad adaptativa y plástica que presentan frente a cambios en su entorno, con el objetivo de mantener su integridad y al mismo tiempo asegurar la función cardiaca para suplir las demandas metabólicas de los órganos periféricos.¹ Este concepto se conoce como remodelado cardiaco y está fuertemente relacionado con el nivel de trabajo al que se ve expuesto al miocardio.⁴ Por ejemplo, una disminución de la carga de trabajo del corazón como respuesta al reposo prolongado o por uso de dispositivos de asistencia ventricular, reducirán el tamaño y función del corazón, remodelado conocido como atrofia cardiaca.⁵ En contraste, la hipertrofia cardiaca es un tipo de remodelado caracterizada por incremento en el tamaño del corazón como una respuesta estereotipada frente a diversos estímulos, tanto fisiológicos (crecimiento, embarazo y ejercicio) como patológicos (sobrecarga de presión o volumen, daño miocárdico, diabetes o una excesiva y sostenida activación neuro-humoral). Estos estímulos difieren tanto en naturaleza como en temporalidad y determinarán el tipo de hipertrofia que se desarrollará, conocidas como hipertrofia cardiaca fisiológica o patológica respectivamente ([Figura 1](#)).⁶ Actualmente, la ciencia se ha abocado a estudiar las diferencias estructurales y funcionales de ambos tipos de hipertrofia. No obstante, los antecedentes acerca de los mecanismos que las determinan y el punto en el que divergen siguen siendo controvertidos.

Características de la hipertrofia cardiaca fisiológica y patológica

La hipertrofia cardiaca fisiológica es una respuesta plástica y reversible del corazón, caracterizada por un aumento del tamaño cardiaco, con o sin cambios en el volumen ventricular y una función contráctil del ventrículo izquierdo conservada o aumentada.^{1,7}

Estos cambios a nivel del órgano tienen un correlato en el cardiomiocito, el cual presenta mayor síntesis proteica, reorganización de la maquinaria contráctil, aumento en la biogénesis mitocondrial y en la capacidad de producción energética ([Figura 1](#)).⁸

Por otro lado, la hipertrofia cardiaca patológica es inicialmente, a similitud de la fisiológica, un proceso adaptativo para reducir el estrés en la pared del miocardio, asociado a un incremento en la función mitocondrial y cardiaca.^{1,9} Esta condición progresa a una fase desadaptativa debido a la naturaleza y cronicidad del estímulo, generando una disminución en volumen de eyección y un aumento del diámetro de la cavidad ventricular izquierda, lo que lleva irreversiblemente a la insuficiencia cardiaca.^{4,9} El cardiomiocito en estas condiciones presenta un alargamiento y un desarreglo de su alineación, asociado a fibrosis intersticial y perivascular.¹⁰ Este crecimiento patológico se ha relacionado con aumentos en la expresión de genes fetales, que en conjunto alteran la flexibilidad metabólica, la oxidación de ácidos grasos y disminuyen la biogénesis y función mitocondrial ([Figura 1](#)).¹¹ Es importante resaltar que estas alteraciones metabólicas y bioenergéticas muchas veces preceden a los cambios estructurales, por lo que podrían ser claves a la hora de entender los mecanismos diferenciadores entre ambos tipos de hipertrofia.^{12,13}

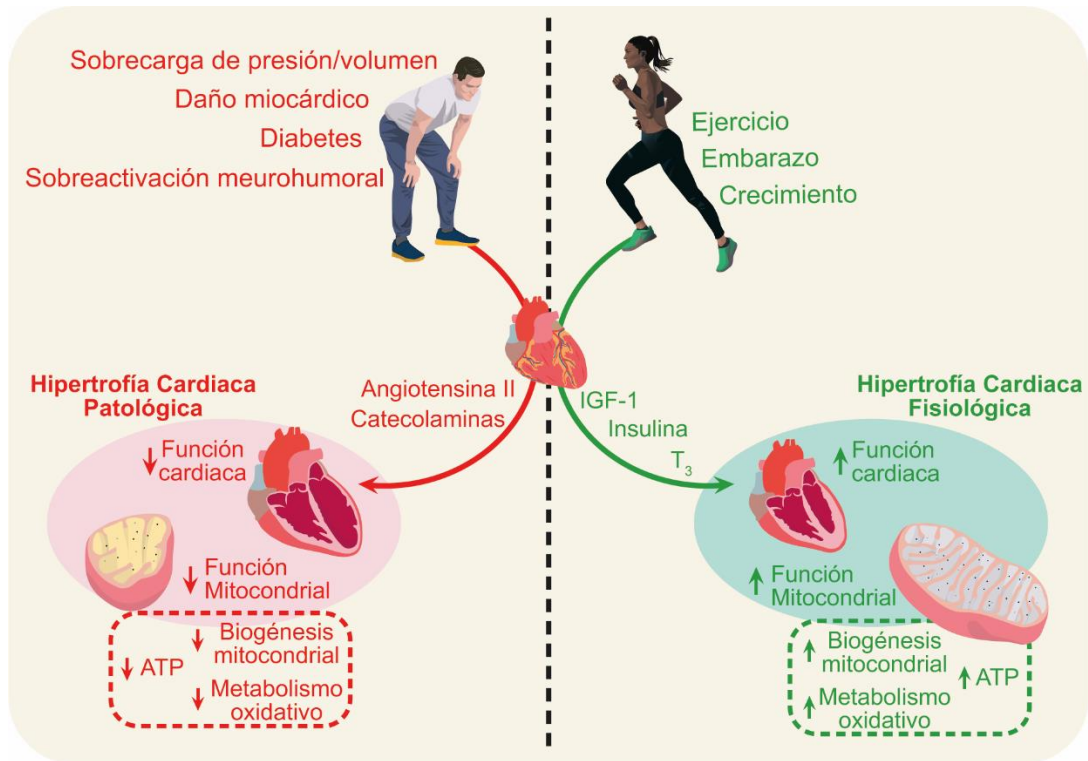


Figura 1. Hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica. Representación de los principales estímulos y factores neurohumorales relacionados con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica. Al comparar ambos tipos de hipertrofia, se observa que tanto la función cardíaca y mitocondrial presentan cambios en direcciones opuestas. Adaptado de Nakamura y cols.¹⁴

Hill & Olson acuñaron el término “plasticidad cardíaca”, señalando que ambas hipertrofias – fisiológica y patológica – son parte de un proceso continuo, en el cual son determinantes la activación de múltiples vías de señalización que favorecen la adaptación o el desarrollo de la insuficiencia cardíaca.⁵ Se han descrito diversas señales humores como la insulina, el factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1) y la hormona tiroidea y también de naturaleza mecánica, que activan vías de señalización asociadas con el remodelado fisiológico del cardiomiocito. Entre ellas se describe la vía asociada a fosfatidil inositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt), la

proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la proteína blanco mecanístico de rapamicina tipo 1 (mTORC1).^{6,11} En cambio, los estímulos relacionados con la hipertrofia cardiaca patológica, como las catecolaminas y angiotensina II, activan las vías de la fosfatasa calcineurina/factor nuclear de linfocitos T activados (Cn/NFAT) y la proteína quinasa activada por calcio-calmodulina II/factor potenciador específico de miocito 2 (CAMKII/MEF2).^{6,8}

IGF-1 como inductor de la hipertrofia cardiaca fisiológica

IGF-1 es un polipéptido de 70 aminoácidos con una masa molecular de 7,6 kDa. Este polipéptido es secretado principalmente por el tejido hepático bajo la estimulación de la hormona del crecimiento.¹⁵ Sin embargo, en el corazón varios tipos celulares la producen, entre ellos están los cardiomiocitos, los fibroblastos y las células endoteliales.¹⁶⁻¹⁹ IGF-1 activa al receptor de IGF-1 (IGF-1R) con actividad tirosina quinasa intrínseca, presente en la membrana plasmática de los cardiomiocitos. Su activación promueve vías de señalización relacionadas con trofismo, proliferación, supervivencia, metabolismo y diferenciación celular, por lo que durante décadas se ha estudiado su papel en el crecimiento cardiaco ([Figura 2](#)).²⁰⁻²³ En la célula cardiaca se han descrito vías de señalización canónicas y otra no canónica activadas por el IGF-1R. En las vías canónicas se activan los ejes del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS1)/PI3K/Akt/mTORC1 y el de la proteína quinasa activada por mitógenos 1 y 2 (ERK1/2), ambas vías asociadas con la hipertrofia cardiaca y supervivencia celular.¹⁶ La vía no canónica, descrita posteriormente, depende de la activación de una proteína $G\alpha_i$, que por medio de las subunidades $\beta\gamma$ activan la vía de fosfolipasa C/inositol

trifosfato/receptor de inositol trifosfato (PLC/IP₃/IP₃R), aumentando los niveles de calcio (Ca²⁺) principalmente a nivel nuclear (Figura 2).^{24,25} Se ha descrito que esta cascada de señalización activa al factor de transcripción MEF2c asociado con hipertrofia cardiaca adaptativa o fisiológica.^{25,26}

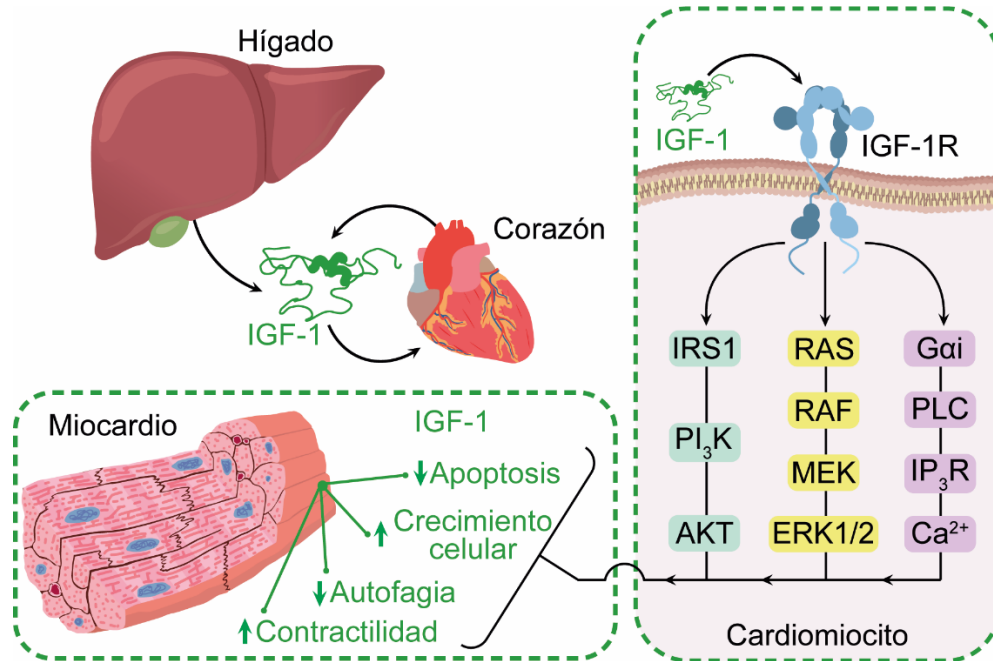


Figura 2. Efectos cardíacos de IGF-1. El corazón es estimulado por IGF-1 proveniente de la circulación, dado principalmente por la secreción hepática y de manera paracrina/autocrina. El panel derecho muestra las vías de señalización canónicas (cuadros verde y amarillo) y no canónica (cuadros lila) gatilladas por el receptor de IGF-1 (IGF-1). El panel inferior resume los principales efectos de IGF-1 a nivel de miocardio. Adaptada de Troncoso y cols.¹⁶ y de Nakamura y cols.¹⁴

En atletas, los niveles proteicos de IGF-1 aumentan en el tejido cardíaco, correlacionando con un incremento en el tamaño y función del corazón.^{27,28} En estudios preclínicos, el papel de IGF-1 en el remodelado cardíaco ha sido estudiado mediante el uso la ganancia o pérdida de función del IGF-1R en modelo murino. Por

una parte, la sobreexpresión corazón-específica del IGF-1R incrementa el tamaño cardíaco en etapas tempranas del desarrollo, correlacionado con un incremento en la fracción de eyección.²⁹ Por otro lado, el silenciamiento inducido corazón-específico de IGF-1R previene la hipertrofia cardíaca producida por el ejercicio físico.³⁰ De manera interesante, en este estudio el tejido cardíaco mostró un aumento basal en la activación de AMPK y en la fosforilación del factor de elongación 2 que inhibe la síntesis proteica, asociado a la disminución en la expresión del coactivador del receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas 1 α (PGC1 α).³⁰ A partir de este trabajo se genera la pregunta de si IGF-1 regularía la función y metabolismo mitocondrial, ya que en ausencia del IGF-1R, el cardiomiocito presenta una activación de vías asociadas a estrés energético, limitando su respuesta frente a las demandas propias del ejercicio.³⁰

El manejo de Ca²⁺ mitocondrial y su papel en la fisiología cardíaca

Para sostener el constante latido del corazón es necesaria la síntesis ininterrumpida de trifosfato de adenosina (ATP), que es utilizado como fuente de energía para la contracción y el bombeo de iones. El cardiomiocito adulto presenta un contenido relativamente bajo de ATP y una alta tasa de hidrólisis, por lo que debe recambiar el total de ATP cada 10 seg.³¹ Debido a esto, es que la mitocondria es uno de los organelos celulares de mayor relevancia en el cardiomiocito, ya que genera más del 90% del ATP requerido.^{32,33} La función mitocondrial está determinada por diversos factores intra y extra-mitocondriales, que además de regular la síntesis de ATP, repercuten en los diversos procesos que tienen lugar en la mitocondria, tales como la biosíntesis de metabolitos, apoptosis y señalización celular.^{32,34} El ion Ca²⁺ juega un

papel central en los mecanismos de señalización intracelular como también intra e inter-organelar, siendo de vital importancia como regulador de los diversos procesos mitocondriales. Balaban y cols.³⁵ propusieron al Ca^{2+} como la principal molécula señalizadora encargada de acoplar los cambios en el trabajo cardíaco (contracción) y el metabolismo mitocondrial, asegurando los niveles de ATP para dicho trabajo. Basado en imágenes de microscopía electrónica,³⁶ y de super-resolución asociado a ensayos de inmunofluorescencia indirecta,³⁷ se ha determinado que la mitocondria del cardiomiocito adulto tiene una relación muy estrecha con el retículo sarcoplasmático, estableciéndose una unión funcional entre ambos organelos. Diversos trabajos han confirmado que en cada ciclo cardíaco hay un traspaso efectivo de Ca^{2+} libre desde el retículo a la mitocondria,³⁸⁻⁴¹ elevando la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) desde 100 nM hasta 1-3 μM dependiendo de la intensidad del estímulo.⁴²

La captación mitocondrial de Ca^{2+} afecta tanto procesos al interior como en la vecindad de la mitocondria. En la matriz mitocondrial el Ca^{2+} tiene un papel regulador del metabolismo oxidativo de la glucosa, modulando indirectamente la actividad del complejo proteico piruvato deshidrogenasa (PDH); regula también la actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y α -cetoglutarato deshidrogenasa (αCGDH) que participan del ciclo del ácido cítrico (Figura 3); y recientemente, se ha observado que estimula la actividad de algunos componentes de la cadena transportadora de electrones y de la ATP sintasa.⁴²⁻⁴⁴ De hecho, la oxidación mitocondrial del piruvato y sus derivados ha mostrado ser fundamental para el crecimiento adaptativo de los cardiomiocitos, ya que su alteración induce por sí mismo un remodelado cardíaco patológico.^{45,46} La $[\text{Ca}^{2+}]_m$ es también determinante como regulador del mecanismo de

apoptosis intrínseca, asociados con la apertura del poro de transición mitocondrial.⁴⁷ Por último, la captación de Ca^{2+} mitocondrial funciona como un verdadero amortiguador de Ca^{2+} citosólico, regulando la amplitud de las señales de Ca^{2+} en la vecindad de la mitocondria, señales que están relacionadas con la activación de diversas vías de señalización a nivel citoplasmático.⁴⁸ Por ejemplo, la incubación de cardiomiocitos aislados con norepinefrina, un estímulo relacionado con la hipertrofia cardiaca patológica, reduce la captación de Ca^{2+} mitocondrial e incrementa los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} .^{49,50} Este ambiente enriquecido en Ca^{2+} permite la activación de Cn, la cual se ha descrito desfosforila a la GTPasa análoga a dinamina 1 o Drp1, fisionando la red mitocondrial, que en conjunto con la menor captación de Ca^{2+} mitocondrial disminuyen el metabolismo oxidativo.⁴⁹ Por otro lado, niveles elevados de Ca^{2+} en el citoplasma también se relacionan con la activación de la vía Ca^{2+} /calmodulina/CAMKII acelerando el remodelado patológico del cardiomiocito.⁵¹ En contraste, la incubación con IGF-1 no afecta la concentración de Ca^{2+} a nivel citosólico,⁵⁰ sugiriendo un manejo diferencial del Ca^{2+} en los diferentes compartimentos celulares en función de la naturaleza del estímulo hipertrófico.

El complejo uniportador de Ca^{2+} mitocondrial como regulador de las características morfo-funcionales de la mitocondria y el cardiomiocito

A pesar de que la captación mitocondrial de Ca^{2+} se describió a inicios de la década de los 60, no fue hasta comienzos de este siglo que fue descubierta la entidad molecular encargada de esta función, denominándose complejo uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCUC).⁵²⁻⁵⁴ En mamíferos, la estructura mínima funcional de este

complejo está conformada por 3 componentes ([Figura 3](#)). El primero y más estudiado es el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), el cual forma un poro o canal altamente selectivo al transporte de Ca^{2+} . MCU es una proteína relativamente pequeña de aproximadamente 40 kDa, conformada por dos dominios transmembrana con un amino y carboxilo-terminal localizados en la matriz mitocondrial.⁵⁵ Ambos segmentos transmembrana están unidos por una cadena aminoacídica corta que conforma el poro de selectividad y permite el bloqueo farmacológico mediado por rojo rutenio (R-R) o rutenio 360 (ru360).⁵⁶ MCU se dispone formando un tetrámero en la membrana interna de la mitocondria.⁵⁵ El segundo componente del complejo es el elemento esencial regulador de MCU (EMRE), una proteína de aproximadamente 10 kDa con un solo dominio transmembrana que le confiere conductividad a MCU y al mismo tiempo regula y estabiliza el mecanismo de compuerta.^{57,58} El tercer y último componente es una compuerta molecular conocida como proteína de captación de Ca^{2+} 1 (MICU1), la cual forma un heterodímero con sus parálogos MICU2 o 3 y se localiza en el espacio intermembrana.⁵⁹ Si bien, en mamíferos MCU y EMRE son necesarias y suficientes para el transporte de Ca^{2+} al interior de la matriz mitocondrial, los heterodímeros formados por MICU1/2 o 1/3 regulan el umbral y la cooperatividad de apertura del canal.^{57,60,61} Por último, otras dos proteínas, no esenciales para el transporte de Ca^{2+} , regulan la conductividad del complejo en condiciones fisiológicas ([Figura 3](#)). La primera es uniportador de Ca^{2+} mitocondrial b (MCUb), descrita como el dominante negativo de MCU, ya que gracias a la homología estructural con MCU (~50%) puede formar parte del poro del complejo, lo que reduce su conductividad y modifica la estequiometría del complejo.⁶² La segunda es la proteína reguladora de MCU 1 (MCUR1), que a pesar de que aún está en duda su interacción física con el complejo,

la evidencia ha mostrado que favorece el ensamblaje de MCUC,⁶³ incrementa su conductividad,⁶⁴ y además regula la apertura del poro de transición mitocondrial frente a una sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz.^{65,66}

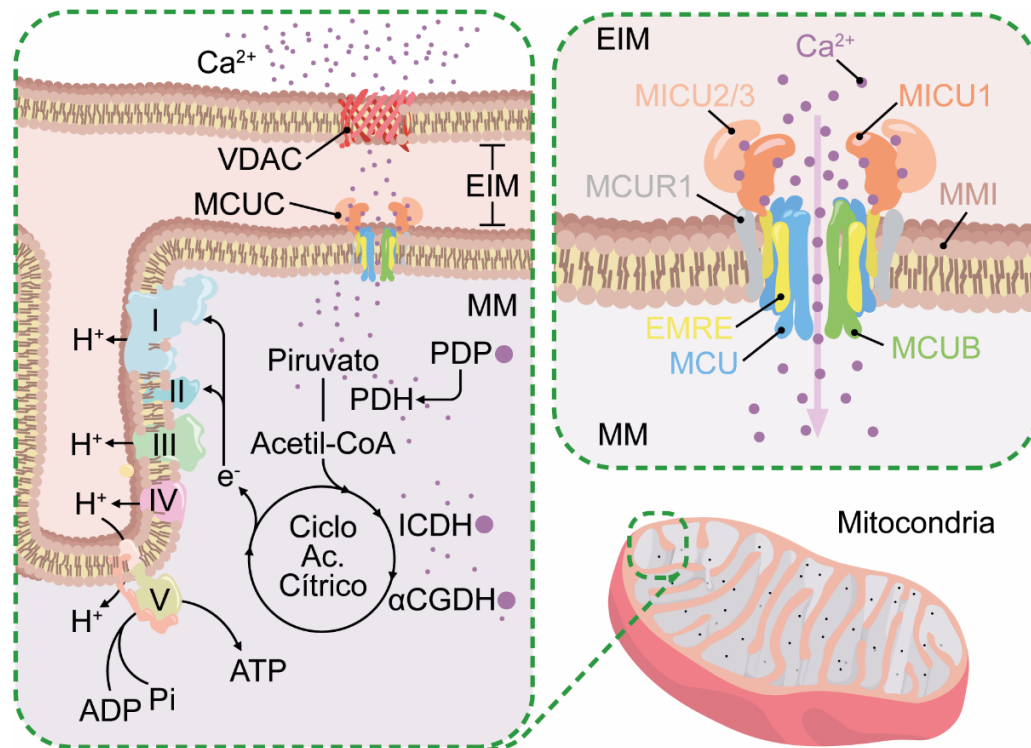


Figura 3. El complejo uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCUC) y el papel del Ca^{2+} en la bioenergética mitocondrial. El panel izquierdo representa un segmento de la doble membrana mitocondrial, en la cual se muestra la ruta del ion Ca^{2+} desde el compartimiento citoplasmático (espacio blanco) hasta la matriz mitocondrial (MM). El ion Ca^{2+} ingresa al espacio intermembrana (EIM) a través del canal aniónico voltaje dependiente (VDAC) y posteriormente a la matriz mitocondrial por medio del complejo uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCUC) insertado en la membrana mitocondrial interna (MMI). En la MM el ion Ca^{2+} regula directamente la función de las enzimas isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y α -cetoglutarato deshidrogenasa (α CGDH), e indirectamente la función de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) por medio de su fosfatasa dependiente de Ca^{2+} (PDP). La mayor actividad del ciclo de ácido cítrico incrementa el flujo de electrones (e^-) a la cadena transportadora de electrones (I-IV) y en consecuencia el bombeo de protones (H^+) al EIM. La ATP sintasa (V) aprovecha el gradiente de H^+ para sintetizar ATP a partir de difosfato de adenosina (ADP) y fosfato inorgánico (Pi). Adaptada de Williams y cols.⁴² En el panel derecho está representado MCUC insertado en la MMI con cada uno de sus componentes proteicos (MCU, MCUB, EMRE, MICU1/2/3 y MCUR1). Adaptada de Mammucari y cols.⁶⁶

La relevancia de MCUC en la función cardíaca se basa principalmente en la premisa de que el Ca^{2+} cumple un papel como molécula señalizadora, que permite ajustar latido a latido el metabolismo mitocondrial frente a cambios en la demanda de energía (ATP).⁶⁷ Partiendo de esta premisa, y conociendo el efecto que tiene el Ca^{2+} sobre las deshidrogenasas mitocondriales, se ha propuesto que la alteración de la función de MCUC afectaría principalmente la regulación en la oxidación de glucosa y por ende la flexibilidad metabólica, imponiendo un déficit energético a nivel celular.⁶⁸ Si bien, diversos estudios en modelos *in vivo* como *ex vivo* han demostrado que MCUC es necesario para la respuesta de lucha o huida dada por la estimulación beta adrenérgica,^{67,69-71} el silenciamiento de MCU o el bloqueo de la captación de Ca^{2+} mitocondrial no genera un déficit energético, manteniendo inalterados los parámetros funcionales y metabólicos del corazón.^{47,67,72} Estos antecedentes muestran el actual desconocimiento del papel que tendría MCUC y el manejo del Ca^{2+} mitocondrial en la fisiología y fisiopatología cardíaca.

Estudios recientes muestran que MCUC tiene un papel fundamental en el desarrollo de la hipertrofia del músculo esquelético, impulsado principalmente por cambios en la función mitocondrial.⁷³⁻⁷⁵ Sin embargo, aún es incierto el papel que tendría MCUC en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Apoyando este punto, Zaglia y cols.⁷⁶ mostraron que los niveles proteicos de MCU incrementan de manera significativa tanto en ratones entrenados físicamente como en modelos de sobrecarga de presión en estadios iniciales, ambas condiciones relacionadas con una hipertrofia adaptativa del corazón.⁷⁶ Por otro lado, se ha observado que en modelos de insuficiencia cardíaca la sobreexpresión de MCU mejora la función cardíaca y reduce parcialmente el remodelado patológico.⁷⁷

En síntesis:

- La hipertrofia cardiaca puede tomar dos caminos uno adaptativo o fisiológico, relacionado con la vía de IGF-1, el control de la homeostasis del Ca^{2+} y el metabolismo celular; y otro mal adaptativo o patológico, relacionado con la sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático y una alteración en la función mitocondrial.
- MCUC regula la captación de Ca^{2+} y la función mitocondrial, impactando directamente en la función de las deshidrogenasas mitocondriales y en la producción de ATP.
- Los niveles proteicos de MCUC y la captación mitocondrial de Ca^{2+} se han correlacionado con el desarrollo de hipertrofia cardiaca adaptativa.

A pesar de estos antecedentes, aún no se ha descrito el papel de MCUC en un modelo de hipertrofia adaptativa inducida por IGF-1 o ejercicio (estímulo conocido por inducir hipertrofia cardiaca fisiológica dependiente de IGF-1). Estudiar estos fenómenos permitirá establecer nuevos blancos que participen en la adaptación cardiaca frente a estímulos fisiológicos, abriendo una nueva ventana terapéutica para el manejo y prevención de las enfermedades cardiovasculares o de la potenciación del ejercicio.

HIPÓTESIS

“IGF-1 estimula la captación de Ca^{2+} mitocondrial mediada por MCUC, incrementando el metabolismo mitocondrial y promoviendo la hipertrofia adaptativa del cardiomiocito”.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el papel de la captación de Ca^{2+} y función mitocondrial en la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por IGF-1.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de IGF-1 sobre la expresión de MCU y/o sus componentes, la captación de Ca^{2+} mitocondrial y la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales dependientes de Ca^{2+} .
2. Describir el efecto de IGF-1 sobre la función mitocondrial (diferencia de potencial de membrana mitocondrial y consumo de oxígeno).
3. Evaluar el papel de la captación de Ca^{2+} mitocondrial sobre la función mitocondrial y el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducidos por IGF-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias pluripotentes humanas (CM-CMEH)

Las células madre embrionarias pluripotentes humanas (HUES9), obtenidas del Instituto de Células Madre en Harvard, se sembraron en placas cubiertas con Geltrex™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) y se mantuvieron en medio TeSR™-E8™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), que fue refrescado cada 24 h. Las células se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% y una humedad ambiental de 100%. La diferenciación a cardiomiocitos se desarrolló de acuerdo con Hoes y cols.⁷⁸ Brevemente, las células HUES9 se disociaron de la placa de cultivo utilizando TrypLE™ (Life Technologies) por 4 min y luego se sembraron como células aisladas en medio TeSR™-E8™ que fue refrescado diariamente. Una vez que el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, se inició el día 0 de la diferenciación. Las células se lavaron con amortiguador fosfato salino (PBS) y el medio se sustituyó por medio RPMI1640 (Life Technologies), suplementado con B-27 1X sin insulina (Life Technologies) y CHIR99021 6 μM (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI EEUU). Al día 2, las células se lavaron con PBS y el medio se reemplazó por RPMI1640 suplementado con B27 1X sin insulina y Wnt-C59 2 μM (Bio-Tech, Minneapolis, MN, EEUU). Desde el día 4, el medio fue reemplazado por medio CDM3, que corresponde a medio RPMI1640 suplementado con albúmina recombinante humana 500 μg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y ácido ascórbico 2 fosfato 213 μg/mL (Sigma-Aldrich) según Burridge y cols.⁷⁹ y refrescado cada dos días como medio de mantención. Aproximadamente el 90% de los cardiomiocitos latían al día 10 de diferenciación. Al día 12 el medio de mantención fue reemplazado por medio CDM3L, que corresponde

al medio CDM3 sin glucosa (Life Technologies), suplementado con lactato 5 mM (Sigma-Aldrich) por 2 a 3 días, para luego ser reemplazado nuevamente por CDM3. Este procedimiento incrementa la pureza del cultivo en aproximadamente un 99%. Al día 20 las células se disociaron con TrypLE™ (Life Technologies) y se sembraron en las placas experimentales en CDM3 suplementado con suero KO 5% (Life Technologies) por un día y luego reemplazado por CDM3. Todos los experimentos se desarrollaron entre los días 27 y 30.

Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas (CMRN)

Los CMRN se obtuvieron a partir de corazones de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. La extracción, aislamiento y cultivo se realizaron de acuerdo a Galvez y cols⁸⁰. Brevemente, las ratas neonatas se decapitaron para posteriormente extraer los corazones y remover las aurículas. Los ventrículos se lavaron en medio Hank's (Sigma-Aldrich) estéril a 37°C y sometidos a una digestión enzimática con colagenasa II 0,2 mg/mL (Gibco BRL, Carlsbad, CA, EEUU) y pancreatina 0,6 mg/mL (Sigma-Aldrich) en medio Hank's. Posteriormente, las células se pre-plaquearon durante 2 h a 37°C para remover los fibroblastos. Las células suspendidas se colectaron y centrifugaron a 1000 rpm por 5 min. El pellet se re-suspendió en medio de mantención (DME:M199, 4:1; Sigma-Aldrich) 5% suero fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y 10% suero de ternera (FCS) (Thermo Fisher Scientific). La concentración celular se determinó a través de

microscopía con azul de tripán en una cámara Neubauer. Las células se sembraron en medio de mantención en presencia de 5-bromo 2'-deoxiuridina (Sigma-Aldrich), en las placas experimentales precubiertas con gelatina (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C, CO₂ al 5% y una humedad ambiental de 95%. Todos los animales se trataron siguiendo las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de experimentación.⁸¹ Además, los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales utilizados formaron parte del protocolo de bioética con código CBE2016-10 del proyecto FONDECYT 1161156 (ver Anexos).

Estímulo hipertrófico con IGF-1

En el caso de los CM-CMEH, las células se estimularon entre los días a 27 al 30 de diferenciación con IGF-1 recombinante humano 10 nM (Thermo Fischer Scientific) en medio CDM3 entre 0 a 48 h. En el caso de los CMRN, 24 h posterior al sembrado, las células se lavaron en PBS e incubaron en medio de mantención sin FBS por 24 h más. Al día siguiente, los cardiomiocitos se estimularon con IGF-1 recombinante humano 10 nM entre 0 a 48 h, donado por el Dr. C. George-Nascimento (Austral Biologicals, San Ramon, CA, EEUU).

Producción lentiviral

Células HEK293T se cultivaron a 37°C, CO₂ al 5% y una humedad ambiental del 95% hasta conseguir una confluencia del 70% en DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado con FCS al 10% (Sigma-Aldrich). Las células se transfectaron con el plásmido de empaquetamiento de VSV-G y un plásmido pLKO.1 que expresa el sensor de Ca²⁺ mitocondrial genéticamente codificado Mitycam (pMOS028), facilitado por el Dr. Adam Cohen (Addgene plasmid #163046). Después de 24 h, el medio fue reemplazado con CDM3 fresco. Después de 48 h, el medio CDM3 contenedor de las partículas virales fue colectado y filtrado con un filtro de jeringa estéril de 0,45 µm. El sobrenadante viral se usó inmediatamente o se congeló en nitrógeno líquido para uso posterior.

Transfección de los cardiomiocitos

Para la transfección del sensor de Ca²⁺ Mitycam, los CM-CMEH se incubaron con el sobrenadante de partículas virales al 40% en medio CDM3 y bromuro de hexadimetrina 8 µg/mL (Sigma-Aldrich) por 24 h. Al día siguiente se reemplazó el medio por CDM3 fresco. Las células se utilizaron al tercer día posterior a la transfección.

Transcripción reversa y PCR cuantitativo en tiempo real

Las células tratadas se lavaron 3 veces con PBS frío y lisadas con TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del mRNA se determinó con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó el kit Quantitect RT (Qiagen N.V., Hilden, Alemania) para la síntesis del ADN complementario de acuerdo con el protocolo de fabricación. Los partidores y los protocolos se utilizaron como se describió previamente.⁵¹ El PCR cuantitativo en tiempo real se llevó a cabo mediante el uso de SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU), utilizando el termociclador CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Lista de partidores:

MCU: sentido 5'-CAC TGT TGT GCC CTC TGA TG-3', anti-sentido 5'-AGG CTT GAG TGT GAA CTG AC-3'.

SMDT1: sentido 5'-CGG GCC TAG CTT GAG GAA AG-3', anti-sentido 5'- AGG CCG AAG GAC ATT TTC ACC-3'.

MICU1: sentido 5'-CTC AAG TCT GGA TTG TGT TC-3', anti-sentido 5'- GGC GTT CAA ACT CAA GCT TC-3'.

MICU2: sentido 5'-TAT GAC ACC ACG AGA CTT CC-3', anti-sentido 5'- GGA TCC CTG ACA GTG TAT CC-3'.

MCUB: sentido 5'- ATA GAC ATG GCC TTC CCT TG-3', anti-sentido 5'- CTC AGC AGT GTG CTC ATT AC-3'.

MCUR1: sentido 5'-CTG GGA GCA GGA AAC TCT AC-3', anti-sentido 5'- CTC CAG GAT CTT GAC CAA TG-3'.

VDAC1: sentido 5'-ATG TGA ATG ACG GGA CAG AG-3', anti-sentido 5'- TGT CCA GGC AAG ATT GAC AG-3'.

Lisado de células y extracción de proteínas

Las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se lisaron con 70 a 80 µL de amortiguador de lisis RIPA complementado con inhibidores de proteasas (Roche, Basilea, Suiza), fosfatasas (Sigma-Aldrich), ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Roche). Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 12.000g por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante el método Bradford (Bio-Rad) o mediante colorimetría utilizando el kit Pierce™ BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific). El contenido proteico se almacenó a -80°C o se trató inmediatamente a 95°C por 5 min en amortiguador de carga de electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, Thermo Fisher Scientific) y luego se almacenó a -20°C.

Electroforesis, electrotransferencia y Western blot de proteínas

La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo por métodos estándares. Brevemente, en SDS-PAGE se cargaron 10 µg de extracto proteico en cada pocillo. Los geles se prepararon al 8%, 10% y 12% dependiendo del experimento. La

electroforesis se realizó a voltaje constante (80 mV) en amortiguador de electroforesis. Posteriormente las proteínas se electro-transferieron a una membrana de di-fluoruro de polivinilideno a 45 mA por 90 min en amortiguador de transferencia. Los anticuerpos primarios se diluyeron en una relación de 1:1000 en solución de bloqueo (amortiguador Tris salino [TBS]-Tween 1% y albumina de suero bovino al 5%) y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Posterior al lavado, las membranas se incubaron por 1 h con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo diluido 1:5000 en solución de bloqueo (Sigma-Aldrich). La detección se realizó por quimioluminiscencia mediante métodos estándares.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MCU (14997S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EEUU); anti-PDHA1 (ab110330, Abcam, Cambridge, Reino Unido); anti-p-PDHE1 α Ser293 (NB110-93479, Novus Biologicals, Minneapolis, MN, EEUU); anti-GAPDH (10r-g109a, Fitzgerald Industries International, Acton, MA, EEUU); anti- α Tubulin (t5168, Sigma Aldrich), anti-mtHSP70 (MA3-028, Thermo Fisher Scientific); anti-Akt (4691, Cell Signaling Technology); anti-pAkt Ser473 (4060, Cell Signaling Technology).

Captación de Ca²⁺ mitocondrial

Para determinar la captación de Ca²⁺ mitocondrial en CM-CMEH, se utilizaron células transfectadas con el sensor de Ca²⁺ mitocondrial codificado genéticamente Mitycam (Addgene plasmid # 163046). Las células se incubaron en medio Tyrode (NaCl 130 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, pH

7,2) y se montaron en un microscopio invertido DeltaVision Elite con control de temperatura a 37°C. Se registró durante 5 min la fluorescencia basal emitida por la sonda Mitycam (espectro de excitación/emisión: 498/515) y luego, se estimuló eléctricamente a una frecuencia de 2 Hz por 7 min en presencia de isoproterenol 10 nM (Sigma-Aldrich).

En el caso de los CMRN, la captación de Ca^{2+} mitocondrial se evaluó mediante el análisis de fluorescencia emitido por el sensor de Ca^{2+} Rhod2-AM (Invitrogen, espectro de excitación/emisión: 575/675) de acuerdo a Maxwell y cols.⁸² Brevemente, las células se incubaron con las sondas Rhod2-AM y Mito tracker™ Green FM (MTG; Invitrogen, espectro de excitación/emisión: 490/516) en medio Tyrode por 30 min. Posteriormente, se permeabilizaron utilizando un medio de permeabilización con saponina (acetato de potasio 100 mM, KCl 15 mM, KH_2PO_4 5 mM, Mg-ATP 5 mM, EGTA 0,35 mM, CaCl_2 0,12 mM, MgCl_2 0,75 mM, fosfocreatina 10 mM, HEPES 10 mM, saponina 0,005%, pH 7,2) por 1 min para reducir la señal citoplasmática. A continuación, el medio de permeabilización se reemplazó por un medio intracelular 0 Ca^{2+} (acetato de potasio 100 mM, KCl 15 mM, EGTA 0,35 mM, MgCl_2 0,75 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2) y se montó en un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 700. Se registró durante 20 seg la fluorescencia basal y posteriormente se reemplazó el medio por un medio interno con una concentración de Ca^{2+} libre 2 μM , calculado con el programa MaxChelator (maxchelator.stanford.edu) y se registró la señal de fluorescencia por un periodo de 100 seg.

En todos los protocolos las imágenes se procesaron y analizaron con el programa de código abierto Fiji.⁸³ Para el análisis de las imágenes se sustrajo de la señal

mitocondrial la señal de ruido obtenida en las áreas libres de células. La señal de fluorescencia emitida por el sensor Mitycam se definió como $1 - (\text{Fluorescencia} / \text{Fluorescencia basal})$ y la señal de Rhod2 se expresó como $\text{Fluorescencia} / \text{fluorescencia basal}$.

Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Los cardiomiocitos se incubaron con la sonda potenciométrica éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE⁺) 20 nM en modo “*non-quenching*” (Invitrogen, espectro de excitación/emisión: 553/577) en medio Tyrode por 30 min y se montaron en el microscopio invertido DeltaVision Elite (CM-CMEH) o confocal Zeiss modelo LSM 700 (CMRN). La fluorescencia basal se registró por ~100/200 seg (CMRN/CM-CMEH) y luego se estimularon con carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) 10 μM hasta alcanzar el valor mínimo de fluorescencia a los ~200/1000 seg (CMRN/CM-CMEH). La señal de ruido obtenida de las regiones libres de células fue sustraída de las regiones de interés con el programa Fiji. La señal de TMRE⁺ se expresó como fluorescencia – valor mínimo de fluorescencia (unidad de fluorescencia relativa, URF).

Determinación de la tasa de consumo de oxígeno (TCO)

Los CM-CMEH se sembraron en pocillos de ensayo Seahorse de 96 pocillos a una densidad de $0,25 \times 10^5$ células/por pocillo al día 20 de diferenciación. Las células se

estimularon con IGF-1 10 nM o IGF-1 10 nM + ru360 10 μ M el día 26 (24 h antes del ensayo). La tasa de consumo de oxígeno se determinó el día 27, por medio de la prueba de estrés mitocondrial programado en un analizador de flujo extracelular Agilent Seahorse XF96 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). 20 min antes del ensayo, el medio CDM3 fue reemplazado por el medio de ensayo XF (Agilent Technologies) suplementado con glucosa 10 mM y piruvato de sodio 1 mM e incubado a 37°C sin control de CO₂. El protocolo de estrés se realizó según Hoes y cols.⁷⁸ Brevemente, se midieron 3 puntos en cada etapa del protocolo, que consta de 1. señal basal; 2. inyección de oligomicina A 2,5 μ M (inhibidor de la ATP sintasa, Sigma-Aldrich); 3. inyección de dinitrofenol 50 μ M (DNP, desacoplante mitocondrial, Sigma-Aldrich); 4. inyección de rotenona 2 μ M (inhibidor del complejo I, Sigma-Aldrich) y antimicina A 4 μ M (inhibidor del complejo III, Sigma-Aldrich). El consumo de oxígeno se normalizó por total de proteína en cada pocillo. La respiración ligada a la síntesis de ATP se calculó a través de la resta entre la respiración basal y la respiración después de la inyección de oligomicina A (TCO etapa 1 – TCO etapa 2). La respiración de reserva se calculó de la resta entre la respiración alcanzada con la inyección de DNP y la respiración basal (TCO etapa 3 – TCO etapa 1). La fuga de protones se calculó de la resta entre la respiración posterior a la inyección de oligomicina A y la respiración posterior a la inyección de rotenona y antimicina A (TCO etapa 2 – TCO etapa 4).

Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó utilizando el kit Real Time-Glo™ MT Cell Viability assay (Promega, Madison, WI, EEUU) según protocolo del fabricante. Brevemente, la enzima NanoLuc® y el sustrato de viabilidad se equilibraron a 37°C y se prepararon a una concentración 1X en medio CDM3 o CDM3 + ru360 10 µM (medios experimentales). Los CM-CMEH se sembraron a una densidad de 25.000 células por pocillo en placas blancas de 96 pocillos con fondo transparente. El medio CDM3 del cultivo se reemplazó por el medio experimental correspondiente. La luminiscencia se determinó a las 0, 1, 3, 6, 24 y 48 h por medio de un lector de placas Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, EEUU). Los datos se corrigieron por el contenido total de proteínas determinado al final del ensayo.

Visualización y análisis de la morfología celular

Los CMRN se sembraron a una densidad de $0,26 \times 10^6$ células por pocillo sobre cubreobjetos cubiertos con gelatina e incubados en medio de mantención. Las células se estimularon por 48 h con IGF-1 10 nM y posteriormente se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 min. Luego los cubreobjetos se incubaron por 1 h con faloidina-rodamina (1:500, Thermo Fisher Scientific) y Hoescht (1:1000, Thermo Fisher Scientific), para visualizar f-actina y núcleos respectivamente. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se montaron en un portaobjeto en medio de montaje DAKO (Agilent Technologies). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal Zeiss modelo LSM 700. El área celular se determinó mediante el

uso del programa Fiji, trazando manualmente el contorno de la célula. Se analizaron entre 50 a 100 células por condición.

Análisis estadístico y visualización de resultados

Los resultados obtenidos se expresaron como promedio \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes. Para los datos de distribución normal y varianzas iguales, se utilizó la prueba t de Student para datos no pareados y ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para aquellos datos de distribución no normal se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para datos no pareados y la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Para la significancia estadística se consideró un valor de $p < 0,05$. Para el análisis de los datos y la construcción de gráficos se utilizó el programa computacional GraphPad Prism 8 (GraphPad Programa Inc, San Diego, CA, EEUU).

RESULTADOS

IGF-1 incrementa la captación y el contenido de Ca^{2+} mitocondrial en cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas (CM-CMEH)

Diversos estudios han mostrado que los estímulos relacionados con la hipertrofia cardiaca patológica, reducen la captación de Ca^{2+} mitocondrial y en consecuencia su función.^{49,50,84–86} Sin embargo, aún se desconoce si los estímulos asociados con el remodelado cardiaco fisiológico – como IGF-1 – generan el efecto inverso. Para abordar esta pregunta, primero confirmamos que los CM-CMEH respondían a IGF-1, observando un incremento significativo en la fosforilación de Akt en todos los puntos de tiempo medidos ([Figura S1A](#)). Posteriormente, se evaluó la captación de Ca^{2+} mitocondrial por medio de la transfección lentiviral del indicador mitocondrial de Ca^{2+} Mitycam, codificado genéticamente en los CM-CMEH estimulados con IGF-1 10 nM por 24 h. En la [Figura 4A](#) se observa que la señal de fluorescencia de Mitycam colocaliza con la señal de la sonda TMRE⁺, la cual presenta una localización preferentemente mitocondrial debido a su carga positiva. Para determinar la captación de Ca^{2+} mitocondrial, se registró la fluorescencia de Mitycam a nivel basal y durante la estimulación de campo eléctrico en presencia de isoproterenol 10 nM (agonista del receptor adrenérgico β_1), esto último con el objetivo de incrementar la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático. Como se muestra en la [Figura 4B](#), la señal de Mitycam redujo su intensidad al incrementar su asociación con Ca^{2+} libre en la matriz mitocondrial. En el gráfico de la [Figura 4C](#) se observa la cinética de la señal de fluorescencia de Mitycam, donde se muestra claramente que IGF-1 10 nM incrementó de manera significativa la captación mitocondrial de Ca^{2+} , observado en el incremento en la amplitud ([Figura 4D, panel derecho](#)) de la señal al final del protocolo de

estimulación eléctrica ($1,57 \pm 0,39$ veces la condición control). Este resultado sugiere que IGF-1, por un mecanismo desconocido, regula la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en los CM-CMEH.

El Ca^{2+} ha sido propuesto como un fino sintonizador de la actividad mitocondrial como respuesta a cambios en la demanda energética de la célula.⁴³ Este ion divalente regula directa e indirectamente la actividad de algunas deshidrogenasas que alimentan o participan del ciclo de ácido cítrico.⁸⁷ PDH es una de ellas y su actividad es modulada de manera indirecta por la $[\text{Ca}^{2+}]_m$. La fosfatasa de PDH (PDP1) es activada directamente por Ca^{2+} y desfosforila el residuo serina 293 de PDH, incrementando su función.⁸⁸ La incubación con IGF-1 redujo la fosforilación de PDH de manera significativa (~43% y ~41% a las 6 y 24 h de incubación, respectivamente), lo que sugiere una mayor activación de PDH e indirectamente un mayor contenido de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (Figura 4E).

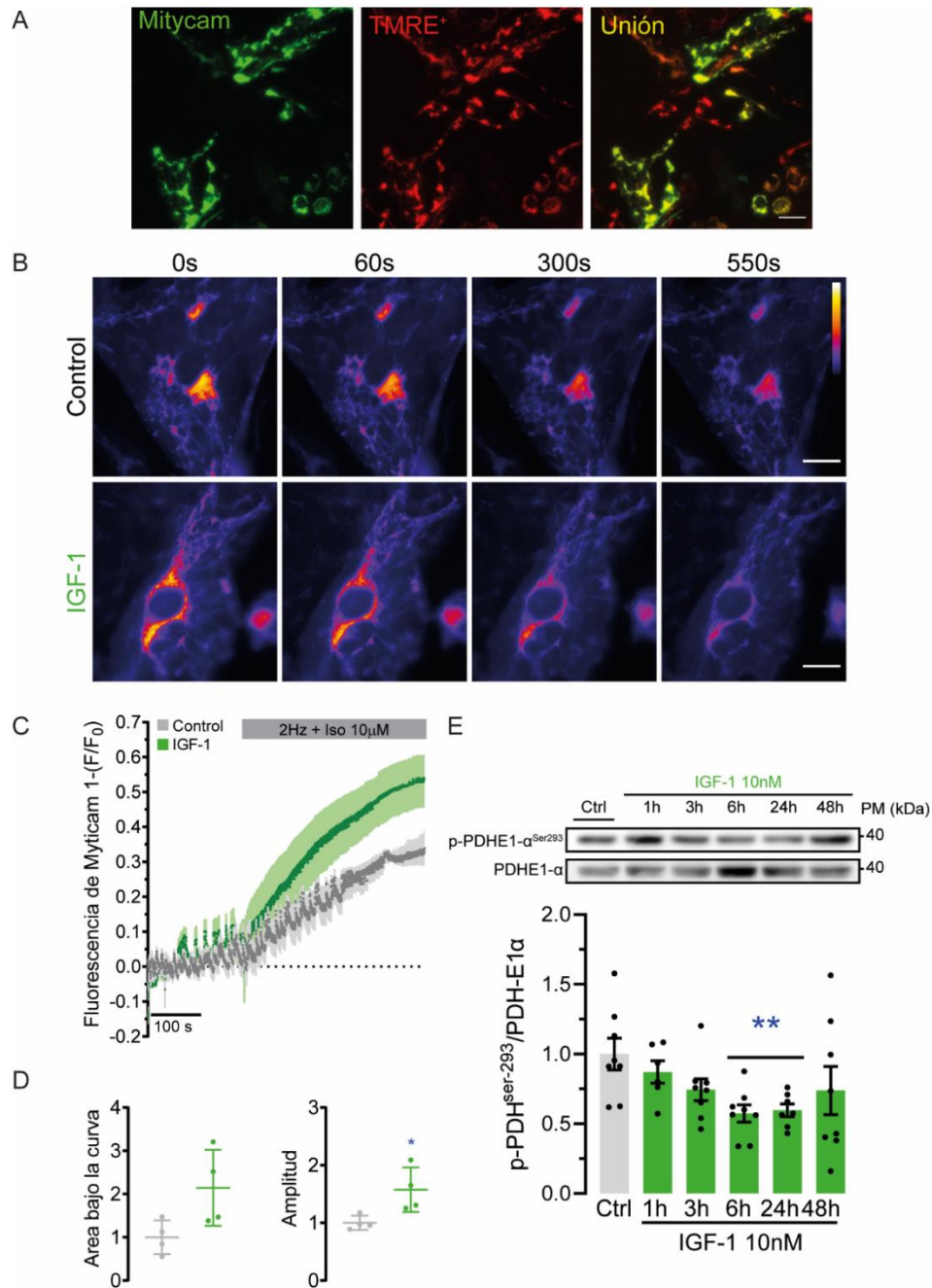


Figura 4. IGF-1 incrementa la captación y el contenido de Ca²⁺ mitocondrial en CM-CMEH. (A) Patrón de fluorescencia de TMRE⁺ y Mitycam en CM-CMEH. Barra de calibración: 10 μ m (B) Imágenes representativas de la fluorescencia de Mitycam registradas por 550 seg en CM-CMEH, tratados con IGF-1 10 nM por 24 h y expuestas a estimulación de campo eléctrico e isoproterenol (Iso) 10 μ M. (n = 3 – 6). Barra de calibración: 20 μ m. (C) Cinética de la fluorescencia de Mitycam. (D) Área bajo la curva y máxima fluorescencia (amplitud) registrada en C para cada condición (n = 4). (E) Western blot representativo de la fosforilación de PDH en células estimuladas con IGF-1 10 nM entre 1 a 48 h (n = 7-8). * p < 0,05 vs control ** p < 0,01 vs control.

IGF-1 modifica la expresión de MICU1, MCUR1 de MCUC e incrementa la diferencia de potencial de membrana mitocondrial.

En mamíferos, la principal vía de entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial es el complejo proteico MCUC, y su regulación está dada en gran parte por los niveles de expresión del poro del complejo (MCU) o de sus subunidades regulatorias (MCUB, MICU1/2/3, EMRE y MCUR1).⁸⁹ Teniendo en cuenta el efecto potenciador de IGF-1 sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial decidimos analizar la expresión de MCU en los CM-CMEH estimulados con IGF-1 10 nM. IGF-1 no modificó los niveles relativos de mRNA (Figura 5A) ni de la proteína de MCU (Figura 5B) a ninguno de los tiempos ensayados. A continuación, evaluamos los niveles relativos de mRNAs de las demás subunidades del complejo MCUC en busca de una regulación funcional del complejo y también de canal aniónico dependiente de voltaje VDAC, que permite el paso de Ca^{2+} desde el citosol al espacio intermembrana. IGF-1 redujo significativamente los niveles de mRNA de MICU1 a las 24 y 48 h ($0,59 \pm 0,05$ y $0,61 \pm 0,04$ veces la condición control respectivamente) e incrementó los de MCUR1 a las 6 h ($1,41 \pm 0,10$ veces la condición control) (Figura 5C). Ambos cambios se relacionan con un incremento en el transporte de Ca^{2+} mitocondrial, corroborando lo observado en el resultado anterior. La expresión de las otras subunidades y de VDAC se mantuvieron estables en todos los tiempos medidos.

La diferencia de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mt}}$) – que en condiciones fisiológicas es alrededor de -180 mV – es la principal fuerza que impulsa a los iones Ca^{2+} a ingresar a la matriz mitocondrial a través de MCUC.^{90,91} Cualquier cambio en la $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ podría influir en la velocidad y capacidad de la mitocondria para captar Ca^{2+} . Por

esta razón, se evaluó la $\Delta\Psi_{mt}$ basal a través de microscopia de fluorescencia, utilizando la sonda potenciométrica TMRE⁺ descrita en los párrafos anteriores, y de esta manera determinar si el incremento en la captación de Ca²⁺ mitocondrial promovida por IGF-1 están relacionados a cambios en la $\Delta\Psi_{mt}$. La imagen de epifluorescencia representativa de TMRE⁺ observada en la [Figura 5D](#), muestra claramente que IGF-1 incrementó la $\Delta\Psi_{mt}$ basal comparado con las células no estimuladas ($1,50 \pm 0,31$ veces la condición control).

En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento en la captación de Ca²⁺ mitocondrial se explicaría por dos factores: el primero, asociado a cambios funcionales de MCUC, debido a la modificación de la expresión de sus subunidades regulatorias (MICU1 y MCUR1); y segundo, por aumentos en la $\Delta\Psi_{mt}$, la principal fuerza motriz que tiene el Ca²⁺ para entrar a la mitocondria.

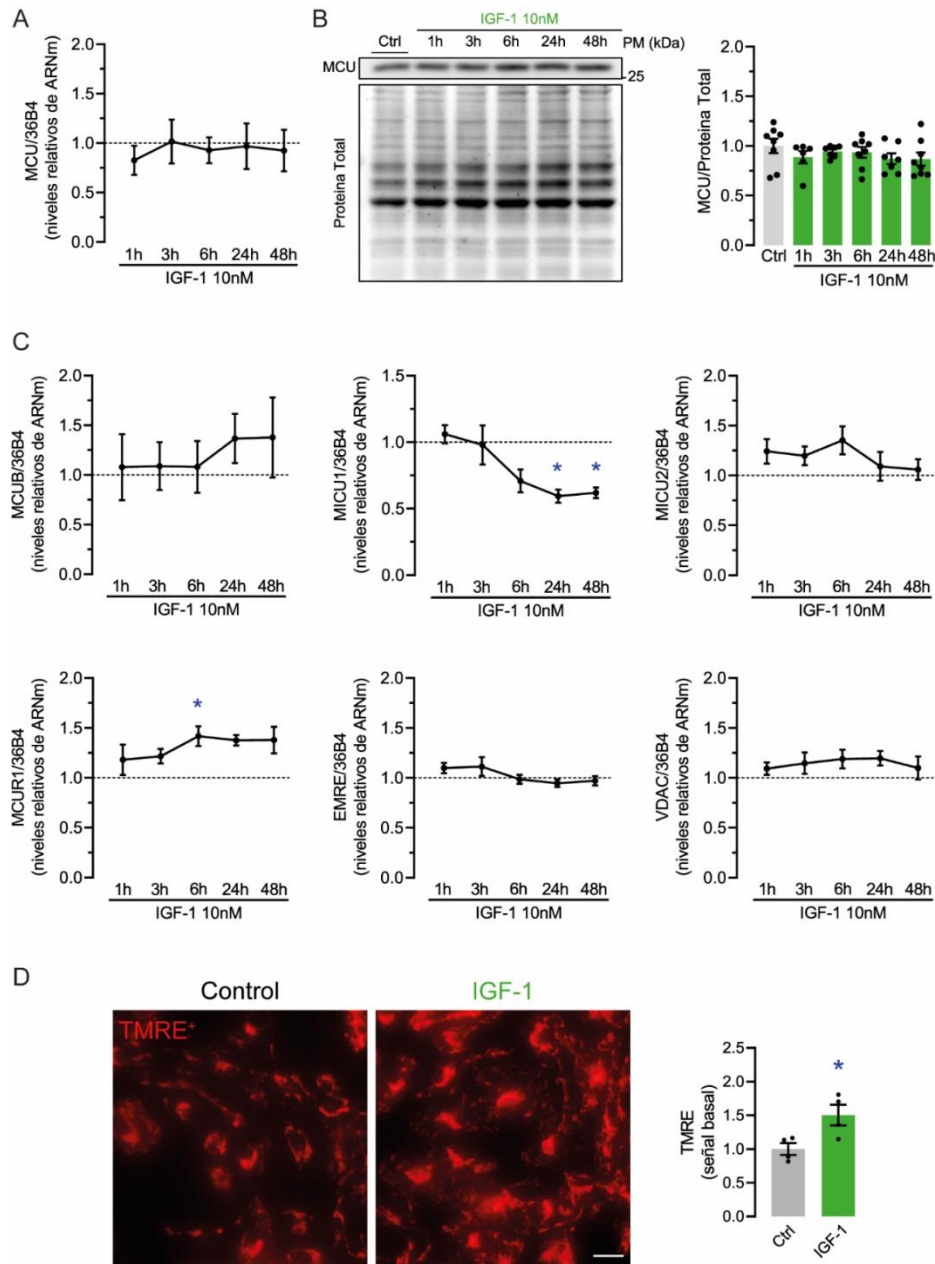


Figura 5. Efecto de IGF-1 sobre expresión de los componentes de MCUC y el potencial de membrana mitocondrial en CM-CMEH. (A) Niveles relativos de mRNA de MCU. (B) Western blot y cuantificación de los niveles relativos de la proteína MCU (n = 6 – 8); (C) Niveles relativos de mRNAs de los elementos reguladores de MCUC (MCUB, SMDT1, MICU1, MICU2, MCUR1) y VDAC1 en CM-CMEH estimulados con IGF-1 (10 nM entre 1-48 h, n = 6-8). Línea entrecortada indica los niveles de mRNAs de la condición control sin estimulación; (D) Niveles relativos de la señal basal de TMRE⁺ y posterior a la despolarización mitocondrial con FCCP 10 μ M en células control o estimuladas con IGF-1 10 nM por 24 h (n = 4). *p < 0,05 vs control. Barra de calibración: 10 μ m.

IGF-1 incrementa el consumo de oxígeno de los cardiomiocitos por un mecanismo dependiente de la captación de Ca^{2+} mitocondrial

El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ incrementa la producción de NADH, el flujo de electrones a través de la cadena transportadora de electrones y en consecuencia incrementa el consumo de oxígeno y la producción de ATP.^{44,70} Basado en esta premisa, se evaluó el efecto de IGF-1 (10 nM por 24 h) sobre la tasa de consumo de oxígeno, utilizando un analizador de flujo metabólico Seahorse Agilent. La [Figura 6A-B](#) muestra que IGF-1 incrementó la respiración basal ($1,37 \pm 0,10$), ligada a ATP ($1,45 \pm 0,14$), máxima ($1,29 \pm 0,09$) y la fuga de protones ($1,71 \pm 0,12$) en comparación con la condición control. Para confirmar si el Ca^{2+} estaría jugando un papel relevante en el incremento del consumo de oxígeno mediado por IGF-1, los CM-CMEH se coincubaron con el inhibidor específico de MCUC, ru360 y se evaluó nuevamente el consumo de oxígeno en estas condiciones. La inhibición de la captación de Ca^{2+} mitocondrial con ru360 previno todos los cambios en la respiración mitocondrial inducidos por IGF-1, mostrando valores equiparables a la condición control ([Figura 6A-B](#)), con excepción de la fuga de protones que se mantuvo elevada ($1,48 \pm 0,15$ veces la condición control). Es importante remarcar que, en todos los tiempos evaluados, ru360 no redujo la viabilidad celular ([Figura S3](#)). En conjunto, nuestros resultados muestran que la captación de Ca^{2+} es necesaria para el incremento en el consumo de oxígeno inducida por IGF-1.

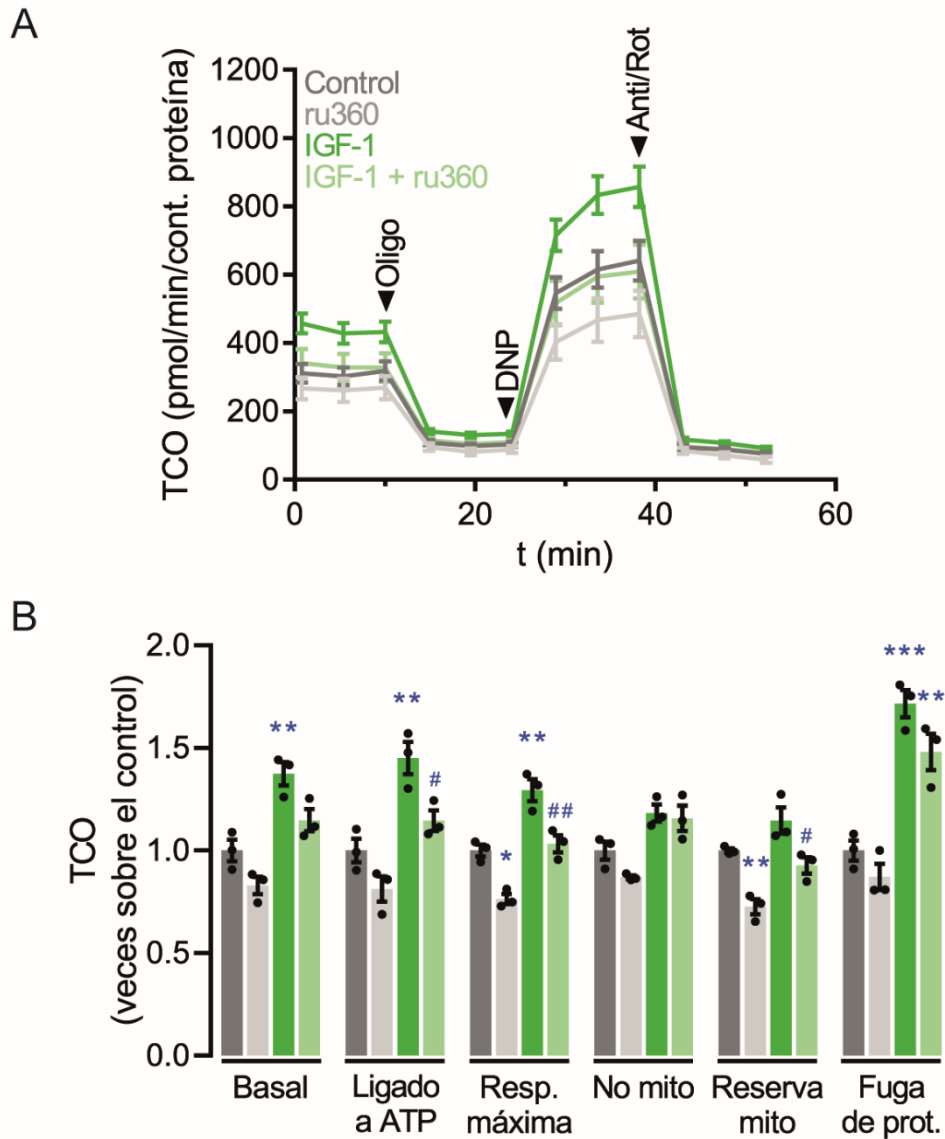


Figura 6. IGF-1 incrementa la respiración mitocondrial por un mecanismo dependiente de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. (A) Cinética representativa de la tasa de consumo de oxígeno (TCO) en CM-CMEH estimuladas con IGF-1 10 nM por 24 h, incluyendo condiciones tratadas con ru360 10 μM (inhibidor de MCUC). (B) Cuantificación de los cambios relativos en la respiración basal, ligada a ATP, máxima, no mitocondrial, de reserva y fuga de protones en comparación a la condición control. (n = 3) * p < 0,05 vs control; ** p < 0,01 vs control *** p < 0,001 vs control; # p < 0,05 vs condición con IGF-1.

IGF-1 incrementa la captación de Ca²⁺ mitocondrial en CMRN

La hipertrofia mediada por IGF-1 ha sido largamente estudiada en modelos de CMRN.^{22,50,92} Este modelo celular permite determinar los efectos de IGF-1 sobre el tamaño celular, debido a que pueden ser sembradas aisladamente, y por lo tanto analizadas como célula única; no así los CM-CMEH, que deben ser sembrados a una confluencia cercana al 100% para asegurar la viabilidad del cultivo. Debido a las limitaciones técnicas del uso de CM-CMEH, se utilizó el modelo de CMRN para confirmar si IGF-1 tenía efectos similares sobre el manejo del Ca²⁺ mitocondrial y en experimentos futuros determinar su relación con la hipertrofia celular. En primer lugar, confirmamos que IGF-1 fosforila a Akt e induce hipertrofia en este modelo ([Figuras S1 B y S2](#)). Luego se determinaron los cambios relativos de Ca²⁺ en la matriz mitocondrial por medio de la sonda fluorescente de Ca²⁺ Rhod2-AM, en presencia de IGF-1 10 nM por 24 h. Las células se coincubaron con el marcador fluorescente mitocondrial MTG, para confirmar que la señal de Rhod2 provenía de la mitocondria y posteriormente permeabilizadas, para reducir la señal citoplasmática de Rhod2 ([Figura 7A](#)). Los cardiomiocitos tratados con IGF-1 mejoraron significativamente su capacidad para captar Ca²⁺ frente a un pulso de Ca²⁺ 2 μ M ([Figura 7B-C](#)), incrementando en un 86 ± 13 y $94 \pm 15\%$ la fluorescencia máxima y el área bajo la curva respectivamente, en comparación con las células no estimuladas ([Figura 7D](#)). Para confirmar que la captación de Ca²⁺ es mediada por MCUC, bloqueamos farmacológicamente a MCU con R-R 10 μ M, previniendo la captación de Ca²⁺ observada previamente ([Figura 7C-D](#)). De igual manera que en los CM-CMEH, IGF-1 también redujo de manera significativa la fosforilación de PDH ($0,55 \pm 0,04$ veces la condición control)

(Figura 7E). Finalmente, se determinaron los niveles proteicos de MCU (Figura 8A) y la $\Delta\Psi_{mt}$ (Figura 8B) en CMRN estimulados con IGF-1 10 nM por 24 h. Similarmente a los CM-CMEH, no se observaron diferencias significativas en los niveles proteicos de MCU en comparación a las células control. Por otro lado, al contrario de los CM-CMEH, no hubo cambios en la $\Delta\Psi_{mt}$. Estos resultados muestran que IGF-1 promueve efectos similares en la captación Ca^{2+} mitocondrial y la fosforilación de PDH en ambos modelos celulares, sugiriendo que la vía de señalización gatillada por IGF-1 promueve mecanismos conservados en ambas especies.

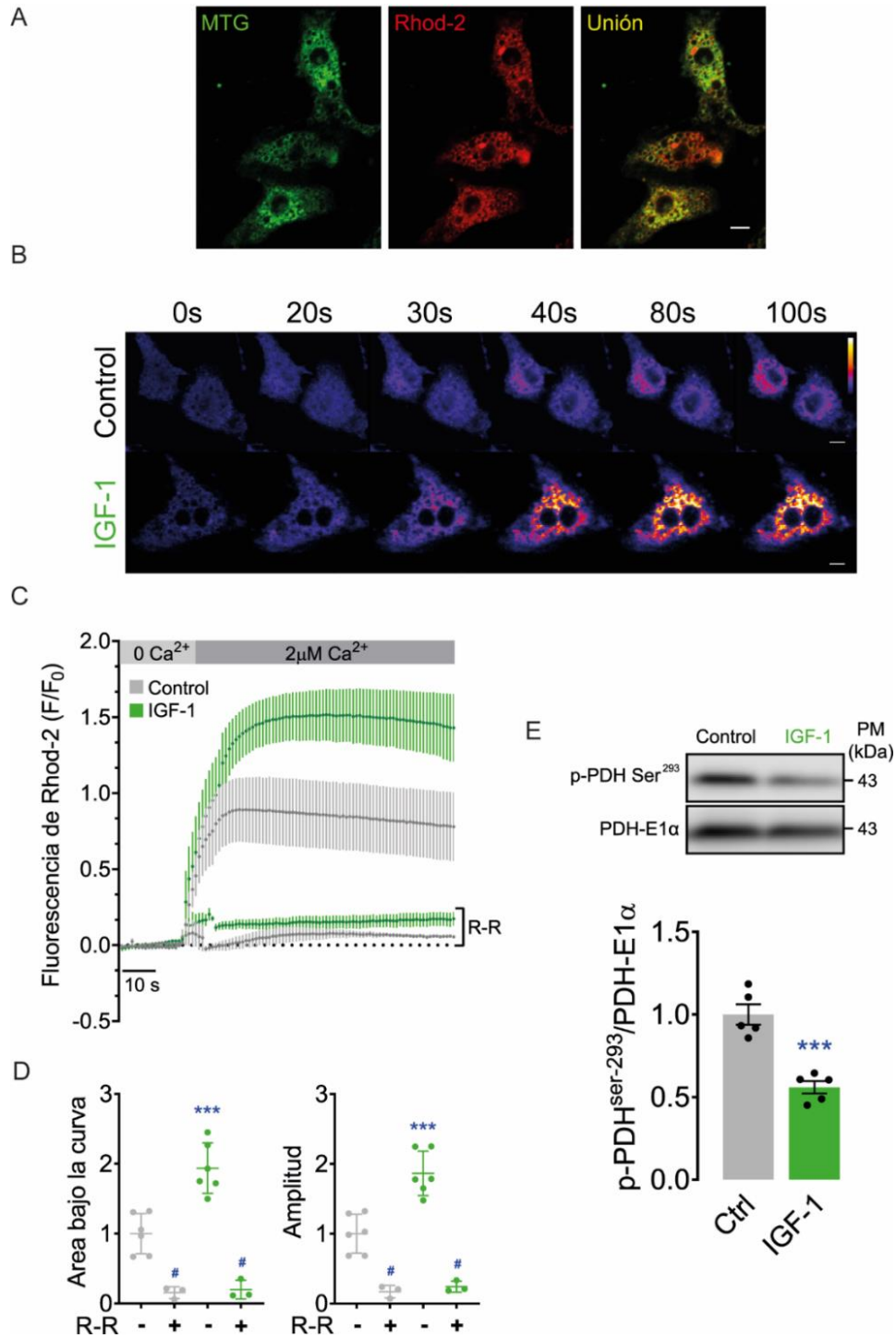


Figura 7. IGF-1 incrementa la captación y contenido de Ca^{2+} mitocondrial en CMRN. (A) Patrón de fluorescencia de Rhod-2 y MitoTracker green (MTG) en CMRN permeabilizados. (B) Imágenes confocales representativas de la fluorescencia de Rhod-2 registradas por 100 seg en CMRN permeabilizados, tratados con IGF-1 (10 nM por 24 h) y expuestas a un pulso de Ca^{2+} 2 μM a los 20 seg ($n = 3-6$). (C) Cinética representativa de la razón de fluorescencia de Rhod-2 obtenido en B, incluyendo

condiciones tratados con el inhibidor de MCU Rojo Rutenio (R-R) 5 μ M. **(D)** Área bajo la curva y máxima fluorescencia (amplitud) registrada en C para cada condición. **(E)** Western blot representativo y cuantificación de la fosforilación de PDH en células estimuladas con IGF-1 10 nM por 24 h (panel derecho) (n = 6). *** p < 0,001 vs control; # p < 0,05 vs condición sin R-R. Barra de calibración: 10 μ m.

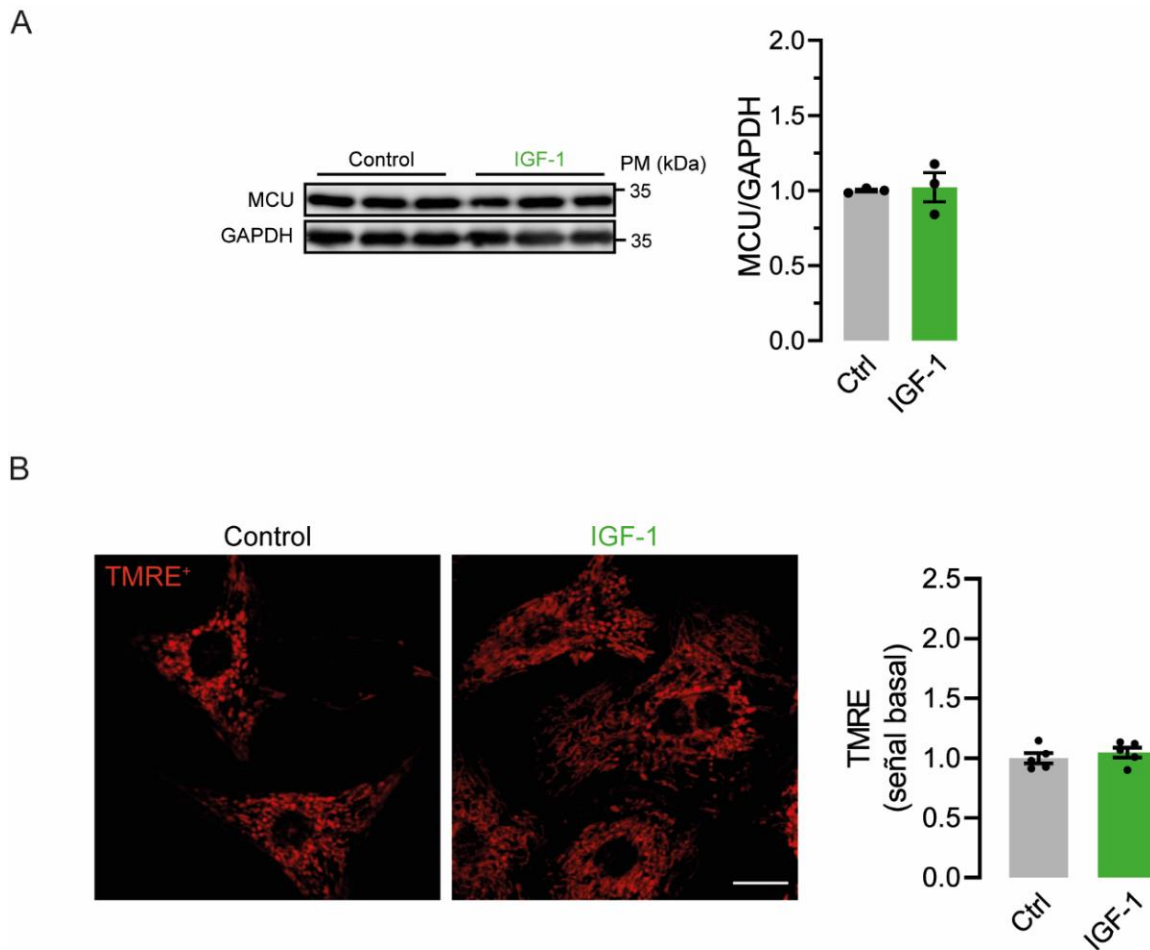


Figura 8. Efecto de IGF-1 en los niveles proteicos de MCU y la $\Delta\Psi_{mt}$. **(A)** Western blot representativo y cuantificación de los niveles proteicos de MCU en CMRN tratados con IGF-1 10 nM por 24 h (n = 3). **(B)** Imagen confocal representativa de la fluorescencia promedio de TMRE⁺ y cuantificación de la señal en cardiomiocitos (n = 5). Barra de calibración: 10 μ m

DISCUSIÓN

IGF-1 incrementa la captación mitocondrial Ca^{2+} y reduce la fosforilación de PDH

Numerosos trabajos muestran que la conservación de la función mitocondrial y la flexibilidad metabólica, son características propias del crecimiento adaptativo de los cardiomiocitos en condiciones saludables (hipertrofia cardiaca fisiológica);^{11,93} y que su alteración, es un signo temprano que precede a los cambios morfológicos que ocurren en condiciones patológicas (hipertrofia cardiaca patológica).¹² La regulación del metabolismo mitocondrial es un proceso complejo y multifactorial que depende tanto de factores externos (disponibilidad y uso de sustratos metabólicos; transporte y uso de ATP) como intra-mitocondriales (función enzimática; fosforilación oxidativa).¹³ Balaban y cols.³⁵ y Denton y cols.⁸⁷ propusieron que el Ca^{2+} liberado por el retículo sarcoplasmático modulaba la actividad de diversas deshidrogenasas mitocondriales, lo que permite regular la producción de ATP y adaptar la función mitocondrial a las nuevas demandas metabólicas del tejido cardiaco. Nuestros resultados permiten también sugerir que este mecanismo es necesario para el crecimiento cardiaco adaptativo y fisiológico gatillado por IGF-1. Respaldando esta idea, observamos que la estimulación con IGF-1 (10 nM por 24 h) incrementó en ambos modelos celulares – CM-CMEH y CMRN – la capacidad mitocondrial para captar Ca^{2+} , sugiriendo que el manejo de Ca^{2+} mitocondrial es un proceso regulado río abajo de la cascada de señalización inducida por IGF-1 (Figuras 4 y 7).

La relación que tiene IGF-1 con las dinámicas de Ca^{2+} intracelulares no es algo desconocido. Estudios previos han descrito que la estimulación aguda con IGF-1 produce señales de Ca^{2+} citoplasmáticas y nucleares, relacionadas con la activación de quinasas y factores de transcripción necesarias para el remodelado adaptativo.²⁴⁻

²⁶ También se ha descrito que estos transitorios de Ca^{2+} se relacionan con incrementos en la contractilidad y sensibilidad a Ca^{2+} de los miofilamentos.^{94,95} Sin embargo, la evidencia de los efectos crónicos que tiene IGF-1 sobre el manejo de Ca^{2+} mitocondrial es muy escasa. Por ejemplo, Gutiérrez y cols.⁵⁰ mostraron que las mitocondrias de cardiomiocitos estimulados con IGF-1 100 nM por 24 h, sufrían una ligera tendencia a captar más Ca^{2+} sin alcanzar significancia estadística, lo cual contrasta con nuestros datos. En este caso, los autores utilizaron una concentración de IGF-1 10 veces más alta y evaluaron los niveles de Ca^{2+} con una sonda química que presenta una señal de ruido (no mitocondrial) considerable; además, estimularon la liberación de Ca^{2+} con insulina, la cual activa preferentemente a los receptores de IP_3 . En nuestro caso y para reducir estas limitaciones, se indujo la liberación de Ca^{2+} a través del receptor de ryanodina, por medio de la estimulación de campo eléctrico, estimando directamente los niveles de Ca^{2+} mitocondrial a través de la sonda Mitycam codificada genéticamente en los CM-CMEH (Figura 4B). Esta aproximación metodológica permitió evaluar al cardiomiocito en un contexto más cercano al fisiológico. En el caso de los CMRN, las células se permeabilizaron para reducir la señal no mitocondrial de la sonda química Rhod2 y exponer a las mitocondrias a la misma concentración de Ca^{2+} (2 μM) en las diferentes condiciones estudiadas, detectando *in situ* la capacidad de la mitocondria para captar Ca^{2+} (Figura 7B).

El incremento del contenido de Ca^{2+} mitocondrial potencia de manera directa la actividad de ICDH y αCGDH relacionadas con el ciclo de ácido cítrico, e indirectamente la de PDH, mediante su estado de fosforilación.⁴² Tal como se mencionó en la introducción de este trabajo, la desfosforilación (activación) de PDH es promovida por

incrementos en $[Ca^{2+}]_m$. En nuestras manos, IGF-1 redujo el estado de fosforilación de la subunidad E1 α del complejo PDH en ambos modelos celulares (Figuras 4D y 7E), reforzando la idea de que IGF-1 incrementa el metabolismo mitocondrial por un mecanismo Ca^{2+} -dependiente. A pesar de estos resultados, debemos ser cautelosos en este punto, ya que la actividad de PDH no solo depende de su desfosforilación, también depende de su fosforilación, proceso que es independiente de los niveles de Ca^{2+} . La quinasa de PDH (PDK4, isoforma dominante en el tejido cardiaco) fosforila el residuo serina 293 de la subunidad E1 α del complejo PDH, reduciendo su actividad.⁸⁹ Por lo tanto, análisis futuros de la actividad y expresión de PDK4 permitirán determinar con mayor exactitud el mecanismo por el cual IGF-1 incrementa la función de PDH. Es importante destacar que niveles reducidos de PDH fosforilada no solo sugiere un mayor contenido de Ca^{2+} en la matriz, también entrega información relevante de la capacidad oxidativa del piruvato en estas células. Varios estudios han mostrado que el bloqueo o el silenciamiento de MCUC reduce significativamente la actividad de PDH, incrementa su fosforilación e incluso altera la flexibilidad metabólica de las células musculares.^{69,74,96,97} La función deficiente de PDH también se ha relacionado con el desarrollo de hipertrofia cardiaca patológica. Por ejemplo, en modelos de insuficiencia cardiaca PDH incrementa su estado de fosforilación, pero al inhibir farmacológicamente a PDK4 incrementa la actividad de PDH, se reduce la hipertrofia y la dilatación ventricular y consecuentemente mejora la capacidad contráctil.⁹⁸ Por otro lado, la delección cardio-específica de PDH establece un estado de hipertrofia cardiaca dilatada con disfunción diastólica, confirmando la importancia de este complejo en la homeostasis energética y su relación con el remodelado cardiaco.⁴⁶

Algo similar ocurre en los ratones con deficiencia de ICDH, los cuales desarrollan hipertrofia cardíaca dilatada y disfunción mitocondrial.⁹⁹ En conclusión, nuestros datos y la evidencia refuerzan la idea de que el Ca^{2+} mitocondrial y la actividad de las deshidrogenasas dependientes de Ca^{2+} son factores esenciales para una función metabólica normal y que, por lo tanto, permitirán el crecimiento adaptativo de las células cardíacas.

IGF-1 modifica la expresión de los elementos regulatorios de MCUC

La captación de Ca^{2+} mitocondrial puede verse afectada por diversos factores. Entre ellos están los asociados al contenido y/o función de MCUC. Debido a estos factores, cualquier cambio en los niveles proteicos de cualquiera de los componentes de complejo podría afectar la conductancia de este canal.^{60,100,101} Además, están también los relacionados al gradiente electro-químico necesarios para el transporte de Ca^{2+} , el cual está determinado principalmente por la $\Delta\Psi_{\text{mt}}$.⁴⁴ Por último, están los factores asociados al tamaño y localización de las mitocondrias. Esto quiere decir que mitocondrias más grandes tienen una mayor capacidad de captar Ca^{2+} ,¹⁰² pero también su cercanía a la fuente de Ca^{2+} , dado principalmente por los contactos retículo-mitocondria.^{50,103} Basado en las diferentes hipótesis propuestas y en la evidencia disponible, decidimos evaluar los niveles proteicos de MCU y los niveles de mRNAs de los componentes del complejo, así como también la $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ basal. Por otro lado, relacionado a la localización mitocondrial, Gutiérrez y cols.¹⁰⁴ mostraron que IGF-1 no modifica la distancia entre retículo y mitocondria en los CMRN.

Los presentes resultados muestran que IGF-1 no modifica los niveles de MCU en ninguno de los modelos celulares utilizados; y solo incrementa la $\Delta\Psi_{mt}$ en los CM-CMEH pero no en los CMRN. Si bien, en ambos modelos celulares se midió la $\Delta\Psi_{mt}$ basal a las 24 h de incubación con IGF-1, la velocidad de respuesta podría ser dependiente del modelo celular. Por lo tanto, no se puede descartar que los cambios en la $\Delta\Psi_{mt}$ estén ocurriendo en escalas temporales distintas. Experimentos futuros permitirán evaluar la $\Delta\Psi_{mt}$ a diferentes tiempos y determinar si tiene un papel relevante en el efecto sobre la captación mitocondrial de Ca^{2+} mediada por IGF-1. Al analizar la expresión de los demás elementos regulatorios de MCUC, se detectó una reducción significativa del mRNA de MICU1 en los CM-CMEH desde las 24 h de exposición con IGF-1 y un incremento en el mRNA de MCUR1 solo a las 6 h. MICU1 a bajas $[Ca^{2+}]$ citosólicas ($< \sim 1,3 \mu M$) bloquea a MCU; y por medio de su interacción con MICU2, incrementa el umbral de apertura y reduce la afinidad relativa de MCUC por Ca^{2+} .⁶⁰ Debido a que la inserción de MICU2 en el complejo depende de su interacción directa con MICU1, la reducción de MICU1 también impactará en la estabilidad de MICU2,¹⁰⁵ y por lo tanto, las células expuestas a IGF-1 tendrán un umbral de apertura más bajo y una mayor afinidad por Ca^{2+} , lo que incrementa el contenido basal de Ca^{2+} en la matriz.⁶⁰ MCUR1 por otro lado, afecta directamente la función de MCUC debido a su interacción con el complejo, favoreciendo su ensamblaje y conductividad.⁶³ Sin embargo, otros autores también postulan que el efecto estaría mediado de manera indirecta por un incremento en la $\Delta\Psi_{mt}$, debido a la regulación que tendría MCUR1 en el ensamblaje del complejo citocromo C oxidasa (complejo IV de la cadena transportadora de electrones).¹⁰⁶ En el caso de los CM-CMEH, ambos mecanismos

podrían estar relacionados, ya que coincidentemente, tanto la $\Delta\Psi_{mt}$ como los niveles de expresión de MCUR1 están elevados en presencia de IGF-1.

Hasta el momento, no se ha indagado experimentalmente en el mecanismo por el cual IGF-1 podría reducir la expresión de MICU1 o aumentar la de MCUR1. No obstante, en el último tiempo han proliferado numerosos artículos acerca de los mecanismos encargados de regular la función y expresión de los distintos elementos de MCUC. Un estudio reciente mostró que la inhibición de la oxidación de piruvato y ácidos grasos en la mitocondria incrementa la expresión de MICU1, por un mecanismo dependiente del factor de transcripción proteína de respuesta de crecimiento temprano 1 (ERG1), limitando la captación de Ca^{2+} en cardiomiocitos y hepatocitos.¹⁰⁷ En nuestro caso, IGF-1 podría estar inhibiendo directamente la actividad de ERG1 y por ende la expresión de MICU1; o de manera indirecta, incrementando la oxidación de sustratos en la mitocondria, lo que sería un estímulo inhibitorio para la actividad de ERG1 y, en consecuencia, reduciría la expresión de MICU1. Por otro lado, la regulación de la expresión de MICU1 también se ha relacionado con la activación del factor transcripcional proteína de especificidad 1 o SP1. Este factor transcripcional disminuye su expresión y por consiguiente la de MICU1 en modelos *in vivo* en ratones ob/ob.¹⁰⁰ De manera interesante, este modelo se caracteriza por tener niveles sanguíneos de insulina elevados, hormona que al igual que IGF-1 activa la vía PI3K/Akt a nivel cardíaco.¹⁰⁸ Recientemente, se ha descrito que la fosforilación de MICU1 por Akt afecta su maduración y desestabiliza la formación de los dímeros MICU1/2. Esto incrementa la degradación del MICU1 e indirectamente la de MICU2, induciendo una mayor captación mitocondrial de Ca^{2+} en células cancerígenas.¹⁰⁵ Si bien nuestros resultados

muestran un posible mecanismo que explique el incremento de la captación de Ca^{2+} inducida por IGF-1, es necesario confirmar que los cambios a nivel de mRNAs se vean reflejados en los niveles proteicos de MICU1 y MCUR1 en ambos modelos celulares. Además, queda establecer el papel que tienen estos cambios en la función mitocondrial y el crecimiento celular inducido por IGF-1.

IGF-1 incrementa el consumo de oxígeno de los cardiomiocitos por un mecanismo dependiente de la captación mitocondrial de Ca^{2+}

En cardiomiocitos adultos, el Ca^{2+} mitocondrial juega un papel fundamental en situaciones de alta demanda energética. Esto quedó al descubierto en un estudio realizado por Wescott y cols.⁴⁴ en el cual elegantemente mostraron que el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ es necesario y suficiente para mantener la $\Delta\Psi_{mt}$ y la producción de ATP cuando, de manera exógena, se incrementan los niveles de ADP en el medio, emulando una situación de alta demanda energética. Basado en este mecanismo, proponemos que la entrada de Ca^{2+} y la disminución de la fosforilación de PDH promovida por IGF-1, potenciarán el metabolismo y la respiración mitocondrial, con el fin de sostener las nuevas demandas metabólicas impuestas por el estímulo hipertrófico. Si bien, otros estudios han confirmado que IGF-1 aumenta el consumo de oxígeno en CMRN.^{92,104} Nuestros resultados muestran por primera vez que IGF-1 incrementa de manera significativa la respiración mitocondrial a nivel basal, ligada a ATP y máxima en CM-CMEH (Figura 7). Por otro lado, la coincubación de IGF-1 con el inhibidor específico de MCUC (ru360) previno todos estos cambios, presentado valores similares a las células control, con excepción de la fuga de protones (Figura

6B). Estos datos sugieren que el efecto potenciador de la respiración mitocondrial promovida por IGF-1 es dependiente de los niveles de Ca^{2+} en la matriz. No obstante, la mayor fuga de protones parecer estar regulada por un mecanismo independiente a la entrada de Ca^{2+} . A pesar de que la fuga de protones se asocia con una menor eficiencia en la producción de ATP, también ha mostrado tener efectos cardioprotectores a niveles moderados, ya que permite controlar la producción de especies reactivas de oxígeno en condiciones de mayor $\Delta\Psi_{\text{mt}}$.¹⁰⁹ Futuros experimentos deberán ir enfocados en dilucidar si este efecto es relevante para la función mitocondrial y la respuesta hipertrófica inducida por IGF-1.

La captación y contenido de Ca^{2+} mitocondrial no solo tiene efectos locales sobre la respiración y producción de ATP, también permite controlar las dinámicas de Ca^{2+} citoplasmáticas. En diversos modelos celulares se ha descrito que las mitocondrias funcionan como verdaderos amortiguadores de Ca^{2+} , modulando la forma de las señales de Ca^{2+} citoplasmáticas, las cuales tienen directa relación con la actividad de diversas vías de señalización y mecanismos de respuesta celular.^{48,110,111} En el caso de los cardiomiocitos, el incremento desmedido y desregulado de las señales de Ca^{2+} citoplasmáticas se relacionan con alteraciones en la contracción, fisión mitocondrial, estrés oxidativo y activación de factores de transcripción asociados al remodelado cardiaco patológico.^{51,77,112} En estas condiciones, la restauración de la captación de Ca^{2+} mitocondrial, a través de la ganancia de función de MCUC, ha mostrado normalizar el metabolismo y reducir los efectos deletéreos de la sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático.^{77,101,113} En el presente trabajo no se estudiaron los efectos crónicos de IGF-1 sobre las dinámicas de Ca^{2+} citoplasmático y la actividad de blancos sensibles

a Ca^{2+} en el citoplasma, los que podrían entregar información relevante sobre el papel mitocondrial en el desarrollo de la hipertrofia adaptativa o fisiológica.

Preguntas abiertas y perspectivas futuras

Este estudio entrega información valiosa acerca de los mecanismos subyacentes al remodelado adaptativo inducido por IGF-1 en dos modelos celulares de cardiomiocitos. Sin embargo, numerosas son las preguntas que quedan abiertas y que deben ser abordadas para entender la regulación y los mecanismos detrás de nuestros resultados. En primer lugar **¿Cuál es el mecanismo que explicaría el incremento en la expresión de MICU1 y MCUR1?** Basado en nuestros resultados, todo indica que IGF-1 controlaría directa (hipótesis 1) o indirectamente (hipótesis 2) la actividad de factores de transcripción asociado a la expresión de estas proteínas. En el caso de MICU1, la primera hipótesis plantea que IGF-1 podría estar regulando directamente su transcripción a través de las diversas vías relacionadas con la activación del IGF-1R, por lo que sería interesante evaluar cuál de estas vías – Akt/PI3K, ERK1/2 o la vía no canónica – y que factores de transcripción – como SP1 o ERG1 – estarían involucrados. La segunda hipótesis propone que el incremento de MICU1, es una respuesta adaptativa y secundaria al incremento del metabolismo mitocondrial mediado por una mayor entrada de sustratos a la mitocondria. Como mostraron Nemani y cols.¹⁰⁷ el incremento en la oxidación de sustratos derivados del metabolismo de la glucosa o de los ácidos grasos puede regular la transcripción de MICU1 y, por lo tanto, una mayor o menor entrada de Ca^{2+} sería una especie de retroalimentación positiva para incrementar o reducir el metabolismo mitocondrial respectivamente. Esto

supone demostrar que existe un incremento en el uso de sustratos metabólicos, que son necesarios y anteceden a los cambios en la expresión de MICU1. En el caso de MCUR1, no hay evidencia clara de cuál sería su regulación y bajo qué factores de transcripción estaría modulada su expresión en cardiomiocitos. No obstante, se ha demostrado que la reducción de sustratos metabólicos y la privación de oxígeno reduce la expresión de MICUR1 en células endoteliales,¹⁰⁷ apoyando la idea de que tanto la expresión de MICU1 como la de MCUR1 estaría influenciada por la actividad metabólica y la oxidación de sustratos en la mitocondria.

En segundo lugar **¿IGF-1 incrementa la actividad de PDH y de las deshidrogenasas de isocitrato y α -cetoglutarato?** Si bien, mostramos una disminución en la fosforilación de PDH, no podemos simplemente concluir que ésta y las demás deshidrogenasas mitocondriales presentan una mayor actividad. Es necesario establecer directamente la actividad enzimática de estas proteínas bajo el estímulo de IGF-1 y su dependencia respecto de la $[Ca^{2+}]_m$ en experimentos futuros, para de esta manera dilucidar el mecanismo por el cual el Ca^{2+} mitocondrial incrementa el consumo de oxígeno. Además, no debemos olvidar que tanto PDH como las demás deshidrogenasas presentan mecanismos de regulación paralelos. Por ejemplo, la actividad del complejo PDH depende de su estado de fosforilación, comandado por la actividad reciproca de PDP1 y PDK4 sobre la subunidad $E1\alpha$. Ambas proteínas están reguladas por la razón entre $[acetil-CoA]/[CoA]$, $[NADH]/[NAD^+]$ y $[ATP]/[ADP]$.¹¹⁴ α CGDH e ICDH también son reguladas por la razón entre $[NADH]/[NAD^+]$ y $[ATP]/[ADP]$.⁸⁷ Por lo tanto, aún no se puede descartar la existencia de mecanismos de regulación paralelos promovidos por IGF-1 sobre el metabolismo mitocondrial.

Finalmente, nuestra última pregunta abierta se relaciona con el último objetivo de este estudio, que no se pudo abordar por completo: **¿Qué relación existe entre el manejo de Ca²⁺ mitocondrial y la hipertrofia del cardiomiocito inducida por IGF-1?** Nosotros y otros investigadores proponemos que detrás del metabolismo anabólico presente en la hipertrofia cardíaca fisiológica, deben gestarse cambios en el metabolismo catabólico para energizar al sistema y permitir un crecimiento armónico, que mantenga el balance energético del cardiomiocito.^{93,115} Para entender este razonamiento, debemos volver a la naturaleza de la hipertrofia, que nace como respuesta al aumento del estrés mecánico sobre la pared miocárdica, en esencia, algo similar a lo que ocurre con el ejercicio y el desarrollo de hipertrofia en el músculo esquelético.¹⁴ En estas condiciones, el cardiomiocito se verá expuesto a estimulación mecánica y hormonal, que promoverán al mismo tiempo un aumento en la actividad contráctil y el crecimiento del corazón.¹¹⁶ Ambos procesos se traducen en un aumento en la demanda de energía (ATP) y de biomoléculas para el remodelado estructural del corazón.^{14,117} Entonces **¿Cuáles son los mecanismos que utiliza el cardiomiocito para incrementar las fuentes de ATP y biomoléculas en la hipertrofia inducida por IGF-1?** Se ha mostrado que IGF-1, por medio de la activación de su receptor, incrementa la captación de sustratos metabólicos para la biosíntesis de las macromoléculas que permitirán el crecimiento celular.^{16,22} Sin embargo, los efectos que tiene IGF-1 sobre la mitocondria – que como fue mencionado anteriormente da cuenta del ~90% del ATP requerido por los cardiomiocitos – aún son desconocidos. Este trabajo sugiere que: IGF-1 modula el manejo de Ca²⁺ mitocondrial, mecanismo que podría explicar el incremento en la respiración mitocondrial, lo cual sería necesario para mantener el balance energético durante la hipertrofia fisiológica. Esta hipótesis

parece ser cierta en el músculo esquelético. Por medio de experimentos de ganancia o pérdida de función de MCU,¹¹⁸ o de parvalbúmina,⁷⁵ se concluyó que la captación de Ca^{2+} mitocondrial es necesaria para el desarrollo de la hipertrofia del músculo esquelético y que se relaciona con la actividad de la vía IGF-1/PI3K/Akt. En el tejido cardíaco, por otro lado, la evidencia actual apunta a que este mecanismo también podría jugar un papel relevante en la hipertrofia cardíaca adaptativa. Por ejemplo, se ha observado que MCU incrementa su expresión en modelos de hipertrofia adaptativa.⁷⁶ y su sobreexpresión reduce en gran parte los efectos deletéreos de la hipertrofia cardíaca patológica.^{77,113} Experimentos futuros, deberán enfocarse en dilucidar el papel de la captación de Ca^{2+} mitocondrial en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca mediada por IGF-1 en modelos *in vitro* e *in vivo*, mostrando que el fenotipo “adaptativo o fisiológico” es dependiente de la captación de Ca^{2+} y la función mitocondrial.

CONCLUSIÓN

La estimulación con IGF-1 incrementa la captación de Ca^{2+} mitocondrial y la actividad de PDH, potenciando el consumo de oxígeno de los cardiomiocitos. Estos cambios se relacionan con la regulación transcripcional de las subunidades MICU1 y MCUR1 de MCUC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maillet, M., van Berlo, J. H. & Molkenkin, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 38–48 (2013).
2. Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M. & Field, L. J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am. J. Physiol.* **271**, H2183–2189 (1996).
3. Vujic, A. *et al.* Exercise induces new cardiomyocyte generation in the adult mammalian heart. *Nat Commun* **9**, 1659 (2018).
4. Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* **56**, 56–64 (1975).
5. Hill, J. A. & Olson, E. N. Cardiac plasticity. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1370–1380 (2008).
6. Shimizu, I. & Minamino, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **97**, 245–262 (2016).
7. Blomqvist, C. G. & Saltin, B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu. Rev. Physiol.* **45**, 169–189 (1983).
8. Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* **128**, 191–227 (2010).
9. Doenst, T. *et al.* Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc. Res.* **86**, 461–470 (2010).
10. Varnava, A. M., Elliott, P. M., Mahon, N., Davies, M. J. & McKenna, W. J. Relation between myocyte disarray and outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* **88**, 275–279 (2001).
11. Vega, R. B., Konhilas, J. P., Kelly, D. P. & Leinwand, L. A. Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise. *Cell Metab.* **25**, 1012–1026 (2017).
12. Crilly, J. G. *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* **41**, 1776–1782 (2003).
13. Neubauer, S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* **356**, 1140–1151 (2007).
14. Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* **15**, 387–407 (2018).
15. Rinderknecht, E. & Humbel, R. E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* **253**, 2769–2776 (1978).
16. Troncoso, R., Ibarra, C., Vicencio, J. M., Jaimovich, E. & Lavandro, S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 128–137 (2014).
17. Horio, T. *et al.* Production and autocrine/paracrine effects of endogenous insulin-like growth factor-1 in rat cardiac fibroblasts. *Regul. Pept.* **124**, 65–72 (2005).
18. Ationu, A. *et al.* Ventricular expression and circulating levels of insulin-like growth factor I in heart transplant recipients. *Clin. Sci.* **89**, 53–57 (1995).
19. Wang, L. *et al.* Endothelial insulin-like growth factor-1 modulates proliferation and phenotype of smooth muscle cells induced by low shear stress. *Ann Biomed Eng* **42**, 776–786 (2014).

20. Weeks, K. L., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Patterson, N. L. & McMullen, J. R. The IGF1-PI3K-Akt Signaling Pathway in Mediating Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy and Protection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1000**, 187–210 (2017).
21. Yakar, S. & Adamo, M. L. Insulin-like growth factor 1 physiology: lessons from mouse models. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **41**, 231–247, v (2012).
22. Lavandero, S., Foncea, R., Pérez, V. & Sapag-Hagar, M. Effect of inhibitors of signal transduction on IGF-1-induced protein synthesis associated with hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *FEBS Lett.* **422**, 193–196 (1998).
23. Ito, H. *et al.* Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* **87**, 1715–1721 (1993).
24. Carrasco, L. *et al.* Role of heterotrimeric G protein and calcium in cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1. *J. Cell. Biochem.* **115**, 712–720 (2014).
25. Ibarra, C. *et al.* Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors. *Circ. Res.* **112**, 236–245 (2013).
26. Muñoz, J. P. *et al.* The transcription factor MEF2C mediates cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**, 155–160 (2009).
27. Neri Serneri, G. G. *et al.* Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ. Res.* **89**, 977–982 (2001).
28. Zebrowska, A., Gašior, Z. & Langfort, J. Serum IGF-I and hormonal responses to incremental exercise in athletes with and without left ventricular hypertrophy. *J Sports Sci Med* **8**, 67–76 (2009).
29. McMullen, J. R. *et al.* The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 4782–4793 (2004).
30. Kim, J. *et al.* Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol. Endocrinol.* **22**, 2531–2543 (2008).
31. Stanley, W. C., Recchia, F. A. & Lopaschuk, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* **85**, 1093–1129 (2005).
32. Akhmedov, A. T., Rybin, V. & Marín-García, J. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart. *Heart Fail Rev* **20**, 227–249 (2015).
33. Doenst, T., Nguyen, T. D. & Abel, E. D. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ. Res.* **113**, 709–724 (2013).
34. Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V. & Joubert, F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1360–1372 (2011).
35. Balaban, R. S. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 1259–1271 (2002).
36. Lukyanenko, V., Chikando, A. & Lederer, W. J. Mitochondria in cardiomyocyte Ca²⁺ signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1957–1971 (2009).
37. De La Fuente, S. *et al.* Strategic Positioning and Biased Activity of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Cardiac Muscle. *J. Biol. Chem.* **291**, 23343–23362 (2016).

38. Csordás, G., Thomas, A. P. & Hajnóczky, G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria in cardiac muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 269–275 (2001).
39. Sharma, V. K., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C. & Sheu, S. S. Transport of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 97–104 (2000).
40. Chacon, E. *et al.* Mitochondrial free calcium transients during excitation-contraction coupling in rabbit cardiac myocytes. *FEBS Lett.* **382**, 31–36 (1996).
41. Wacquier, B., Combettes, L., Van Nhieu, G. T. & Dupont, G. Interplay Between Intracellular Ca(2+) Oscillations and Ca(2+)-stimulated Mitochondrial Metabolism. *Sci Rep* **6**, 19316 (2016).
42. Williams, G. S. B., Boyman, L. & Lederer, W. J. Mitochondrial calcium and the regulation of metabolism in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **78**, 35–45 (2015).
43. Glancy, B. & Balaban, R. S. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* **51**, 2959–2973 (2012).
44. Wescott, A. P., Kao, J. P. Y., Lederer, W. J. & Boyman, L. Voltage-energized Calcium-sensitive ATP Production by Mitochondria. *Nat Metab* **1**, 975–984 (2019).
45. Cluntun, A. A. *et al.* The pyruvate-lactate axis modulates cardiac hypertrophy and heart failure. *Cell Metab* **33**, 629-648.e10 (2021).
46. Gopal, K. *et al.* Cardiac-Specific Deletion of Pyruvate Dehydrogenase Impairs Glucose Oxidation Rates and Induces Diastolic Dysfunction. *Front Cardiovasc Med* **5**, 17 (2018).
47. Strubbe-Rivera, J. O. *et al.* The mitochondrial permeability transition phenomenon elucidated by cryo-EM reveals the genuine impact of calcium overload on mitochondrial structure and function. *Sci Rep* **11**, 1037 (2021).
48. Drago, I., De Stefani, D., Rizzuto, R. & Pozzan, T. Mitochondrial Ca²⁺ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca²⁺ peaks in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 12986–12991 (2012).
49. Pennanen, C. *et al.* Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca²⁺-calcineurin signaling pathway. *J. Cell. Sci.* **127**, 2659–2671 (2014).
50. Gutiérrez, T. *et al.* Alteration in mitochondrial Ca(2+) uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell Commun. Signal* **12**, 68 (2014).
51. Pavez-Giani, M. G. *et al.* ATPase Inhibitory Factor-1 Disrupts Mitochondrial Ca²⁺ Handling and Promotes Pathological Cardiac Hypertrophy through CaMKII δ . *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
52. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I. & Rizzuto, R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 336–340 (2011).
53. Baughman, J. M. *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341–345 (2011).
54. Carafoli, E. The interplay of mitochondria with calcium: an historical appraisal. *Cell Calcium* **52**, 1–8 (2012).
55. Zhuo, W. *et al.* Structure of intact human MCU supercomplex with the auxiliary MICU subunits. *Protein Cell* **12**, 220–229 (2021).

56. Paillard, M. *et al.* MICU1 Interacts with the D-Ring of the MCU Pore to Control Its Ca²⁺ Flux and Sensitivity to Ru360. *Mol Cell* **72**, 778-785.e3 (2018).
57. Payne, R., Li, C. & Foskett, J. K. Variable Assembly of EMRE and MCU Creates Functional Channels with Distinct Gatekeeping Profiles. *iScience* **23**, 101037 (2020).
58. Van Keuren, A. M. *et al.* Mechanisms of EMRE-Dependent MCU Opening in the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex. *Cell Reports* **33**, 108486 (2020).
59. Pittis, A. A. *et al.* Discovery of EMRE in fungi resolves the true evolutionary history of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Commun* **11**, 4031 (2020).
60. Payne, R., Hoff, H., Roskowski, A. & Foskett, J. K. MICU2 Restricts Spatial Crosstalk between InsP3R and MCU Channels by Regulating Threshold and Gain of MICU1-Mediated Inhibition and Activation of MCU. *Cell Rep* **21**, 3141–3154 (2017).
61. Phillips, C. B., Tsai, C.-W. & Tsai, M.-F. The conserved aspartate ring of MCU mediates MICU1 binding and regulation in the mitochondrial calcium uniporter complex. *eLife* **8**, e41112 (2019).
62. Lambert, J. P. *et al.* MCUB Regulates the Molecular Composition of the Mitochondrial Calcium Uniporter Channel to Limit Mitochondrial Calcium Overload During Stress. *Circulation* (2019) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037968.
63. Tomar, D. *et al.* MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics. *Cell Rep* **15**, 1673–1685 (2016).
64. Vais, H. *et al.* MCUR1, CCDC90A, Is a Regulator of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Cell Metab* **22**, 533–535 (2015).
65. Chaudhuri, D., Artiga, D. J., Abiria, S. A. & Clapham, D. E. Mitochondrial calcium uniporter regulator 1 (MCUR1) regulates the calcium threshold for the mitochondrial permeability transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E1872-1880 (2016).
66. Mammucari, C., Gherardi, G. & Rizzuto, R. Structure, Activity Regulation, and Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Health and Disease. *Front Oncol* **7**, 139 (2017).
67. Kwong, J. Q. *et al.* The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *Cell Rep* **12**, 15–22 (2015).
68. Altamimi, T. R. *et al.* Cardiac-specific deficiency of the mitochondrial calcium uniporter augments fatty acid oxidation and functional reserve. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **127**, 223–231 (2019).
69. Luongo, T. S. *et al.* The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. *Cell Rep* **12**, 23–34 (2015).
70. Wu, Y. *et al.* The mitochondrial uniporter controls fight or flight heart rate increases. *Nat Commun* **6**, 6081 (2015).
71. Fernández-Sada, E. *et al.* Cardiac responses to β -adrenoceptor stimulation is partly dependent on mitochondrial calcium uniporter activity. *Br J Pharmacol* **171**, 4207–4221 (2014).
72. Rasmussen, T. P. *et al.* Inhibition of MCU forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 9129–9134 (2015).

73. Zampieri, S. *et al.* Physical exercise in aging human skeletal muscle increases mitochondrial calcium uniporter expression levels and affects mitochondria dynamics. *Physiol Rep* **4**, (2016).
74. Mammucari, C. *et al.* The mitochondrial calcium uniporter controls skeletal muscle trophism in vivo. *Cell Rep* **10**, 1269–1279 (2015).
75. Butera, G. *et al.* Parvalbumin affects skeletal muscle trophism through modulation of mitochondrial calcium uptake. *Cell Rep* **35**, 109087 (2021).
76. Zaglia, T. *et al.* Content of mitochondrial calcium uniporter (MCU) in cardiomyocytes is regulated by microRNA-1 in physiologic and pathologic hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E9006–E9015 (2017).
77. Liu, T., Yang, N., Sidor, A. & O'Rourke, B. MCU Overexpression Rescues Inotropy and Reverses Heart Failure by Reducing SR Ca²⁺ Leak. *Circ Res* **128**, 1191–1204 (2021).
78. Hoes, M. F. *et al.* Iron deficiency impairs contractility of human cardiomyocytes through decreased mitochondrial function. *Eur J Heart Fail* **20**, 910–919 (2018).
79. Burridge, P. W. *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* **11**, 855–860 (2014).
80. Galvez, A. *et al.* A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* **304**, 279–285 (2001).
81. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (National Academies Press (US), 2011).
82. Maxwell, J. T., Tsai, C.-H., Mohiuddin, T. A. & Kwong, J. Q. Analyses of Mitochondrial Calcium Influx in Isolated Mitochondria and Cultured Cells. *J Vis Exp* (2018).
83. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682 (2012).
84. Kim, N. *et al.* Angiotensin II affects inflammation mechanisms via AMPK-related signalling pathways in HL-1 atrial myocytes. *Sci Rep* **7**, 10328 (2017).
85. Prathapan, A., Vineetha, V. P. & Raghu, K. G. Protective effect of Boerhaavia diffusa L. against mitochondrial dysfunction in angiotensin II induced hypertrophy in H9c2 cardiomyoblast cells. *PLoS One* **9**, e96220 (2014).
86. Hsieh, C.-C. *et al.* Mitochondrial protection by simvastatin against angiotensin II-mediated heart failure. *Br J Pharmacol* **176**, 3791–3804 (2019).
87. Denton, R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**, 1309–1316 (2009).
88. Gray, L. R., Tompkins, S. C. & Taylor, E. B. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2577–2604 (2014).
89. Gherardi, G., Monticelli, H., Rizzuto, R. & Mammucari, C. The Mitochondrial Ca²⁺ Uptake and the Fine-Tuning of Aerobic Metabolism. *Front Physiol* **11**, 554904 (2020).
90. Nicholls, D. G. & Crompton, M. Mitochondrial calcium transport. *FEBS Lett* **111**, 261–268 (1980).
91. Williams, G. S. B., Boyman, L., Chikando, A. C., Khairallah, R. J. & Lederer, W. J. Mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10479–10486 (2013).

92. Tigchelaar, W. *et al.* Hypertrophy induced KIF5B controls mitochondrial localization and function in neonatal rat cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **97**, 70–81 (2016).
93. Gibb, A. A. & Hill, B. G. Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling. *Circ Res* **123**, 107–128 (2018).
94. Kinugawa, S. *et al.* Positive inotropic effect of insulin-like growth factor-1 on normal and failing cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* **43**, 157–164 (1999).
95. Yeves, A. M., Burgos, J. I., Medina, A. J., Villa-Abrille, M. C. & Ennis, I. L. Cardioprotective role of IGF-1 in the hypertrophied myocardium of the spontaneously hypertensive rats: A key effect on NHE-1 activity. *Acta Physiol (Oxf)* **224**, e13092 (2018).
96. Pan, X. *et al.* The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol* **15**, 1464–1472 (2013).
97. Kwong, J. Q. *et al.* The mitochondrial calcium uniporter underlies metabolic fuel preference in skeletal muscle. *JCI Insight* **3**, (2018).
98. Matsushashi, T. *et al.* Activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate has the potential to induce epigenetic remodeling in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **82**, 116–124 (2015).
99. Ku, H. J., Ahn, Y., Lee, J. H., Park, K. M. & Park, J.-W. IDH2 deficiency promotes mitochondrial dysfunction and cardiac hypertrophy in mice. *Free Radic Biol Med* **80**, 84–92 (2015).
100. Ji, L. *et al.* MICU1 Alleviates Diabetic Cardiomyopathy Through Mitochondrial Ca²⁺-Dependent Antioxidant Response. *Diabetes* **66**, 1586–1600 (2017).
101. Suarez, J. *et al.* Restoring mitochondrial calcium uniporter expression in diabetic mouse heart improves mitochondrial calcium handling and cardiac function. *J. Biol. Chem.* **293**, 8182–8195 (2018).
102. del Campo, A. *et al.* Mitochondrial fragmentation impairs insulin-dependent glucose uptake by modulating Akt activity through mitochondrial Ca²⁺ uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**, E1–E13 (2014).
103. Garrido-Moreno, V. *et al.* GDF-11 prevents cardiomyocyte hypertrophy by maintaining the sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication. *Pharmacol Res* **146**, 104273 (2019).
104. Gutiérrez, T. *et al.* Alteration in mitochondrial Ca(2+) uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell Commun Signal* **12**, 68 (2014).
105. Marchi, S. *et al.* Akt-mediated phosphorylation of MICU1 regulates mitochondrial Ca²⁺ levels and tumor growth. *EMBO J.* **38**, (2019).
106. Paupe, V., Prudent, J., Dassa, E. P., Rendon, O. Z. & Shoubridge, E. A. CCDC90A (MCUR1) is a cytochrome c oxidase assembly factor and not a regulator of the mitochondrial calcium uniporter. *Cell Metab* **21**, 109–116 (2015).
107. Nemani, N. *et al.* Mitochondrial pyruvate and fatty acid flux modulate MICU1-dependent control of MCU activity. *Sci Signal* **13**, eaaz6206 (2020).
108. Pires, K. M. *et al.* Activation of IGF-1 receptors and Akt signaling by systemic hyperinsulinemia contributes to cardiac hypertrophy but does not regulate cardiac autophagy in obese diabetic mice. *J Mol Cell Cardiol* **113**, 39–50 (2017).

109. Cadenas, S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1859**, 940–950 (2018).
110. Yoast, R. E. *et al.* The Mitochondrial Ca²⁺ uniporter is a central regulator of interorganellar Ca²⁺ transfer and NFAT activation. *J Biol Chem* **297**, 101174 (2021).
111. Xie, A. *et al.* Mitochondrial Ca²⁺ flux modulates spontaneous electrical activity in ventricular cardiomyocytes. *PLoS One* **13**, e0200448 (2018).
112. Pennanen, C. *et al.* Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca²⁺-calcineurin signaling pathway. *J Cell Sci* **127**, 2659–2671 (2014).
113. Hamilton, S. *et al.* MCU overexpression evokes disparate dose-dependent effects on mito-ROS and spontaneous Ca²⁺ release in hypertrophic rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **321**, H615–H632 (2021).
114. Sun, W., Liu, Q., Leng, J., Zheng, Y. & Li, J. The role of Pyruvate Dehydrogenase Complex in cardiovascular diseases. *Life Sci.* **121**, 97–103 (2015).
115. Bertero, E. & Maack, C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol* **15**, 457–470 (2018).
116. Estrada, A. C., Yoshida, K., Saucerman, J. J. & Holmes, J. W. A multiscale model of cardiac concentric hypertrophy incorporating both mechanical and hormonal drivers of growth. *Biomech Model Mechanobiol* **20**, 293–307 (2021).
117. Brown, D. A. *et al.* Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol* **14**, 238–250 (2017).
118. Mammucari, C. *et al.* The mitochondrial calcium uniporter controls skeletal muscle trophism in vivo. *Cell Rep* **10**, 1269–1279 (2015).

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

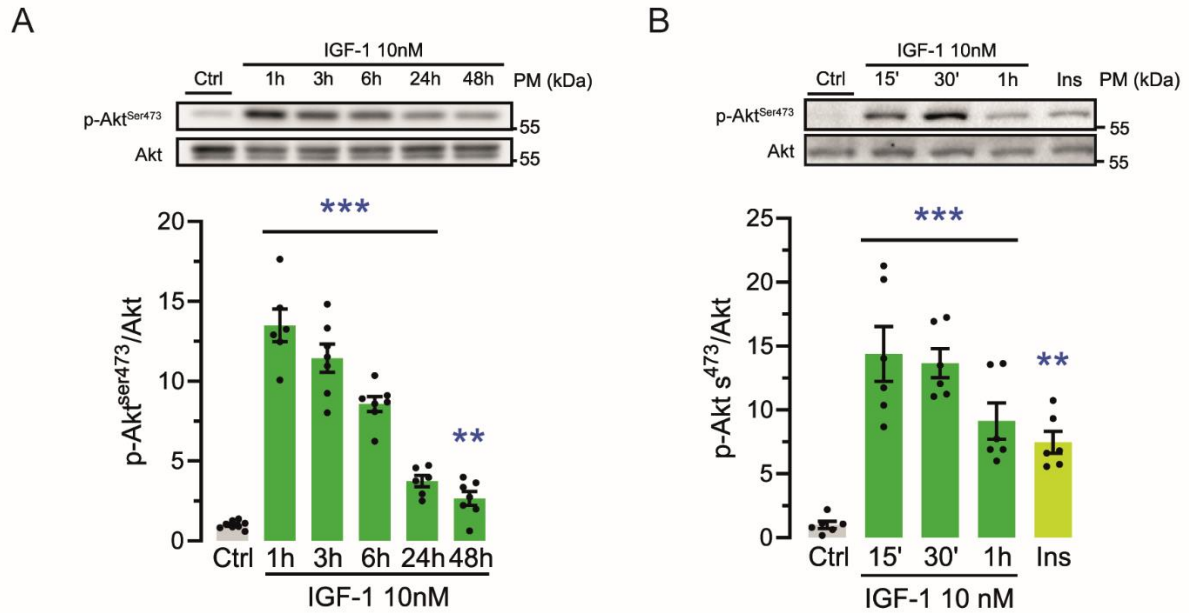


Figura S1. Estado de fosforilación de Akt en el residuo serina 473 inducido por IGF-1 en CMRN y CM-CMEH. (A) Niveles relativos de Akt fosforilado en el residuo serina 473 en CM-CMEH (n = 6) (B) CMRN estimulados con IGF-1 10 nM o insulina 100 nM (1 h) como control positivo. ** p < 0,01 vs control. *** p < 0,001 vs control.

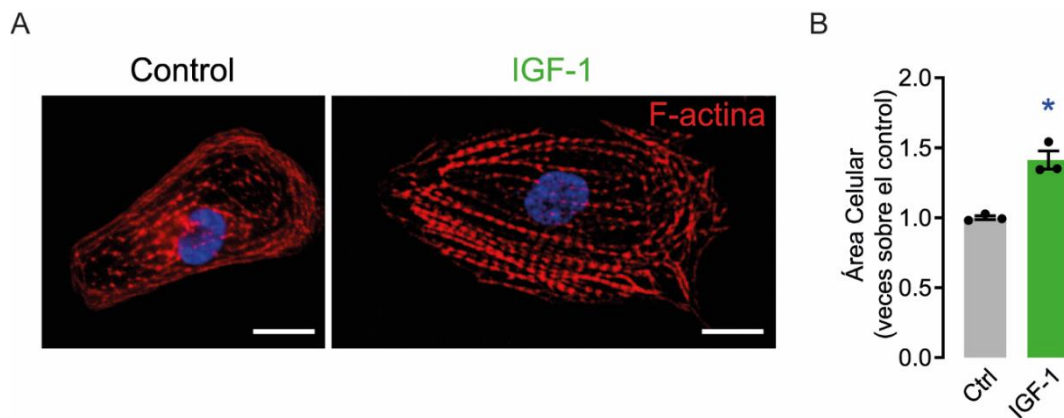


Figura S2. IGF-1 promueve la hipertrofia de los CMRN. (A) Imagen confocal representativa que muestra la distribución de F-actina (en rojo) y núcleo (en azul) de CMRN estimulados con IGF-1 10 nM por 48 h. (B) Cuantificación del área celular (n = 3). * p < 0,05 vs control. Barra de calibración: 10 μ m.

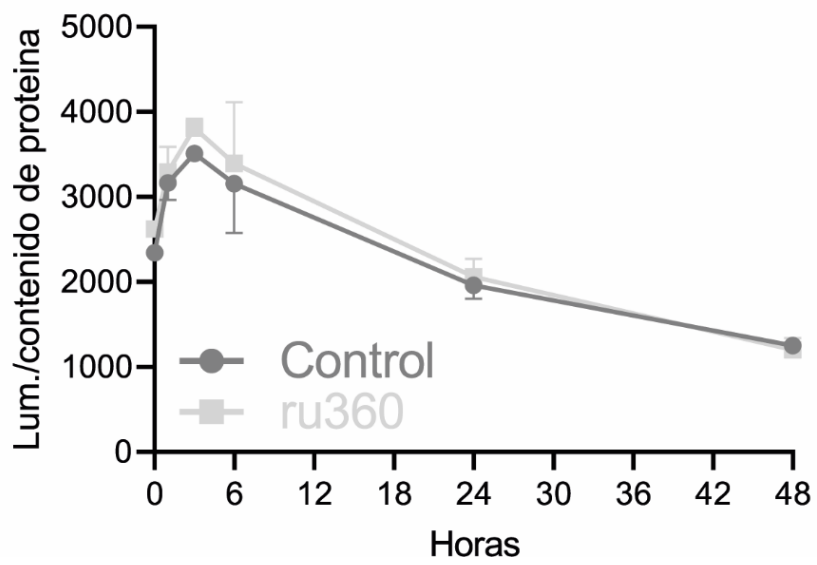


Figura S3. Efecto de ru360 en la viabilidad de CM-CMEH expuestos a ru360.
Cinética de luminiscencia emitida por los CM-CMEH viables expuestos a ru360 entre 0 y 48 h (n = 3).

ANEXOS



UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITÉ INSTITUCIONAL de CUIDADO y USO de ANIMALES (CICUA)

PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES

(Debe ser presentado en español)

Uso interno

Investigador: Pablo Sanchez

Código Comité Facultad: CBE2018-18

Código CICUA:

Evaluadores: Paula Toledo, Fernanda Schaufler, Carla Delporte, Lorena Garcia, Mario Rivera y Alfonso Paredes

Fecha de recepción: 12/12/2018

Fecha certificación: 27/12/2018

A. ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS

A.1. Título del proyecto presentado:

“Papel del uniportador de calcio mitocondrial en la hipertrofia del cardiomiocito inducida por IGF

Fecha de inicio y término del proyecto (indique mes y año): **Septiembre 2018 – Marzo 2021**

Fecha de inicio y término de uso de los animales (indique mes y año): **Enero 2019 – Marzo 2021**

A.2. Tipo de proyecto y actividad (marque con una cruz, si es Tesis indique de que Programa)

INVESTIGACIÓN: DOCENCIA: TESIS: X (Doctorado en Ciencias Biomédicas)
OTRO:

Fuente Financiamiento y vigencia (Nombre y nº):

Proyecto FONDAP 15130011 (SL), Beca CONICYT para estudios de doctorado 21181149 (PS)

A.3. Nombre del Investigador Responsable y nombramiento institucional (cargo):

Sergio Lavandero González, Profesor titular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Mario Chiong Lay, Profesor Asociado, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Nombre Patrocinado, si existiese (Investigador externo, Postdoctorante, Tesista):

Pablo Ignacio Sánchez Aguilera, Tesista del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

A.4. Teléfono(s) de contacto: +56 9 71700543 Fax no aplica

e-mail: pabloskine@gmail.com

A.5. Mencione el Laboratorio y Departamento de la Facultad en la que se desarrollará el trabajo con animales (si el trabajo lo realizará en más de un Laboratorio o Unidad debe especificarlo)

Laboratorio de Transducción de Señales moleculares, Departamento de Bioquímica y Biología molecular, Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas, Universidad de Chile

A.6. Contacto en caso de una emergencia con los animales en horario no laboral (al menos 2 personas).

Nombre: Veterinaria Nicole de Gregorio

Teléfono: +56981566830

Nombre: Dr. Sergio Lavandero González

Teléfono: 9782919

A.7. Listado de personas autorizadas para el manejo de los animales. Indique su capacitación (técnico, bioterista, tesista, postdoctorante, investigador, académico, etc.) y la función directa que realizará en el manejo de los animales (ej. Aseo, inoculación de animales, cirugías, etc) y vínculo con el Laboratorio. Incorpore las filas que sean necesarias. **NO OLVIDE** que debe comunicar oportunamente si se produce un cambio en el listado presentado a continuación (agregue cuantas filas sean necesarias).

NOMBRE	CAPACITACIÓN	FUNCIÓN en el Proyecto	FILIACIÓN Institucional	VÍNCULO con la Unidad
Sra. Gindra Latorre	Curso de Manejo de animales	Extracción de tejidos, preparación de cultivo primario y supervisión	Universidad de Chile	Apoyo Técnico
Sr. Fidel Albornoz Fariáz	Curso de Manejo de animales	Extracción de tejidos, preparación de cultivo primario y supervisión	Universidad de Chile	Apoyo Técnico
Sr. Pablo Sánchez Aguilera	Estudiante de Doctorado	Preparación de cultivo primario	Universidad de Chile	Tesista de Doctorado
Sr. Jafet Ortiz Quintero	Estudiante de Doctorado	Preparación de cultivo primario	Universidad de Chile	Tesista de Doctorado
Dr. Sergio Lavandero González	Director de tesis. Curso de Manejo de animales	Dirección y supervisión de Tesis	Universidad de Chile	Director de Tesis
Dr. Mario Chiong Lay	Director de tesis. Curso de Manejo de animales	Dirección y supervisión de Tesis	Universidad de Chile	Director de Tesis

B. ANTECEDENTES DE LOS ANIMALES A UTILIZAR

B.1. Especie(s), raza, cepa, y línea transgénica (si aplica) utilizada(s):

Ratas (*Rattus norvegicus*), Sprague-Dawley.

B.2. Edad/Estado de desarrollo

Ratas neonatas de 1 a 3 días.

B.3. Peso:

6 a 8 gramos.

B.4. Sexo:

Ambos.

B.5. Indique el origen de los animales (lugar de procedencia):

Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

B.6. Indique el lugar donde se realizarán los procedimientos y la superficie disponible para que los animales vivos permanezcan (ya sea en el bioterio o fuera de él):

Los animales serán mantenidos en el bioterio de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y serán procesados en la sala de cultivos del Laboratorio Transducción de Señales moleculares de la misma facultad.

B.7. Señale el número total de animales a utilizar en el proyecto (Señale además si se compartirán animales con otro proyecto. El desglose por objetivos se debe incluir en la sección C.4):

Este proyecto requiere de **665 ratas neonatas** para abarcar completamente los objetivos planteados y no serán compartidos con otro proyecto,

B.8. Señale el método(s) de identificación de los animales

Sin Identificación

B.9. Describa detalladamente las condiciones de traslado de los animales y la(s) persona(s) responsable(s) del traslado.

Los animales se obtendrán desde el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Desde el bioterio los animales son trasladados a la sala de cultivos en el quinto piso del edificio Luis Cerutti, donde la sala se encontrará previamente preparada para la obtención de los corazones. La persona responsable del traslado de las ratas neonatas será el Sr. Fidel Albornoz.

B.10. Si procede, remita el certificado de SAG o institución que autoriza el uso (en caso de animales silvestres).

No Aplica

C. PROPÓSITOS DE LA INVESTIGACIÓN

C.1. Señale el o los propósito(s) principal(es) del Proyecto en un párrafo no superior a 12 líneas. Éstos deben ser explicados de manera que sean comprensibles para el ciudadano común. Además, la relevancia del proyecto debe quedar claramente señalada para cualquier evaluador éticista.

La **hipertrofia cardíaca (HC)** es el crecimiento de las células contráctiles del corazón (cardiomiocitos) en respuesta a estímulos fisiológicos (ej: ejercicio) o patológicos (ej: hipertensión arterial), favoreciendo la adaptación o alteración de la función cardíaca respectivamente. Los mecanismos celulares que determinan una u otra respuesta son controvertidos. El **factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1)** es un péptido secretado por diversos tejidos, entre ellos el corazón, asociándose con el desarrollo de HC fisiológica en diversos modelos. Se ha determinado que el incremento del calcio mitocondrial favorece la producción de energía y es clave para la función cardíaca; la proteína encargada de la entrada de calcio a la mitocondria (**MCU**) aumenta en HC fisiológica inducida por ejercicio. Este proyecto busca determinar el **papel de MCU y la captación de calcio mitocondrial en el desarrollo de hipertrofia de cardiomiocitos de ratas neonatas inducida por IGF-1**. Los resultados permitirán entender en parte los mecanismos celulares que favorecen la adaptación energética del cardiomiocito; un paso importante para reenfocar las terapias actuales para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica y el posterior desarrollo de la insuficiencia cardíaca.

C.2. Justifique el uso de ANIMALES, en vez de usar modelos alternativos. Por modelos alternativos se entienden aquellos que reemplacen la utilización de animales vertebrados. Indique los motivos por los cuales no se plantea aplicar un método alternativo al procedimiento propuesto.

Este proyecto está enfocado en establecer los mecanismos que determinan el desarrollo de hipertrofia cardíaca, siendo los ventrículos cardíacos la región que presenta mayores cambios en esta condición. El cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatas es el modelo *in vitro* más estable, reproducible y cercano al modelo *in vivo*. No existen hasta la fecha líneas celulares derivadas de ventrículo cardíaco y el uso de células HL-1 proveniente de aurículas no presentan las mismas características morfológicas y funcionales a nivel mitocondrial; y tampoco presentan una respuesta homologable a la observada en células derivadas de ventrículos, por lo que no nos permitiría extrapolar de manera adecuada los resultados.

C.3. Explique las características que justifiquen el uso de esta(s) ESPECIE(s).

Indique la especie y raza (o cepa) que se propone utilizar y los motivos de esta selección.

Modelo: Ratas Sprague-Dawley

Este modelo animal está validado y su selección se basa en la alta reproducibilidad de los resultados obtenidos a partir de su estudio y también por la gran experiencia acumulada por el laboratorio (más de 20 años) en el uso de este modelo.

C.4. Justifique estadística y/o bibliográficamente el número de animales a utilizar por cada uno de los objetivos del estudio. Recuerde que, de acuerdo a las normas internacionales de bioética animal, se debe utilizar el mínimo de animales necesario para obtener resultados válidos Aplicar el principio de las 3 Rs: Reemplazar animales por otro sistema (ej. in vitro); Reducir número de animales; Refinar los procedimientos realizados.

Para determinar el tamaño de la muestra a utilizar nos basamos en dos técnicas que presentan mayor error asociado: Western blot (20% de error asociado al procedimiento) y determinación de los niveles de ATP (15% de error asociado al procedimiento).

Basado en la fórmula de Taucher E (1997), se aplicó la siguiente fórmula:

$$n=2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times s^2/D^2$$

Donde:

n: Número de observaciones mínimas necesarias.

s: desviación estándar de los valores individuales, que se supone igual en todos los grupos.

D: Diferencia significativa estimada que se proyecta obtener.

Z α : Probabilidad de cometer un error estadístico tipo I (5%)

Z β : Probabilidad de cometer un error estadísticamente significativo de tipo II (20%)

Ya que se utilizarán herramientas adenovirales para modificar la expresión de MCU y regular cambios morfofuncionales de la mitocondria se considerará un D promedio de 40% para Western blot, basado en el trabajo de Mammucari C (2015), en el cual se observan cambios de un 45% para captación de Ca²⁺ mitocondrial en el músculo esquelético. Por otra parte, para la determinación de los niveles de ATP la diferencia estimada es de aproximadamente un 30%, basado en datos obtenidos en nuestro laboratorio.

Si se fija el nivel de significación mínima en 0,05 y la potencia que se desea para la prueba en (1- β) = 0,90 los correspondientes Z serán: Z $\alpha/2$ = 1,96 y Z β = 1,28. Entonces:

$$\text{Para western blot: } n= 2 \times (1,96 + 1,28)^2 \times 0,2^2/0,4^2$$

n= 5,25 observaciones

$$\text{Para niveles de ATP: } n= 2 \times (1,96 + 1,28)^2 \times 0,15^2/0,3^2$$

n=5,25 observaciones

Estableciendo como mínimo para ambas técnicas un n de 5 observaciones.

Cada rata neonata permite la extracción y aislamiento de entre $8,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^6$ cardiomiocitos. Dependiendo de la técnica se utilizarán un número mínimo de células por punto experimental. En el caso de **Western blot** el número mínimo de células por punto experimental es de $1,5 \times 10^6$ células, y para un set de 6 puntos experimentales (ej: curva de tiempo) nos da un total de 9×10^6 células. Este valor multiplicado por el número de observaciones mínimo (n) nos da un total de **45×10^6 células para cada técnica.**

Para determinar los **niveles de Ca^{2+} mitocondrial** se requieren 5×10^5 por cada punto experimental. El número de puntos por set será entre 6, multiplicado por el n calculado da un total de **15×10^6 .**

Para evaluar la **actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa** se requieren 1×10^6 células. Para 6 puntos experimentales se requieren 6×10^6 células, multiplicado por el n requerido se necesitan de **30×10^6 células.**

Para experimentos en **microscopía** (inmunofluorescencia) se requiere 3×10^5 células totales por punto experimental. Para un set de 6 puntos experimentales se utilizarán $1,8 \times 10^6$ células, multiplicado por el n calculado da un total de **9×10^6 células.**

Para evaluar el **consumo de O_2** se requieren 3×10^6 células por cada punto experimental. Para un set de 6 puntos se utilizarán alrededor de 18×10^6 células multiplicado por el n nos da **90×10^6 células.**

Para la determinar los **niveles de ATP** se utiliza una densidad de 2×10^4 células por punto experimental. Para un set de 6 puntos experimentales se necesitan 12×10^4 , obteniendo un total de **6×10^5 células** para un n de 5 puntos.

Objetivo Número 1:

Se determinará el efecto de IGF- 1 sobre los niveles proteicos de MCU, las señales de calcio mitocondrial y la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH).

- Para esto se utilizará la técnica de Western blot para determinar la expresión de MCU, β -MHC, ANP basalmente y bajo el estímulo de IGF-1 en una curva temporal y de concentración (6 puntos experimentales cada una) requiriendo un total de **90×10^6 células.**
- Determinados los parámetros de concentración y temporalidad del estímulo sobre los niveles proteicos de MCU se evaluará la captación de calcio mitocondrial a través de la sonda de calcio Rhod-2 AM en una condición basal y bajo el estímulo de IGF-1. Para un set de 3 puntos experimentales en duplicado se requieren **15×10^6 células.**
- Se evaluará posteriormente los niveles de PDH fosforilada y la actividad enzimática en 3 condiciones (Control, IGF-1 y control positivo) en duplicado. Para PDH fosforilada se necesitan **45×10^6 células** y para la actividad enzimática **30×10^6 células.**
- También se medirá el efecto de IGF-1 sobre la localización de MCU y la morfología celular a través de microscopía confocal requiriendo **9×10^6 células.**

El objetivo número 1 necesita de **189×10^6 cardiomiocitos de ratas neonatas.**

Objetivo Número 2:

Se describirá el efecto de IGF-1 sobre la estructura y función mitocondrial. Para esto se analizarán características funcionales de la mitocondria, tales como el consumo de oxígeno, producción de ATP y potencial de membrana mitocondrial; así como también parámetros estructurales mitocondriales (número, tamaño y distribución).

Las siguientes estrategias experimentales se realizarán manteniendo las características temporales y de concentración de IGF-1 determinadas en el objetivo 1.

- El consumo de oxígeno mitocondrial se evaluará utilizando un electrodo de Clark en tres condiciones (control, IGF-1 y control positivo) en duplicado; por lo tanto, se utilizarán 6 puntos experimentales dando un total de **90x10⁶ células**.
- La producción de ATP se analizará por medio de luminometría en las mismas condiciones siendo necesarias **6x10⁵ células**.
- El potencial de membrana mitocondrial se determinará por medio de la fluorescencia de la sonda mitocondrial TMRE⁺ utilizando para las mismas condiciones anteriores **9x10⁶ células**.
- El análisis morfológico y espacial de la mitocondria se realizará por microscopía confocal en las mismas condiciones anteriores, siendo requeridas **9x10⁶ células**.

El objetivo número 2 necesita de **108,6x10⁶ cardiomiocitos de ratas neonatas**.

Objetivo Número 3:

Finalmente, se evaluará el papel de MCU sobre los cambios en la estructura y función mitocondrial y en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducidos por IGF-1.

Para lograr este objetivo se realizarán los mismos experimentos utilizando herramientas adenovirales para la sobreexpresión o silenciamiento de MCU.

- Se realizarán Western blot para la determinación de los niveles de MCU en las células tratadas con las herramientas adenovirales. En el caso del silenciamiento se analizarán 4 condiciones (Control, IGF-1, KD-MCU, KD-MCU + IGF-1) en duplicado, por lo que se necesitarán de **60x10⁶ células**. Para la sobreexpresión de MCU se analizarán 2 condiciones (AVV-control y AVV-MCU) en duplicado, requiriendo **30x10⁶ células**.

Todos los experimentos se realizarán en paralelo con la determinación de las condiciones del objetivo 1 (Control e IGF-1), por lo que solo se tomará en cuenta el número de células para las nuevas condiciones (KD-MCU, KD-MCU + IGF-1, AVV-control y AVV-MCU).

- Captación de calcio mitocondrial: Para las cuatro condiciones en duplicado se requerirán **20x10⁶ células**.
- PDH fosforilada: Para las cuatro condiciones en duplicado se requerirán **60x10⁶ células**.
- Actividad enzimática de PDH: Para las cuatro condiciones en duplicado se requerirán **40x10⁶ células**.
- Localización de MCU y morfología celular: Para las cuatro condiciones en duplicado se requerirán **12x10⁶ células**.
- Consumo de oxígeno mitocondrial: Para las cuatro condiciones en duplicado se requerirán **120x10⁶ células**.
- Producción de ATP: Para las cuatro condiciones en duplicado se requerirán **8x10⁵ células**.
- Potencial de membrana mitocondrial: Para las cuatro condiciones en duplicado se requerirán **12x10⁶ células**.
- Análisis morfológico y espacial de la mitocondria: Para las cuatro condiciones en duplicado se requerirán **12x10⁶ células**.

El objetivo número 3 necesita de **366,8x10⁶ cardiomiocitos de ratas neonatas**.

En resumen, sumando las células requeridas en los 3 objetivos, se requerirán un total de **664,4x10⁶ cardiomiocitos de ratas neonatas**. Considerando que aproximadamente se obtienen 1x10⁶ cardiomiocitos por corazón de rata neonata, se utilizarán un total de **665 ratas neonatas** en todo el proyecto.

D. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO

D.1. Enumere la secuencia de TODOS los procedimientos a seguir con los animales. Explícite el curso temporal en los procedimientos crónicos. El detalle de procedimientos no quirúrgicos (manipulación y administración de sustancias) debe incluirse en la Sección E. El detalle de los procedimientos quirúrgicos debe incluirse en la Sección F.

Las ratas neonatas serán trasladadas desde el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas hasta la sala de cultivo del Laboratorio Transducción de Señales Moleculares. Cada animal será sumergido en una solución de alcohol 70%, excluyendo la cabeza. Se decapitarán y se extraerá el corazón a través de una incisión en el tórax. Los corazones se depositarán en un vaso de precipitado que contendrá medio de cultivo (el cultivo se dividirá en lotes de 30 corazones aproximadamente). Posteriormente, los corazones se cortarán mediante bisturí y se realizará una digestión enzimática con el objetivo de aislar los cardiomiocitos. Las células serán mantenidas en medio de mantención hasta su uso.

D.2. Describa el o los criterios de interrupción del trabajo con los animales durante el experimento. Incluya en su descripción el procedimiento esperado de finalización y las circunstancias en que el experimento será interrumpido para evitar sufrimientos innecesarios al animal. Si su protocolo incluye experimentos crónicos con inducción de patologías, indique explícitamente en qué momento se eutanasiarán los animales y el grado de compromiso de bienestar general, que se espera en esas condiciones, en base a los protocolos de supervisión modificados de Morton y Griffiths (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985) según corresponda, establecidos en los Anexos II y III. Puede modificarlo según las condiciones del estudio y las características de su modelo animal.

No aplica.

E. PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS (MANIPULACIÓN DEL ANIMAL Y ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS)

E.1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) no quirúrgico(s) a realizar. Incluya en su descripción: administración de sustancias, vía, sitio de inoculación, forma de administración, volumen y frecuencia de administración, métodos de sujeción o inmovilización del animal, uso de radiación (dosis y frecuencia), otros procedimientos: estudios de supervivencia, biopsias, entre otros.

Las ratas neonatas serán trasladadas desde el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas hasta la sala de cultivo del Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares. Cada animal será sumergido en una solución de alcohol 70%, excluyendo la cabeza. Se decapitarán y se extraerá el corazón a través de una incisión en el tórax. Los corazones se depositarán en un vaso de precipitado que contendrá medio de cultivo (el cultivo se dividirá en lotes de 30 corazones aproximadamente). Posteriormente, los corazones se cortarán mediante bisturí y se realizará una digestión enzimática con el objetivo de aislar los cardiomiocitos. Las células serán mantenidas en medio de mantención hasta su uso.

E.2. Indique el nombre y experiencia de la(s) personas que efectuará(n) los procedimientos no quirúrgicos.

No aplica.

E.3. Indique las condiciones en que se mantendrán los animales en los periodos de tiempo entre las distintas intervenciones.

No aplica.

F. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

F.1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) a realizar. Incluya métodos de asepsia que utilizará.

No aplica.

F.2. Indique nombre y experiencia de la(s) persona(s) que efectuará(n) procedimientos quirúrgicos.

No aplica.

F.3. Condiciones e infraestructura del lugar donde se efectuarán los procedimientos quirúrgicos.

No aplica.

F.4. Si el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) incluyen supervivencia del animal, señale el cuidado postoperatorio requerido e identifique a la persona responsable.

No aplica.

F.5. Si corresponde justifique si un mismo animal será sometido a procedimientos quirúrgicos más de una vez e indique el procedimiento previo.

No aplica.

G. DOLOR Y AFLICCIÓN

Es imperativo observar el principio fundamental de **evitar todo dolor y sufrimiento innecesario en cada animal que participa en un estudio científico**. Toda manipulación que provoque dolor o aflicción del o de los animal(es), **debe justificarse** en forma sólida y detallada.

G.1. Indique en la siguiente Tabla, el nivel de dolor según el grado de estrés o discomfort producido en los animales a manipular cada año. Los diferentes niveles de dolor o aflicción en el manejo de animales se explican en el Anexo IV.

*** Es obligatorio completar esta Tabla.**

Nivel de Dolor	Indique Número de Animales por				
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
A. Mínimo dolor y estrés	200	200	265		
B. Dolor asistido por medidas apropiadas (analgésico u otro)					
C. Dolor no asistido por medidas apropiadas					

Las ratas estarán expuestas a la manipulación mínimamente y serán sacrificadas de manera inmediata antes de la extracción del corazón.

G.2. Anestesia, Analgesia y Tranquilizantes. Para los animales indicados en la Tabla anterior (G1), categorías B, especifique los anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes que serán utilizados. Indique el o los nombre(s) de(los) agente(s) usado(s), la dosis, ruta, frecuencia y duración de administración, así como la(s) persona(s) encargada(s) del tratamiento y supervisar su efecto.

No aplica.

G.3. Si hay animales indicados en la categoría C de la Tabla G.1., se debe justificar por qué está contraindicado el uso de anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes durante, o después de los procedimientos que causan dolor o aflicción (incluya referencias).

No aplica.

H. DISPOSICIÓN FINAL DE LOS ANIMALES

H.1. Eutanasia. Describa detalladamente el método de eutanasia. Si se usa un agente químico, especifique, dosis y ruta de administración. Si su método es físico o mecánico, describa y justifique el método a utilizar. Indique la(s) persona(s) encargada(s) de esta función (Se sugiere revisar *The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, American Veterinary Medical Association, USA*).

La eutanasia será realizada por Fidel Albornoz y Gindra Latorre a través de decapitación. Posteriormente se realizará la extracción del corazón.

H.2. Eliminación de desechos. Describa brevemente el proceso de eliminación de los cadáveres de acuerdo con las normas de Bioseguridad de su Unidad. Si la eliminación es diferente a lo establecido, debe explicar el procedimiento en detalle y justificarlo.

La eliminación del material biológico será de acuerdo con las normas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Se almacenarán los desechos por un corto periodo a -20°C en contenedores localizados en el primer piso del Edificio Luis Cerutti, que son de uso exclusivo para esta tarea. Posteriormente se enviarán a la Facultad de Ciencias Veterinarias para su incineración.

H.3. Mantenión de especímenes muertos. Describa la finalidad y las normas establecidas en cada caso (conservación en museos, docencia, otros).

No aplica.

H.4. Supervivencia. Describa y justifique la disposición y destino de los animales en caso de experimentos o actividades docentes en que los animales no son eutanasiados al término del procedimiento.

No aplica.

I. SUBSTANCIAS ADMINISTRADAS A LOS ANIMALES QUE REQUIERAN CERTIFICACIÓN ESPECIAL

I.1. El uso de fármacos o sustancias peligrosas en la investigación con animales requiere de una aprobación separada. Es su responsabilidad contar con la(s) autorización(es) correspondiente(s). Si es relevante, adjunte las autorizaciones a este documento.

Nota: Si en su proyecto considera la utilización de agentes psicotrópicos, debe llevar un control y registro del uso de éstos. Además, todo excedente deberá ser comunicado a Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de su unidad para su resguardo o eliminación.

Señale a continuación en las siguientes Tablas aquellas sustancias que utilizará.

SUSTANCIAS QUE NO REQUIEREN	Lista de sustancias
Agentes Biológicos	No aplica
Fármacos	No aplica
Otros	No aplica

SUSTANCIAS DAÑINAS PARA LOS ANIMALES O HUMANOS QUE REQUIEREN APROBACIÓN	Lista de sustancias y documentación, si corresponde
Radionúclidos	No aplica
Agentes Biológicos	No aplica
Drogas o químicos peligrosos	No aplica
ADN Recombinante	No aplica
Fármacos	No aplica
Otros	No aplica

J. CERTIFICACIONES DEL ACADÉMICO Y/O INVESTIGADOR RESPONSABLE DE LOS PROCEDIMIENTOS DESCRITOS EN ESTE PROTOCOLO

J.1. Certifico que, a mi juicio, la investigación propuesta no constituye una duplicación innecesaria de investigaciones previas.

- J.2. Certifico** que todas las personas bajo mi supervisión y responsabilidad que participan en los procedimientos con los animales, trabajarán de acuerdo con las normas y reglas éticas vigentes nacionales e internacionales.
- J.3. Certifico** que he revisado la literatura científica y base de datos pertinentes sin encontrar procedimientos válidos alternativos, o no estoy en condiciones de desarrollarlos.
- J.4. Confirmo** que he completado la Tabla en el ítem G.1
- J.5. Certifico** que los antecedentes presentados en este Protocolo **incluyen la totalidad** de los procedimientos con animales propuestos en el Proyecto.
- J.6.** Me comprometo a solicitar y obtener la aprobación del CICUA de la Universidad de Chile antes de iniciar **CUALQUIER** cambio al Protocolo aprobado, **sea de procedimientos** como de **personal**.
- J.7. Certifico** que el personal que estará a cargo del manejo y o manipulación de los animales cuenta con experiencia, certificación o algún tipo de calificación que evite exponer a los animales a situaciones que ponen en riesgo su bienestar.
- J.8. Declaro** estar en conocimiento que se realizará **SEGUIMIENTO** por parte del CICUA para confirmar el cumplimiento de este Protocolo.
- Certifico** que las personas involucradas en este protocolo han leído y aprobado la versión definitiva de este documento

Investigador Patrocinado del protocolo (si lo hubiese):

Firma: Pablo Sánchez A.



J.9. Académico Responsable del Protocolo y los procedimientos planteados:

Firma: Sergio Lavandero G.



Mario Chiong L.



J.10. VºBº Director de la Unidad Académica:

Firma:



(Importante: las firmas en los puntos J.10, J.11 y J.12 deben ir sólo en el protocolo final aprobado, no son necesarias ni en la primera presentación digital, ni en las enmiendas posteriores a la certificación si las hubiere)

Fecha envío del protocolo: 26/12/2018

Check List

Señor Académico: Con el fin de evitar rechazo por parte del CICUA de su Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio por razones formales, por favor verifique que:

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 1 Cuenta con las respectivas firmas del Investigador, Director de la unidad y Académico responsable de los procedimientos (éste último si corresponde según el punto M) | <input type="checkbox"/> |
| 2 Respondió el B5 y B6 (indicar bioterio y lugar de los procedimientos con los animales) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 3 Ha especificado el cálculo del número total de animales a utilizar (punto B.7) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 4 Se ajustó a las indicaciones del punto C1 (descripción breve y comprensible para el ciudadano común de los propósitos de la investigación). | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 5 Ha justificado y especificado el cálculo del número de animales a utilizar por objetivo (punto C.4) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 6 Indicó “ no aplica ” en todos los items en que no corresponde responder | <input checked="" type="checkbox"/> |

ANEXO I - GLOSARIO

Aflicción: dolor o molestia.

Analgésico: fármaco utilizado para reducir la percepción central de los estímulos dolorosos.

Anestésico: fármaco que bloquean la sensibilidad táctil y dolorosa de un individuo generando un estado de inconsciencia en el animal. Puede utilizarse de manera parcial sobre el cuerpo (local) o general. Se caracteriza por generar analgesia, amnesia, e inmovilidad. Se utiliza en procedimientos quirúrgicos, en procedimientos poco invasivos pero muy dolorosos, y también para la exploración física o toma de muestras.

Angustia: emoción negativa, se caracteriza por ser una emoción compleja, puede ocurrir sin presencia del estímulo. **Criterio de punto final:** Punto determinado de manera científica, donde el dolor o distrés del animal es terminado, minimizado o reducido a través de acciones a través de la eutanasia, tratamiento o terminando el procedimiento.

Criterio de interrupción: Punto en el cual se decide poner término de manera anticipada a la investigación, ya sea porque el análisis preliminar de resultados lo permite o porque hay problemas metodológicos que así lo requieren. **Discomfort:** situación no confortable, que causa incomodidad en el animal.

Distrés: se refiere al contenido emocional de experiencias nocivas que provocan una respuesta de estrés fisiológico en los animales. La experiencia nociva puede ser predominantemente emocional, física, o una combinación de ambos. Generalmente ocurre cuando la respuesta de estrés es muy aguda o cuando se hace crónica, sobrepasando la capacidad de adaptación del individuo.

Dolor: experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño. Para cuantificarlo se utilizan signos indirectos de dolor, como por ejemplo expresión facial, cambios posturales y conductuales. Siempre que exista el riesgo de que se produzca dolor se debe usar un analgésico. Si no existe evidencia científica de que el procedimiento cause dolor, se asume que si es doloroso para el humano lo es para el animal.

Estrés: Se refiere al amplio rango de respuestas fisiológicas y conductuales aun cierto estímulo, desde las pequeñas desviaciones de los ajustes homeostáticos diarios que se dan bajo circunstancias benignas, hasta los cambios fisiológicos máximos de los sistemas del individuo.

Eutanasia: Del griego eu (bueno) y thanatos (muerte). Describe el término de la vida de un individuo de una forma que minimice o elimine el dolor y distrés. Es deber del Médico Veterinario llevar a cabo la eutanasia a través de criterios acordes a los intereses del animal y/o debido a principios de bienestar animal. Deben utilizarse técnicas que induzcan la muerte de una forma rápida, sin dolor ni distrés (AVMA, 2013).

Modelos alternativos: aquellos que reemplazan la utilización de animales vertebrados.

Principio de las 3 Rs: principio formulado en la década de los 60 por los biólogos ingleses, Russel y Burch, en su libro "The Principle of Humane Experimental Technique". Hacen referencia a Reemplazar, Reducir y Refinar.

Reemplazo: Preferir el uso de modelos no-animales sobre modelos animales cuando sea posible y permitan alcanzar los objetivos científicos (modelos virtuales, métodos in vitro). Otra alternativa es utilizar animales que estén más abajo en la escala filogenética (reemplazo relativo) que tienen menor capacidad de experimentar sufrimiento (ej. Reemplazar modelo vertebrado por invertebrado).

Reducción: Utilizar métodos que permitan obtener niveles de información comparables reduciendo al máximo la cantidad de animales utilizados, u obtener mayor información desde el mismo

número. Estos métodos incluyen diseños experimentales apropiados, determinación de tamaño muestral, y análisis estadístico apropiado.

Refinamiento: Utilizar métodos que alivien o minimicen el potencial dolor, sufrimiento o distrés, aumentando el bienestar animal desde su nacimiento hasta su muerte, por ejemplo a través del enriquecimiento ambiental.

Procedimientos no quirúrgicos: procedimientos que incluyen manipulación (métodos de sujeción o inmovilización) y administración de sustancias (vías, uso de radiación) de manera no instrumental para el diagnóstico, tratamiento o rehabilitación que no involucran incisión de los tejidos.

Procedimientos quirúrgicos: manejos o intervenciones en animales que involucren incisión de tejidos u órganos. Todo procedimiento quirúrgico debe realizarse bajo estrictas medidas de asepsia y protocolos anestésicos/sedantes y/o analgésicos apropiados para la intervención.

Sedantes: fármaco que produce una depresión central acompañada por somnolencia, el individuo puede o no estar consciente de lo que ocurre a su alrededor, pero si responde a estímulos dolorosos. Pueden utilizarse para procedimientos poco o no invasivos, que requieren de cooperación del animal. Puede ir acompañada de anestesia local.

Tranquilizante: fármaco que posee un efecto calmante, sin alteración de la consciencia. Genera modificación de la conducta, por lo que el individuo estará relajado, pero consciente; puede no responder a estímulos dolorosos de muy baja intensidad. Ayudan a reducir el estrés del animal, puede utilizarse para exploración física o toma de muestras en animales nerviosos.

ANEXO II

Protocolo de supervisión para Roedores modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985) (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985).

Protocolo de supervisión para roedores de laboratorio		
Variable	Rangos	Puntuación
Pérdida de peso (de 0 a 3)	● Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente).	0
	● Pérdida de peso inferior al 10%.	1
	● Pérdida de peso entre el 10% y 20%. Posible alteración en el aspecto o cantidad de heces.	2
	● Pérdida de peso superior al 20%, el animal no consume agua ni alimento.	3
Aspecto (de 0 a 3)	● Normal.	0
	● Pelo en mal estado.	1
	● Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales.	2
	● Postura anormal.	3
Comportamiento espontáneo (de 0 a 3)	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Inactividad	2
	● Automutilación, vocalización anormales, animales muy inquieto o inmóviles.	3
Comportamiento en respuesta a manipulación (de 0 a 3)	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Cambios moderados	2
	● Animales agresivo o comatoso	3
Constantes Vitales (de 0 a 3)	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Cambios en la temperatura corporal de 1-2°C, incremento del 30% en frecuencia Cardíaca o respiratoria.	2
	● Cambios en la temperatura corporal de >2°C, incremento del 50% en frecuencia Cardíaca o respiratoria.	3
Puntuación Total		

Nota: cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro todas las 3 pasan a 4.

Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:

Puntuación:

Desde 0-4 normal

Desde 5-9 supervisar cuidadosamente considerar el uso de analgésicos Desde 10-14 sufrimiento intenso: administrar analgésicos (¿eutanasia?) Desde 15-20 eutanasia

ANEXO III

Protocolo de supervisión para Peces modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985) (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985).

Protocolo de supervisión para peces		
Variable	Rangos	Puntuación
Nado regular	Normal (nada en forma continua, describiendo círculos, utilizando todo el estanque y manteniendo verticalidad)	0
	Sub-normal 1 (nada en forma continua, con trayectoria clara, mantiene verticalidad, no utiliza todo el espacio del tanque)	1
		2
	Sub-normal 2 (nada en forma continua, mantiene verticalidad, sin trayectoria clara, no utiliza todo el espacio del tanque)	3
Respuesta a la alimentación	Normal (responde de forma inmediata a la presencia de alimento luego de un periodo de ayuno nocturno)	0
	Sub-normal 1 (después de un periodo de ayuno nocturno el pez demora más de 5 segundos en responder a la presencia de alimento)	1
		2
	Sub-normal 2 (después de un periodo de ayuno nocturno el pez responde de forma errática a la presencia de alimento)	3
Comportamiento espontáneo	Normal (atento al medio, responde a la presencia de personal de laboratorio, interactúa con sus pares)	0
	Sub-normal 1 (Atento al medio, responde a la presencia de personal de laboratorio, interactúa en forma errática o agresiva con sus pares)	1
		2
	Sub-normal 2 (Responde con demora a estímulos externos, no interactúa con los pares separándose del grupo)	3
Estado de las aletas	Normal (sin erosión ni anomalía evidente de aletas)	0
	Sub-normal 1 (Erosión leve de aletas, borde exterior partido, sin exposición de los radios de las aletas)	1
		2
	Sub-normal 2 (Erosión evidente de aletas, se agrega a los síntomas anteriores: exposición de los radios de las aletas, hemorragia e inflamación leve)	3
Puntuación Total		

Nota: Cuando un estanque obtiene un puntaje de 3 en más de una variable, todos los “3” pasan a “4”. Las medidas correctivas de acuerdo a la puntuación para cada estanque son las siguientes:

Puntuación:

Desde 0-3: Normal

Desde 4-7: Supervisar cuidadosamente (considerar cambio en manejo)

Desde 8-11: Sufrimiento intenso, administrar analgésicos (considerar eutanasia)

Desde 12-16: Eutanasia

La evaluación será realizada por personal que conoce el comportamiento de los peces incluyendo al investigador responsable del proyecto y al personal técnico entrenado para el monitoreo de los estanques experimentales. **El protocolo debe ser visado por un Médico Veterinario con experiencia en peces.**

ANEXO IV

Niveles de Dolor o Aflicción

- A. Mínimo dolor y estrés:** Mínima molestia de los animales durante procedimientos NO QUIRÚRGICOS. Ejemplos: sujeción para observación o exámenes físicos, toma de muestras de sangre, inoculación de sustancias en pequeñas cantidades por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal u oral, pero no intratorácica o intracardiaca (Categoría B), estudios agudos sin supervivencia en los cuales los animales son completamente anestesiados y no recobran la conciencia, períodos cortos de privación de agua y comida (equivalentes a los que podrían ocurrir en condiciones naturales) o modificaciones ambientales leves, métodos de eutanasia con rápida pérdida de conciencia (sobredosis de anestésicos, decapitación luego de sedación o anestesia).
- B. Dolor asistido por medidas apropiadas:** Mínima dolor o aflicción debido al uso de medicamentos apropiados para disminuir o eliminar las molestias de los animales. Es el caso de la mayoría de los procedimientos QUIRÚRGICOS asociados a protocolos anestésicos y analgésicos apropiados. Ejemplos: canulación o cateterización de vasos sanguíneos o cavidades corporales bajo anestesia; cirugías menores bajo anestesia general o local tales como biopsias, laparoscopia; cirugías mayores bajo anestesia general con recuperación subsiguiente; sujeción o inmovilización por tiempos cortos pero que por observación evidencian leve discomfort o stress del animal; tiempo prolongado (varias horas) de inmovilización; inducción de conductas estresantes; inducción de anomalías anatómicas, fisiológicas o enfermedades que ocasionan dolor o stress pero que esta aliviado por medidas apropiadas. Procedimientos en esta categoría no deberían causar cambios significativos en la apariencia general del animal ni en parámetros tales como frecuencia cardiaca, respiratoria, excreción urinaria y fecal, o comportamiento social.
- C. Dolor no asistido por medidas apropiadas:** Dolor o aflicción sin el uso de medicamentos para disminuir o eliminar las molestias de los animales. Si existen animales en esta categoría, el investigador debe tener una clara y sólida justificación. Ejemplos: exposición a noxas o agentes cuyos efectos son desconocidos; exposición a drogas o químicos en niveles que pueden causar la muerte, dolor severo o gran stress; estudios de comportamiento en los cuales el nivel de stress producido se desconoce; uso de relajantes musculares o drogas que producen parálisis sin usar previa anestesia; quemaduras o traumas dolorosos en animales conscientes; y todo otro procedimiento que pueda ocasionar stress severo u ocasione dolor intenso que no pueda ser aliviado por analgésicos (por ejemplo ensayos de toxicidad o infecciones experimentales en los cuales el final del experimento es la muerte del animal). Exposición a drogas o químicos en niveles incompatibles con los sistemas fisiológicos y que induzcan un malestar crónico sin medidas paliativas. Los estudios asociados a esta categoría no debiesen ser muy prolongados o de severo daño clínico para disminuir al máximo el tiempo de exposición al dolor y aflicción. El malestar puede detectarse por marcada anomalía en los patrones de comportamiento, ausencia de "acicalamiento", deshidratación, "vocalización" anormal, anorexia prolongada; letargia; trastornos al caminar y moverse, o signos clínicos severos de infección local o sistémica.