



PAPEL DE MUL1 EN LA COMUNICACIÓN RETÍCULO ENDOPLASMICO-MITOCONDRIA EN EL CARDIOMIOCITO EXPUESTO A MIRISTATO

DANIELA BELÉN MARTÍNEZ NEIRA

Memoria de Pregrado para optar al título de Bioquímica

Directores
Dres. Valeria Garrido y Sergio Lavandero
Centro Avanzado en Enfermedades Crónicas
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Marzo 2023

Abreviaturas

ACS	: Acil-CoA sintetasa.
Akt	: Proteína serina/treonina kinasa B o PKB.
ANP	: Péptido natriurético atrial.
ATP	: Adenosín trifosfato.
BCA	: Ácido bicincóninico.
BrdU	: 5-bromo-2-desoxiuridina
BSA	: Albúmina de suero bovino.
CaM	: Calmodulina.
CAMKII	: Proteína kinasa de tipo II dependiente de Ca^{+2} /calmodulina.
CaN	: Calcineurina.
CCCP	: Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona.
CD36/FAT	: Translocasa de ácidos grasos.
CPT-1/2	: Carnitina palmitoil transferasas 1 y 2.
DAG	: Diacilglicerol.
DM	: Diabetes mellitus.
DM2	: Diabetes mellitus tipo 2.
Drp1	: Proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo 1.
ECV	: Enfermedades cardiovasculares.
ENS	: Encuesta Nacional de Salud.
FABP	: Proteína ligante de ácidos grasos.
FATP	: Proteína transportadora de ácidos grasos.
FBS	: Suero fetal bovino.
Fis1	: Proteína de la fisión mitocondrial 1.
G	: Gramo
GLUT1/4	: Proteína transportadora de glucosa 1/4.
GRP75	: Proteína chaperona de 75 kDa regulada por glucosa.
GSK3 β	: Glicógeno sintasa quinasa 3- β .
GTP	: Guanosín trifosfato.
H	: Hora
IKK $\alpha\beta$: IK quinasa.
IP3	: Inositol 1,4,5-trifosfato.
IP3R	: Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato.
IRS	: Sustrato del receptor de insulina.
kDa	: KiloDalton.
KDEL	: Dominio Lisina-Ácido Aspártico-Ácido glutámico-Leucina.
LDH	: Lactato deshidrogenasa.
MCU	: Canal uniportador mitocondrial de Ca^{+2} .
Mff	: Factor de fisión mitocondrial.
Mfn1/2	: Mitofusinas 1 y 2.
MiD49 y MiD51	: Proteínas de la dinámica mitocondrial de 49 y 51 KDa.

Min : Minuto.
mL : Mililitro.
mM : Milimolar.
mRNA : ARN mensajero.
mtDNA : ADN mitocondrial.
mtHSP70 : Proteína de shock térmico mitocondrial.
MUL1 : Proteína ubiquitina ligasa E3 mitocondrial 1.
N : número de replicados independientes de cada set experimental.
NADH : Nicotinamida adenina dinucleótido.
NFAT : Factor nuclear de células T activadas.
NF- κ B : Factor transcripcional nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
nM : Nanomolar.
OMS : Organización Mundial de la Salud.
OPA1 : Proteína de la atrofia óptica 1.
PBS : Tampón fosfato salino.
PIP2 : Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PKA : Proteína kinasa A.
PKC : Proteína kinasa C.
PLC : Fosfolipasa C.
PVDF : Fluoruro de polivinilideno.
RE : Retículo endoplásmico.
ROS : Especies reactivas de oxígeno.
RyR : Receptor de rianodina.
S : Segundo
siCtrl : siControl.
SDS : Dodecilsulfato de sodio.
SEM : Error estándar de la media.
SERCA : ATPasa de Ca^{+2} del retículo.
siRNA : ARN pequeño de interferencia.
TAG : Triacilglicerol.
TBS : Amortiguador Tris salino.
V : Voltio.
VDAC1 : Canal selectivo de aniones dependiente de voltaje de tipo 1.
 β -MHC : Isoforma β de la cadena pesada de la miosina.
 μg : Microgramo.
 μL : Microlitro.
 μM : Micromolar.

FINANCIAMIENTO

Esta memoria se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares del Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Esta memoria contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1200490 (SL) y FONDAP 15130011 (SL).

PUBLICACIONES ASOCIADAS A LA MEMORIA

Ximena Calle, Valeria Garrido-Moreno, Erik Lopez, Ignacio Norambuena-Soto, **Daniela Martínez**, Allan Peñaloza-Otárola, Angelo Troncossi, Alejandra Guerrero-Moncayo, Angélica Ortega, Vinicius Maracaja-Coutinho, Valentina Parra, Mario Chiong, Sergio Lavandero. Mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1 (MUL1) as a novel therapeutic target for diseases associated with mitochondrial dysfunction, IUBMB life.2022, doi: 10.1002/iub.2657.

PRESENTACIONES A CONGRESOS ASOCIADAS A LA MEMORIA

Ximena Calle, **Daniela Martinez**, Valentina Parra, Sergio Lavandero. Estrogen regulates mitochondrial E3 ubiquitin ligase MUL1 in hypertrophied cardiomyocytes. XLIV Annual Meeting Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology 2021, 26-28 de Octubre del 2021

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La obesidad y diabetes mellitus se caracterizan por un estado de hiperlipidemia crónica que gatilla distintos mecanismos de daño por lipotoxicidad, entre los que se incluyen: daño oxidativo, disfunción mitocondrial y apoptosis en diversos tejidos, entre ellos el corazón. MUL1 es una E3 ligasa que regula por ubiquitinación los niveles proteicos de mitofusina 2 (Mfn2). Esta proteína de la dinámica mitocondrial regula la fisión mitocondrial como la comunicación retículo endoplásmico y mitocondria para mantener homeostasis del Ca^{+2} . En el cardiomiocito, este ión no sólo es indispensable en el acoplamiento excitación-contracción sino en el metabolismo mitocondrial, hipertrofia y muerte celular.

HIPÓTESIS TEÓRICA DE TRABAJO: MUL1 media la pérdida de comunicación estructural y funcional del retículo sarcoplásmico-mitocondria en el cardiomiocito expuesto a miristato.

OBJETIVOS: Evaluar la participación de MUL1 en la disminución de los contactos RE-mitocondria inducido por miristato en el cardiomiocito.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍAS: Cardiomiocitos de cultivo primario se tratan con miristato 500 μM y su efecto hipertrófico se determina midiendo el área celular por inmunofluorescencia con marcaje de troponina C, y el marcador β -MHC por *Western blot*. Los cambios en los niveles proteicos y de mRNA1 de MUL1 se evalúan por *Western blot* y RT-qPCR. Los contactos RE-mitocondria se estudian mediante microscopía confocal, en que se analiza el grado de colocación de marcadores de la mitocondria y el RE, mtHsp70 y KDEL, respectivamente. Los niveles de Ca^{+2} citoplasmático y mitocondrial se estudian mediante el uso de sondas fluorescentes, FURA 2AM 5 μM y Rhod-2 AM 5,4 μM , respectivamente.

RESULTADOS ESPERADOS: Acorde a la literatura se espera probar el efecto hipertrófico de este ácido graso, observando un aumento en el área celular y del marcador β -MHC en los cardiomiocitos tratados con miristato 500 μ M por 24 h. También se espera que aumente los niveles proteicos de MUL1, induciendo la degradación de Mfn2 que actúa de anclaje entre el RE y la mitocondria, provocando la pérdida de estos contactos. De esta forma, se espera observar un menor nivel de colocación entre ambos organelos, acompañado de una menor entrada de Ca^{+2} a la mitocondria, y una acumulación de Ca^{+2} citoplasmático.

PROYECCIONES: MUL1 es una E3 ligasa que puede modificar post-traduccionalmente a las proteínas Mfn2 y Drp1, por ejemplo, ubiquitinando a Mfn2 para degradación proteosomal, lo que le permite regular la dinámica y función mitocondrial y los contactos RE-mitocondria. Estos mantienen la homeostasis del Ca^{+2} , controlando tanto el metabolismo energético, que es fundamental para mantener la función cardíaca, como la activación de vías de señalización relacionadas a hipertrofia del cardiomiocito. Por lo tanto, MUL1 una proteína altamente versátil, que puede estar implicada a una diversa gama de patologías relacionadas a la disfunción mitocondrial. Hay evidencia previa de un aumento de los niveles de esta proteína en modelos de hipertrofia en cardiomiocitos, sin embargo, falta dilucidar nuevos mecanismos que regulen este proceso, lo que permitiría a futuro incorporar a MUL1 en estrategias terapéuticas para enfermedades cardiovasculares.

SUMMARY

INTRODUCTION: Obesity and diabetes are characterized by chronic hyperlipidemia that triggers lipotoxic mechanisms, including oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in various tissues, including the heart. MUL1 is an E3 ligase with the capacity to ubiquitinate Mfn2 for degradation, a mitochondrial dynamics protein involved in the regulation of mitochondrial fusion and ER-mitochondrial contacts, maintaining Ca^{+2} homeostasis. In cardiomyocytes, this ion is not only essential for the excitation-contraction coupling and mitochondrial metabolism but also participates in signaling pathways related to hypertrophy and cell death.

HYPOTHESIS: MUL1 mediates the loss of structural and functional communication between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in the cardiomyocyte exposed to myristate.

AIMS: To evaluate the role of MUL1 in the reduction of ER-mitochondria contacts in cardiomyocytes treated with myristate.

EXPERIMENTAL DESIGN AND METHODS: Primary neonatal rat cardiomyocytes are stimulated with myristate 500 μ M for 24 h. To assess cardiomyocyte hypertrophy, perimeter and cell area are evaluated by immunofluorescence labeling troponin C, and increased β -MHC protein levels are measured by Western blot. Changes in mRNA and protein levels of MUL1 are assessed by Western blot and RT-qPCR. RE-mitochondria contacts are assessed by confocal microscopy, analyzing colocalization between both organelle markers mtHsp70 and KDEL, respectively. Cytoplasmic and mitochondrial Ca^{+2} levels are analyzed using fluorescent probes, FURA 2AM 5 μ M y Rhod-2 AM 5,4 μ M, respectively.

EXPECTED RESULTS: According to the literature, is expected to show the hypertrophic effect of myristate, observing an increase in cell area and β -MHC protein levels in cardiomyocytes after 24 h of treatment with myristate 500 μ M. It is also expected to prove increased MUL1 protein levels, inducing Mfn2 degradation, which has a role in ER-mitochondria tethering and therefore produces the loss of these contacts. Thus, it is expected to observe reduced colocalization between both organelles and reduced mitochondrial Ca^{+2} entry, accumulating in the cytoplasm.

PROJECTIONS: MUL1 is an E3 ligase that regulates the mitochondrial dynamics proteins Mfn2 and Drp1 by post-translational modification, for example, ubiquitinating Mfn2 for proteasomal degradation, thus altering RE-mitochondrial contacts that maintain Ca^{+2} homeostasis. This controls energetic metabolism, fundamental to sustaining cardiac function, but also the activation of signaling pathways related to cardiomyocyte hypertrophy. Therefore, MUL1 is a highly versatile protein, which can be implicated in a diverse variety of pathologies associated with mitochondrial dysfunction. There is previous evidence of an increase in this protein level in models of cardiomyocyte hypertrophy. Nevertheless, new mechanisms that regulate this process need to be elucidated, which would allow the future incorporation of MUL1 into therapeutic strategies for cardiovascular diseases.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Epidemiología de las enfermedades crónicas no transmisibles.....	13
1.2 Enfermedades metabólicas y riesgo cardiovascular.....	14
1.3 Dislipidemia y estrés lipotóxico.....	14
1.4 Metabolismo de ácidos grasos en el cardiomiocito.....	15
1.5 Hipertrofia del cardiomiocito.....	18
1.6 Papel de los ácidos grasos saturados en la hipertrofia del cardiomiocito...19	
1.7 Mitocondria.....	21
1.7.1 Maquinaria de fusión y fisión mitocondrial.....	22
1.7.2 Comunicación entre el RE y la mitocondria.....	23
1.7.3 Homeostasis de Ca ⁺² en el metabolismo mitocondrial.....	25
1.7.4 Transporte de Ca ⁺² entre el RE y la mitocondria.....	26
1.8 Mitocondria e hipertrofia del cardiomiocito.....	28
1.9 Vías hipertróficas del cardiomiocito dependientes de Ca ⁺² citoplasmático.28	
1.9.1 Acción de la norepinefrina en el cardiomiocito.....	29
1.10 E3 ligasa mitocondrial MUL1: MUL1 y sus actividades postraduccionales.....	31
1.10.1 Ubiquitinación.....	31
1.10.2 Sumoilación.....	32
1.10.3 MUL1 activadora de NF- <i>κ</i> B.....	32
1.10.4 MUL1 y su rol en la dinámica mitocondrial.....	33
1.10.5 MUL1 e hipertrofia cardíaca.....	34
2. HIPÓTESIS TEÓRICA DE TRABAJO.....	36
3. OBJETIVO GENERAL	36
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.....	37
5.1 Modelo experimental.....	37
5.2 Obtención de cultivo primario.....	37
5.3 Modelo de lipotoxicidad in vitro.....	38

5.4 Silenciamiento de cardiomiocitos.....	38
5.5 Extracción de RNA mensajero a cultivo de cardiomiocitos.....	39
5.6 Formación de cDNA.....	39
5.7 Extracción de proteínas.....	40
5.8 Western Blot.....	40
5.9 Inmunofluorescencia.....	41
5.10 Determinación del área y perímetro celular.....	42
5.11 Determinación de niveles de ATP intracelulares.....	42
5.12 Determinación del consumo de O ₂	42
5.13 Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	43
5.14 Determinación de colocalización entre RE-mitocondria.....	43
5.12 Determinación de niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca ⁺²	43
5.13 Análisis estadístico.....	44
6. RESULTADOS PROPUESTOS.....	45
6.1 Validación del modelo de hipertrofia inducido por miristato.....	45
6.2 Efecto de miristato sobre la dinámica mitocondrial.....	46
6.3 Objetivo específico 1.....	47
6.4 Objetivo específico 2.....	48
6.4.1 Ca ⁺² mitocondrial.....	48
6.4.2 Ca ⁺² citoplasmático.....	49
6.4.3 Efecto de miristato en el metabolismo energético mitocondrial.....	50
7. ANEXO: RESULTADOS PRELIMINARES Y DISCUSIÓN.....	52
7.1 Validación del modelo de hipertrofia en el cardiomiocito.....	52
7.2 Validación del silenciamiento de MUL1 mediante transfección de siRNA.....	53
7.3 Efecto de estrés lipotóxico inducido por miristato sobre niveles de MUL1.....	54
7.4 Discusión.....	56
8. CONCLUSIONES.....	60
9. BIBLIOGRAFÍA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contactos RE-mitocondria en la homeostasis del Ca^{+2}	25
Figura 2. Diagrama del efecto de NE sobre la hipertrofia del cardiomiocito.....	29
Figura 3. Funciones de MUL1.....	34
Figura 4. Esquema de trabajo propuesto.....	45
Figura 5. Efecto del miristato en la hipertrofia del cardiomiocito.....	46
Figura 6. Efecto de miristato en los niveles proteicos de Mfn2.....	47
Figura 7. Silenciamiento de MUL1 previene la pérdida de proximidad entre RE-mitocondria inducida por miristato.....	48
Figura 8. Silenciamiento de MUL1 previene la pérdida de captación de Ca^{+2} mitocondrial inducido por miristato en cardiomiocitos primarios de rata neonata.....	49
Figura 9. Silenciamiento de MUL1 previene el aumento en los niveles de Ca^{+2} citoplasmático inducido por miristato en cardiomiocitos primarios de rata neonata.....	50
Figura 10. Miristato induce alteraciones metabólicas en el cardiomiocito.....	51
Figura 11. Efecto de miristato en el área celular de los cardiomiocitos.....	52
Figura 12. Comparación de controles de ensayo de hipertrofia.....	53
Figura 13. Efecto del silenciamiento de MUL1.....	54
Figura 14. Efecto de miristato en los niveles de MUL1.....	55

INTRODUCCIÓN

1) Epidemiología de las enfermedades crónicas no transmisibles

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) corresponden a las patologías crónicas no transmisibles más prevalentes a nivel mundial, que incluyen patologías cardíacas y vasculares tales como enfermedades coronarias, cerebrovasculares, hipertensión arterial, infarto del miocardio, arritmias, insuficiencia cardíaca, trombosis y embolia pulmonar (Şahin & İlgün, 2019). Las ECV son la causa de aproximadamente un tercio de las muertes a nivel global (Wende et al, 2012), alcanzando al 31% de las muertes totales el año 2016, (WHO, 2016).

Ellas son también la principal causa de morbilidad y mortalidad en individuos con obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Wende et al, 2012; Haffar et al, 2015; Sikder et al, 2018; Sultan et al, 2019). Una situación de especial gravedad en la actualidad, ya que la obesidad y la diabetes son dos de los desafíos más importantes para la salud pública en el mundo occidental (Russo et al, 2012; Sultan et al, 2019).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2016 unos 650 millones de adultos eran obesos, correspondiendo al 13% de la población mundial, cuya prevalencia se ha triplicado en relación con el año 1975 (Aguilera et al, 2019). Mientras que la Federación Internacional de Diabetes estima que, en el año 2017 unos 450 millones de personas eran diabéticas, siendo la DM2 la más frecuente, que correspondería a un 90% de los casos (Sultan et al, 2019). En Chile, según la

Encuesta Nacional de Salud (ENS) del año 2017, el 31,2% de las personas mayores de 15 años son obesas, con un 3,2% que presenta obesidad mórbida, lo que se debe principalmente al sedentarismo, que alcanza un 86,7%. Por otro lado, la sospecha de DM ya alcanza un 12,3% (Minsal, 2017).

2) Enfermedades metabólicas y riesgo cardiovascular

Las personas con obesidad suelen presentar factores de riesgo descritos en el estudio de Framingham, como hipertensión arterial, diabetes y dislipidemia, aumentando su predisposición a sufrir un infarto del miocardio y posterior progresión a una cardiomiopatía isquémica (Szczepaniak et al, 2007). En individuos con obesidad mórbida existe una relación directa entre el porcentaje de sobrepeso y la masa del ventrículo izquierdo. El llenado diastólico empeora progresivamente a medida que aumenta la masa del ventrículo, la dimensión interna del ventrículo izquierdo en diástole, la presión sistólica y estrés parietal sistólico del ventrículo izquierdo (Alpert et al, 1995). Por otra parte, la DM se considera una causa indirecta de patologías cardíacas, siendo un factor de riesgo para ECV como la aterosclerosis e hipertensión arterial, y puede también generar cardiomiopatía diabética, que se produce de forma independiente a las alteraciones vasculares (Szczepaniak et al, 2007; Haffar et al, 2015). La cardiomiopatía diabética se asocia a la acumulación de lípidos que gatillan mecanismos de lipotoxicidad (Russo et al, 2012; Haffar et al, 2015).

3) Dislipidemia y estrés lipotóxico

Durante el desarrollo fetal, el corazón obtiene la mayor parte de la energía a partir de la glicólisis y la oxidación del lactato, pero luego del nacimiento, la tasa de oxidación de ácidos grasos aumenta drásticamente, hasta un 75% de utilización (Hickson-Bick et al, 2000). Sin embargo, niveles crónicamente altos de ácidos grasos circulantes pueden causar DM2, obesidad e hiperlipidemia, lo que reduce la capacidad de utilización de glucosa (Hickson-Bick et al, 2000), a causa de una disminución en la expresión y traslocación de los transportadores GLUT1/GLUT4 (Sikder et al, 2018). Este efecto se compensa con una dependencia casi absoluta de la β -oxidación de ácidos grasos como fuente de energía, lo que produce mayor estrés oxidativo y puede llevar a disfunción mitocondrial (Sikder et al, 2018).

En el cardiomiocito, la mitocondria es también la principal fuente de especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden reaccionar rápidamente con mtDNA, RNA y proteínas de la maquinaria mitocondrial, como también con lípidos acumulados en su membrana interna, que son más susceptibles a peroxidación, causando daño oxidativo y disfunción mitocondrial (Schrauwen et al, 2010). Efectos como el estrés oxidativo y daño al mtDNA afectan la integridad mitocondrial, produciendo insuficiencia energética y una incapacidad de suplir la función celular, que puede desencadenar apoptosis, incidiendo así en el desarrollo de ECV (Sikder et al, 2018).

4) Metabolismo de ácidos grasos en el cardiomiocito

La función contráctil requiere un suministro de energía constante a través de la generación de ATP por parte de la mitocondria, cuyos 75% proviene de la β -

oxidación de ácidos grasos, y el resto de glucosa, piruvato, aminoácidos, lactato y cuerpos cetónicos (de Vries et al, 1997; Wende et al, 2012; Schulze et al, 2016). La principal fuente de ácidos grasos intracelulares en los cardiomiocitos proviene de la captación desde el fluido extracelular, debido a que tienen una muy baja capacidad de sintetizarlos en forma independiente o de almacenarlos (Chiu et al, 2001; Gao et al, 2015). Se suministran en forma de ácidos grasos libres unidos a albúmina, o hidrolizados por lipasas a partir de triacilglicerol (TAG) contenido en quilomicrones o lipoproteínas (Lopaschuk et al, 2010).

Los ácidos grasos atraviesan la membrana sarcolemal del cardiomiocito mediante difusión pasiva, o facilitada por transportadores (Lopaschuk et al, 2010) como la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), la proteína ligante de ácidos grasos (FABP) y la translocasa de ácidos grasos (CD36/FAT), esta última media el 50-60% del transporte ácidos grasos (Chiu et al, 2001; Lopaschuk et al, 2010). Una vez que entra al citoplasma se une a la FABP y ocurre el primer paso del metabolismo, que es la formación de ésteres de coenzima A por la acil-CoA sintetasa (ACS) (Kong & Rabkin, 2000, Chiu et al, 2001). Estos se transportan al interior de la mitocondria por medio de las carnitina palmitoil transferasas 1 y 2 (CPT-1/2), en donde se someten a β -oxidación para producir ATP (Kong & Rabkin, 2000). En condiciones patológicas, como obesidad y DM2, ocurre un desbalance entre la captación y oxidación de ácidos grasos, acumulando lípidos en el corazón (Goldberg et al, 2012). Este desbalance corresponde a un aumento de la captación de ácidos grasos que supera a la capacidad de oxidación por parte de la mitocondria, y

promueve el desarrollo de hipertrofia cardíaca en isquemia e insuficiencia cardíaca, que contribuye a disfunción contráctil y arritmias (Chiu et al, 2001).

Por ejemplo, en la DM2, los altos niveles de ácidos grasos circulantes aumentan su captación en el cardiomiocito, pero sobrepasa su metabolismo oxidativo, derivándolos a vías alternativas y generando lipotoxicidad, debido a la acumulación de lípidos y metabolitos tóxicos, como ceramidas y diacilglicerol (DAG) (Bekhite et al, 2021). La acumulación de ceramidas produce disfunción contráctil del cardiomiocito, disfunción mitocondrial, mitofagia y apoptosis (Bekhite et al 2021). Mientras que el DAG activa a la proteína kinasa C (PKC), promoviendo la resistencia a la insulina, dado que PKC fosforila al sustrato del receptor de insulina (IRS) en residuos de serina, disminuyendo así la fosforilación en tirosina estimulada por insulina, lo que inhibe la vía insulina-PI3K-Akt (Erion et al, 2010).

Los ácidos grasos tienen un rol importante en una amplia gama de procesos biológicos en las células musculares cardíacas, ya que pueden ser parte de los fosfolípidos de membrana o de la transducción de señales (de Vries et al, 1997). Se distinguen tres tipos de ácidos grasos de cadena larga, los saturados, como el miristato y palmitato, insaturados (oleato), y los poliinsaturados (linoleato). Los ácidos grasos saturados se asocian a efectos nocivos en cardiomiocitos, mientras que los insaturados y poli-insaturados se consideran no tóxicos y posiblemente protectores (Haffar et al, 2015).

Los ácidos grasos saturados contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, siendo a su vez factores de riesgo de la DM2 (Ebbesson et al, 2010). La exposición de cardiomiocitos con niveles fisiológicos de ácidos grasos de cadena larga, como el palmitato, disminuye el metabolismo oxidativo de ácidos grasos, pero aumenta su utilización en vías biosintéticas, como la síntesis de triglicéridos y esfingolípidos (Hickson-Bick et al, 2000). También estos ácidos grasos producen fragmentación del DNA, retracción nuclear y liberación de proteínas citosólicas como LDH y FABP, mostrando que pueden causar muerte celular incluso a baja concentración (de Vries et al, 1997).

5) Hipertrofia del cardiomiocito

El corazón es un órgano altamente adaptable y que presenta la capacidad de remodelado celular al exponerse a estímulos fisiológicos y patológicos. El corazón aumenta su tamaño en respuesta a una sobrecarga sostenida, proceso conocido como hipertrofia cardíaca. Esta respuesta puede darse de forma compensatoria, o patológica si ocurre de manera crónica (Gutiérrez et al, 2014, Garrido et al, 2019). Patologías como la hipertensión arterial, isquemia y el envejecimiento inducen estrés mecánico y neurohumoral crónico, promoviendo la hipertrofia patológica y el desarrollo de insuficiencia cardíaca (Garrido et al, 2019).

A nivel celular, la hipertrofia se caracteriza por un aumento de la síntesis de proteínas, del número de sarcómeros y del tamaño del cardiomiocito, con metabolismo energético mitocondrial alterado, sumado a cambios en la expresión génica y en la función mecánica (Pennanen et al, 2014; Garrido et al, 2019).

Inicialmente, la hipertrofia del cardiomiocito puede ser beneficiosa debido a que mejora la función del miocardio, pero si la sobrecarga es crónica, lleva a un crecimiento patológico de los cardiomiocitos, con alteraciones en la matriz extracelular y en la expresión de ciertas proteínas contráctiles, y a una pérdida de la respuesta adrenérgica (Pennanen et al, 2014). La hiperlipidemia crónica se asocia a cambios morfológicos y funcionales del corazón, como la hipertrofia y disfunción del ventrículo izquierdo, que son precursoras de patologías más severas (Sikder et al, 2018).

6) Papel de los ácidos grasos saturados en la hipertrofia del cardiomiocito

La esteatosis del miocardio se relaciona a la hipertrofia y disfunción ventricular que progresa a cardiomiopatía lipotóxica (Szczepaniak et al, 2007). Si bien la energía para el corazón se obtiene de la oxidación de ácidos grasos saturados e insaturados, estudios *in vitro* mostraron efectos nocivos de los ácidos grasos saturados en cultivos de cardiomiocitos de rata, incluso a niveles fisiológicos (de Vries et al, 1997). Este efecto se explica principalmente porque los ácidos grasos promueven la síntesis de especies lipotóxicas, como ceramidas y diacilglicerol (DAG) (Szczepaniak et al, 2007; Gao et al, 2015).

La síntesis de ceramidas depende de las ceramidas sintasas, la esfingomielinasa y la serina palmitoiltransferasa (Szczepaniak et al, 2007). Algunas ceramidas, como las C14 y C16, han mostrado promover la hipertrofia del cardiomiocito (Gao et al, 2015), como también efectos proapoptóticos (Szczepaniak et al, 2007). Por su parte, el DAG se forma por la acción de agonistas de receptores acoplados a proteína Gq,

que activan la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) mediada por fosfolipasa C (PLC), produciendo DAG e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Takeishi et al, 2007; Zhang et al, 2013). El DAG es un potente activador de la PKC, regulando procesos de crecimiento y diferenciación celular (Takeishi et al, 2007). El DAG media la hipertrofia del cardiomiocito inducida por norepinefrina, endotelina-1 e isoproterenol, al estar acoplada a la activación de PLC ϵ (Zhang et al, 2013).

Existen evidencias que el miristato es un agente pro-hipertrófico. Al respecto, el grupo de Riquelme et. al, 2011 mostró que la pitón birmana luego de una alta ingesta de comida desarrolla hipertrofia cardíaca en ausencia de hiperplasia, observando un 40% de aumento de la masa del corazón luego de 48 a 72 h. La hipertrofia cardíaca se explicó por un incremento del tamaño de los cardiomiocitos, sin cambios en la proliferación celular. Pese al gran aumento de triglicéridos y ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo, no se observó depósito de lípidos en el corazón, y presentó una mayor capacidad antioxidante y actividad *scavenger* de radicales libres.

La adición del plasma de la pitón a cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata mostró aumento del tamaño celular y en la organización de α -actina, pero con una menor actividad del factor nuclear de células T activadas (NFAT), descartando el desarrollo de hipertrofia patológica. Estas evidencias sugirieron la presencia de factores pro-hipertróficos fisiológicos en el plasma post-pandrial de la pitón. El tratamiento previo con calor y proteinasa K del plasma de pitón alimentada no eliminó el efecto de estos factores sobre la hipertrofia del cardiomiocito,

descartando que correspondieran a factores proteicos. No obstante, un inhibidor irreversible de la traslocasa de ácidos grasos CD36 bloqueó totalmente el efecto pro-hipertrófico del plasma, sugiriendo que corresponden a ácidos grasos. Los candidatos identificados por cromatografía de gases fueron el ácido mirístico (C:14), ácido palmítico (C:16) y ácido palmitoleico (C16:1n7), que presentaron distintos patrones de abundancia a lo largo de la digestión (Riquelme et al, 2011).

Otros estudios han relacionado al miristato, principal constituyente de la grasa de la leche, a resistencia a la insulina y síndrome metabólico en humanos (Russo et al, 2012). En los glóbulos rojos, el miristato se asocia a alteraciones en parámetros del metabolismo de la glucosa, como el nivel de insulina en ayunas, el test de tolerancia a la glucosa y el índice de resistencia a la insulina (Ebbesson et al, 2010; Russo et al, 2012). También se ha descrito que este ácido graso puede causar disfunción e hipertrofia cardíaca (Russo et al, 2012). Datos de nuestro grupo de investigación mostraron que el tratamiento de cardiomiocitos con miristato por 24 h promovió el desarrollo de hipertrofia, evidenciando un aumento del marcador de hipertrofia β -MHC y del área celular junto a desensibilización a insulina (Vásquez, 2018).

7) Mitocondria

La mitocondria posee dos membranas que separan cuatro compartimentos diferentes, la membrana externa, el espacio intermembrana, una membrana interna y la matriz mitocondrial (Bravo et al, 2017; Zhang et al, 2018). La membrana interna tiene una composición lipídica que la hace impermeable a la mayoría de metabolitos

y iones. Ella presenta invaginaciones o crestas mitocondriales, en las que se localizan los complejos de la cadena transportadora de electrones (Bravo et al, 2017). Estas crestas pueden ser remodeladas en períodos de alta demanda energética, aumentando su número y densidad, o generar una apertura de sus uniones, que permita la liberación de factores pro-apoptóticos (Bravo et al, 2017). Dado su papel en la producción de energía, este organelo es fundamental para la sobrevivencia celular y la homeostasis de iones.

Es además una estructura altamente dinámica, que experimenta constantes cambios en su masa, morfología, localización y composición, según los requerimientos celulares (López et al, 2017). La red mitocondrial mantiene un equilibrio dinámico entre la fusión y fisión, lo que le permite regular variados procesos, como la división celular, la apoptosis, autofagia y el envejecimiento (Zhang et al, 2018). También son las principales generadoras de ROS, que puede contribuir significativamente en enfermedades crónicas como el cáncer y ECV (Bravo et al, 2017). Por esta razón, la disfunción de este organelo contribuye al desarrollo de variadas patologías, principalmente en órganos de alta demanda energética, como el músculo, el cerebro y el corazón (Bravo et al, 2017).

7.1) Maquinaria de fusión y fisión mitocondrial

Durante el desarrollo de hipertrofia en el cardiomiocito se producen múltiples alteraciones funcionales que incluyen los procesos de dinámica mitocondrial (López et al, 2017), induciendo la fragmentación y disfunción de este organelo, lo cual genera un desbalance en la bioenergética celular (Xue et al., 2019).

Tanto la fisión como la fusión están reguladas por GTPasas de alta masa molecular (Bravo et al, 2017). En el caso de la fisión, el proceso se regula por la proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo 1 (Drp1), localizada en el citosol. Esta es reclutada a la membrana mitocondrial externa por la proteína de fisión mitocondrial (Fis1), formando un anillo de constricción que produce la fragmentación (Bravo et al, 2017, López et al, 2017, Pennanen et al, 2014). Drp1 se regula por fosforilación dependiente de la proteína kinasa A (PKA) e inhibe su translocación a la membrana externa, favoreciendo la fusión mitocondrial (Pennanen et al, 2014; Bravo et al, 2017). Por el contrario, la fosfatasa calcineurina (CaN), activada por un aumento del Ca^{+2} citosólico, desfosforila a Drp1, promoviendo su reclutamiento a la membrana externa e induciendo fisión mitocondrial y su forma circular, ampliamente asociada al fenotipo hipertrófico en cardiomiocitos de rata (Garrido et al, 2019). Este proceso se encuentra también regulado por otras proteínas de fisión como Mff, MiD49 y MiD51 (Bravo et al, 2017).

Las proteínas mitofusinas 1 y 2 (Mfn1/2) y Opa-1 (Pennanen et al, 2014; Bravo et al, 2017, López et al, 2017) son protagonistas de la fusión mitocondrial. En este proceso, las mitofusinas que están ubicadas en la membrana de dos mitocondrias adyacentes pueden interaccionar entre sí para fusionar sus membranas mitocondriales externas (Torrealba et al, 2017). Posteriormente, la proteína Opa-1 localizada en la membrana mitocondrial interna y en el espacio intermembrana (López et al, 2017) se encarga de la fusión de las membranas internas y la

estructuración de las crestas mitocondriales (Bravo et al, 2017, López et al, 2017; Torrealba et al, 2017).

7.2) Comunicación entre el RE y la mitocondria.

El RE es una red extensa de cisternas y microtúbulos interconectadas, que se extienden desde la envoltura nuclear a la superficie celular (Zhang et al, 2018), y morfológicamente pueden formar desde láminas perinucleares hasta túbulos periféricos (López et al, 2017). Funciona como sitio de síntesis de proteínas y de regulación de su plegamiento, transporte y degradación (López et al, 2017; Zhang et al, 2018) y participa también de la biosíntesis de lípidos (López et al, 2017). Además, actúa como un reservorio de Ca^{+2} que puede ser activado por estimulación eléctrica y química (Zhang et al, 2018).

El Ca^{+2} es un segundo mensajero que en los cardiomiocitos media la mayor parte de los efectos β -adrenérgicos en la función cardíaca, y cumple un rol fundamental en el acoplamiento excitación-contracción (Khalilimeybodi et al, 2018). La contractilidad repetitiva y mediada por Ca^{+2} de los cardiomiocitos los hace críticamente dependientes de la mitocondria, debido a su alta capacidad de suministrar energía en forma constante y de mantener la homeostasis de este ión (López et al, 2017). La mitocondria también puede comunicarse de forma física y funcional mediante sitios de contactos con otros organelos, tales como el núcleo, lisosomas y peroxisomas y el RE (Zhang et al, 2018). Esto le permite mantener funciones esenciales como la proliferación y diferenciación celular, inmunidad

celular, homeostasis de Ca^{+2} y hierro, metabolismo de lípidos, envejecimiento, muerte celular y producción de ROS (Torrealba et al, 2017). Los primeros en ser descritos fueron los contactos RE-mitocondria, que corresponden a plataformas de señalización implicadas en procesos como el intercambio de lípidos, inflamación, autofagia, apoptosis, y de mayor relevancia, la transferencia de Ca^{+2} (Gutiérrez et al, 2014, Bravo et al, 2017, López et al, 2017; Zhang et al, 2018; Garrido et al, 2019).

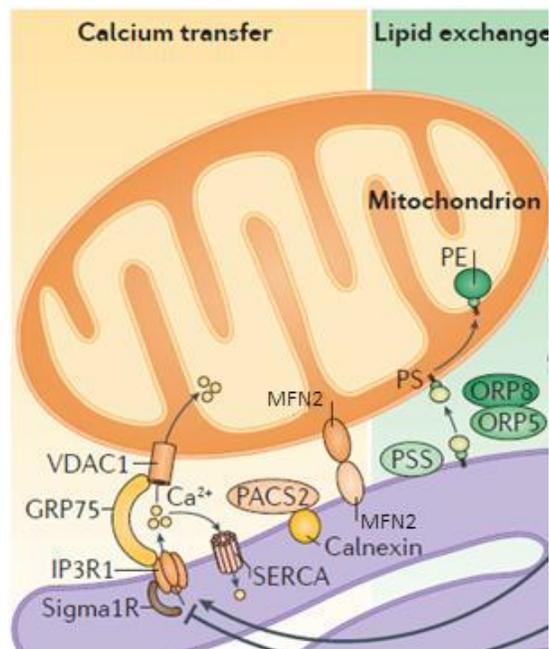


Figura 1: Contactos RE-mitocondria en la homeostasis del Ca^{+2} . En estos se encuentran diversos receptores/canales como el IP3R, ubicado en el RE, que se une por medio de la proteína GRP75 al canal VDAC1 ubicado en la membrana mitocondrial externa. Finalmente, el Ca^{+2} atraviesa la membrana interna de la mitocondria por medio del transportador MCU. La cercanía entre ambos organelos es fundamental para la formación de estos contactos, y está regulada por Mfn2, que se encuentra en la superficie del RE y la mitocondria, donde forma dímeros que favorecen la unión entre estos organelos. [Adaptado de López-Crisosto et al 2017].

7.3) Homeostasis de Ca⁺² en el metabolismo mitocondrial

En la mitocondria, el Ca⁺² puede estimular el metabolismo oxidativo, ya que promueve la actividad de deshidrogenasas del ciclo de Krebs, como también un incremento en la producción total de AMP cíclico (cAMP), aumento la producción de ATP (Garrido et al, 2019). No obstante, se requiere una fina regulación de la homeostasis de este ión debido a que si bien un aumento en el Ca⁺² mitocondrial puede beneficiar su metabolismo, también puede tener efectos tóxicos (Bravo et al, 2017, Garrido et al, 2019, López et al, 2017). Un exceso de Ca⁺² sensibiliza a la mitocondria frente a un estímulo pro-apoptótico, disminuyendo el umbral para la apertura del poro de transición mitocondrial (Bravo et al, 2017). Por otro lado, un aumento sostenido de Ca⁺² citosólico puede activar vías de señalización como las vías de la CaN y de la proteína quinasa de tipo II dependiente de Ca⁺²/calmodulina (CAMKII), (López et al, 2017) asociados a hipertrofia e insuficiencia cardíaca (López et al, 2017, Garrido et al, 2019).

7.4) Transporte de Ca⁺² entre el RE y la mitocondria

En los contactos RE-mitocondria están presentes complejos multiprotéicos que incluyen diferentes transportadores de Ca⁺² (Figura 1) que median su liberación desde el interior del RE hacia el citosol, y su captación por parte de la mitocondria (Bravo et al, 2017). En primer lugar, en el RE se encuentra el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R), un canal de liberación de Ca⁺² que se une al canal selectivo de aniones dependiente de voltaje de tipo 1 (VDAC1), ubicado en la membrana

mitocondrial externa (Gutiérrez et al, 2014, Garrido et al, 2019). VDAC1 corresponde a un canal multifuncional, que permite el paso desde el citosol a la mitocondria del Ca^{+2} y otros metabolitos relacionados al metabolismo energético, como succinato, malato, piruvato, NADH, ATP, ADP y fosfatos, que previenen la sobrecarga de Ca^{+2} mitocondrial mediante la precipitación de fosfato de calcio (Bravo et al, 2017). Ambos canales se unen mediante la proteína chaperona de 75 kDa regulada por glucosa (GRP75) a través de sus porciones citosólicas (Szabadkai et al, 2006). Finalmente, el Ca^{+2} debe atravesar la membrana interna a través del canal uniportador mitocondrial de Ca^{+2} (MCU), que es de baja afinidad, pero altamente selectivo. Por esta razón, las mitocondrias suelen localizarse en microdominios de alta concentración de Ca^{+2} cercanos a los canales de liberación desde el RE (Gutiérrez et al, 2014; Bravo et al, 2017; Garrido et al, 2019). Este último paso limita la velocidad de la captación de Ca^{+2} mitocondrial, ya que requiere de una fosforilación oxidativa activa, que genere una gradiente de H^{+} traslocados a través de la membrana interna y proporcione la fuerza electroquímica necesaria para la entrada de Ca^{+2} (López et al, 2017; Bravo et al, 2017).

También se han descrito otras proteínas reguladoras localizadas en la interfase de ambos organelos, como la Mfn2, el receptor de rianodina (RyR) y la ATPasa de Ca^{+2} del RE (SERCA), y el cambio en algunas de estas proteínas puede conducir al desarrollo de hipertrofia del cardiomiocito (Gutiérrez et al, 2014). Por ejemplo, se ha mostrado que la reducción de los niveles de proteína Mfn2 se observa en modelos de hipertrofia tanto *in vitro* como *in vivo* (Garrido et al, 2019), en que una reducción

de sus niveles puede inducir hipertrofia del cardiomiocito en ausencia de tratamiento con agonistas adrenérgicos (Pennanen et al, 2014). En cardiomiocitos, se ha observado que la disminución de Mfn2 aumenta la distancia que separa al RE y la mitocondria (López et al, 2017).

8) Mitocondria e hipertrofia del cardiomiocito.

La señalización celular implicada en la respuesta hipertrófica ha sido ampliamente investigada, siendo el Ca^{+2} un elemento crucial (Gutiérrez et al, 2014; Bravo et al, 2017; López et al, 2017; Garrido et al, 2019). Durante la hipertrofia patológica se observa una pérdida a nivel estructural y funcional en la comunicación RE-mitocondria, alterando la bioenergética mitocondrial (Garrido et al, 2019). Estos cambios producen muerte celular y un remodelado estructural irreversible, que produce disfunción contráctil, dilatación ventricular, e insuficiencia cardíaca (Gutiérrez et al, 2014; Pennanen et al, 2014; Garrido et al, 2019).

9) Vías hipertróficas del cardiomiocito dependientes del Ca^{+2} citoplasmático.

La CaN, una serina/treonina fosfatasa dependiente de Ca^{+2} y calmodulina (CaM), es un mediador ampliamente estudiado en la respuesta hipertrófica (Khalilimeybodi et al, 2018). Su activación depende de un aumento sostenido del Ca^{+2} citosólico (Wilkins et al, 2003), que se une a CaM y activa a la fosfatasa CaN y a la CaMKII (MacDonnell et al, 2009). Luego CaN puede desfosforilar a NFAT (Figura 2), factor de transcripción que se encuentra hiperfosforilado y retenido en el citosol, pero que luego de la desfosforilación transloca rápidamente al núcleo (Wilkins et al, 2003),

donde activa la expresión de genes asociados a anti-apoptosis y pro-hipertrofia (MacDonnell et al, 2009), incluyendo genes del programa fetal génico como ANP, BNP y β -MHC (Garrido et al, 2019). Por otro lado, existen también proteínas con una función contraria a la CaN, como la glicógeno sintasa kinasa 3- β (GSK3 β) y la PKA que fosforilan a NFAT en el citoplasma y el núcleo, y facilitan su exporte nuclear (Wilkins et al, 2003; Khalilimeybodi et al, 2018).

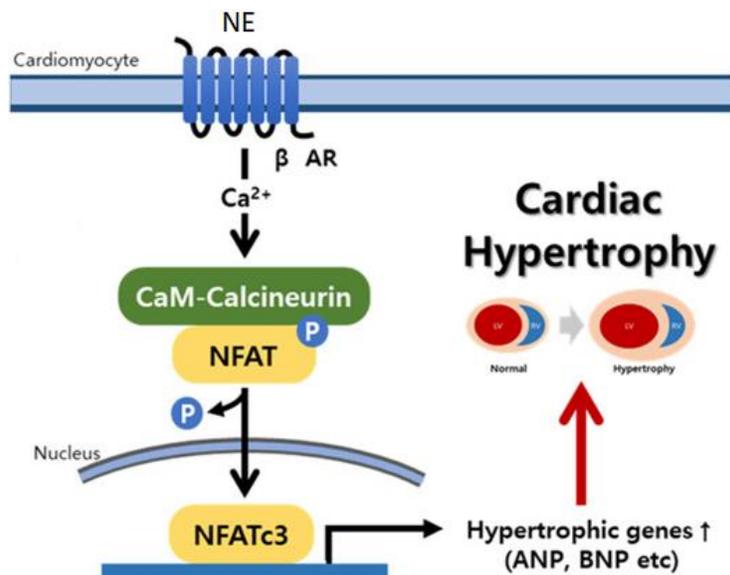


Figura 2: Diagrama del efecto de noradrenalina (NE) sobre la hipertrofia del cardiomiocito. La NE produce la disrupción de los contactos RE-mitocondria, produciendo un aumento del Ca^{+2} citosólico. Esto lleva a la activación de la vía hipertrófica del cardiomiocito, en que el Ca^{+2} se une a CaM para activar a CaN. Esta última desfosforila al factor de transcripción NFAT, que se encuentra retenido en el citoplasma, y luego se traslada al núcleo e induce la expresión del programa génico fetal, aumentando marcadores de hipertrofia cardíaca como ANP y BNP. [Adaptado de Hong et al 2021].

9.1) Acción de la norepinefrina en el cardiomiocito.

La norepinefrina (NE) es un agente fisiológico pro-hipertrófico (Gutiérrez et al, 2014, Pennanen et al, 2014; Garrido et al, 2019). La NE induce un aumento del área y

perímetro del cardiomiocito como también en la sarcomerización y la re-expresión del programa génico fetal, aumentando marcadores como el péptido natriurético atrial (ANP) (Garrido et al, 2019). Esta hipertrofia se asocia a una disminución del metabolismo mitocondrial debida a que la NE promueve la fisión mitocondrial, caracterizada por una disminución del volumen mitocondrial y un aumento del número de mitocondrias por célula (Pennanen et al, 2014). A nivel de metabolismo se ha mostrado que reduce el potencial de membrana mitocondrial, los niveles intracelulares de ATP y la actividad de la cadena transportadora de electrones (Pennanen et al, 2014; Garrido et al, 2019).

Niveles fisiológicos de NE ejercen efectos cronotrópicos e ionotrópicos al activar los receptores β -adrenérgicos en el cardiomiocito. Sin embargo, niveles crónicamente altos de NE producen la internalización y desensibilización de estos receptores, promoviendo la activación de α 1-adrenoreceptores acoplados a proteína G (Pennanen et al, 2014; Garrido et al, 2019). La activación de estos receptores aumenta los niveles de IP3 citosólicos, estimulando la liberación de Ca^{+2} desde el RE a través del canal IP3R (Garrido et al, 2019). El aumento de Ca^{+2} citoplasmático activa a la CaN, que desfosforila a Drp1 y promueve su migración a la membrana, favoreciendo la fisión mitocondrial (Pennanen et al, 2014).

Además, la NE induce la pérdida de contactos RE-mitocondria a nivel funcional y estructural, lo que disminuye la captación de Ca^{+2} por parte de la mitocondria,

perjudicando también al metabolismo oxidativo (Gutiérrez et al, 2014; Garrido et al, 2019). Esta desconexión lleva a la activación de vías pro-hipertróficas que dependen del Ca^{+2} citosólico, como son la vía CaN/NFAT (Garrido et al, 2019).

10) E3 ligasa mitocondrial MUL1

Nuestros datos han mostrado que el tratamiento con miristato 500 μM por 24 h aumenta los niveles de la proteína MUL1 (Vásquez, 2018). Esta proteína localizada en la membrana mitocondrial externa desempeña múltiples funciones (Figura 3) (Li et al, 2008; Braschi et al, 2009; Peng et al, 2016). Mul1 se encuentra principalmente en el corazón, siendo altamente expresada en modelos de estudio como cardiomiocitos primarios de rata y ratón (Li et al, 2008; Peng et al, 2016). Mul1 corresponde a una proteína de 40 kDa con ortólogos identificados en otros modelos, desde moscas a vertebrados, e incluso en plantas.

MUL1 y sus actividades postraduccionales

10.1) Ubiquitinación. La proteína MUL1 presenta actividad E3 ligasa, siendo fundamental para la actividad proteolítica del sistema ubiquitina-proteosoma, ya que corresponde a uno de los tres componentes que participan de la cascada de transferencia de ubiquitina. Estos son; la enzima E1 activadora de ubiquitina, la enzima E2 conjugadora de ubiquitina y el factor E3 ubiquitina ligasa, siendo este último al que corresponde MUL1, y que otorga la especificidad por el sustrato y mejora la velocidad de reacción (Li et al, 2008; Braschi et al, 2009; Bae et al, 2012).

Esta actividad E3 ligasa depende de un dominio RING C-terminal que se encuentra orientado hacia el citosol, lo que le permite interactuar con otros componentes del sistema ubiquitina-proteosoma (Li et al, 2008; Peng et al, 2016) y presenta un corto extremo N-terminal también orientado hacia el citosol (Li et al, 2008). De esta manera, Mul1 ubiquitina distintas moléculas de señalización como Mfn2, Akt, p53 and ULK1, afectando diversos procesos celulares, como la dinámica mitocondrial, proliferación celular, apoptosis y mitofagia (Peng et al, 2016).

10.2) Sumoilación. Su dominio RING-finger también le permite realizar otro tipo de modificación postraduccional en proteínas, como la sumoilación (Braschi et al, 2009; Peng et al, 2016), teniendo efectos sobre diversos procesos como la regulación de la estabilización, actividad, localización e interacción de proteínas (Peng et al, 2016; Braschi et al, 2009). La sumoilación es la actividad fisiológica predominante de MUL1 para mantener la morfología mitocondrial (Calle et al, 2022) y es la primera SUMO E3 ligasa asociada funcionalmente a la mitocondria. Las caracterizadas previamente se localizan principalmente en el núcleo (Braschi et al, 2009). El dominio RING-finger ubicado hacia el lado citosólico de la membrana externa mitocondrial también permite la sumoilación de proteínas de organelos cercanos, como el retículo endoplásmico y peroxisomas, a través de la transferencia de vesículas derivadas de la mitocondria, como también de otros elementos citosólicos (Braschi et al, 2009).

10.3) MUL1 activadora de NF- κ B. MUL1 ubiquitina a Akt para su degradación, preferentemente en su forma fosforilada, perjudicando la proliferación y viabilidad

celular (Bae et al, 2012). No obstante, MUL1 también ha sido identificada como un activador del factor transcripcional NF κ B, que a su vez puede ser activado por Akt, regulando la señalización entre la mitocondria y el núcleo. (Li et al, 2008; Bae et al, 2012; Peng et al, 2016). Akt activa por fosforilación a la IK kinasa (IKK $\alpha\beta$), que fosforila a I κ B, un inhibidor de NF κ B que es ubiquitinado y degradado, permitiendo que NF κ B se libere y transloque al núcleo (Bai et al, 2009; Bae et al, 2012), donde induce la expresión de agentes proinflamatorios, como citocinas y quimiocinas, y regula al inflamasoma NLPR3 (Liu et al, 2017). Estos efectos de MUL1 sobre NF κ B y Akt, si bien parecen contradictorios, se ejercen en forma simultánea e independiente (Bae et al, 2012). La activación de NF κ B por MUL1 depende de su dominio RING-finger, que interacciona y ubiquitina a TRAF2. Luego TAK1 e IKK se reclutan en las cadenas de poliubiquitina y TAK1 fosforila IKK β , induciendo la fosforilación y degradación del inhibidor I κ B α (Zemlirli et al, 2014).

10.4) MUL y su rol en la dinámica mitocondrial

La regulación de MUL1 de la dinámica mitocondrial involucra elementos de señalización que son integrales o que pueden asociarse a la membrana mitocondrial (Li et al, 2008). La actividad de MUL1 es esencial para regular la dinámica mitocondrial tanto en estado basal como durante la muerte celular (Li et al, 2008). En modelos de sobreexpresión, MUL1 promueve la fragmentación, despolarización y remoción de las mitocondrias a través de la mitofagia (Lokireddy et al, 2012). Esta proteína está implicada en la fisión mitocondrial debido a que ubiquitina a Mfn2, proteína de fusión que es también fundamental en la mantención de la estabilidad

genómica del DNA mitocondrial (Lokireddy et al, 2012). También puede estimular la fisión mediante la sumoilación de la proteína citosólica Drp1, lo que aumenta sus niveles proteicos y estabiliza su unión a la membrana externa de la mitocondria (Li et al, 2008; Braschi et al, 2009; Lokireddy et al, 2012). Además, MUL1 de interferir con la morfología de las mitocondrias, puede cambiar también su tráfico, alterando su ubicación subcelular (Li et al, 2008).

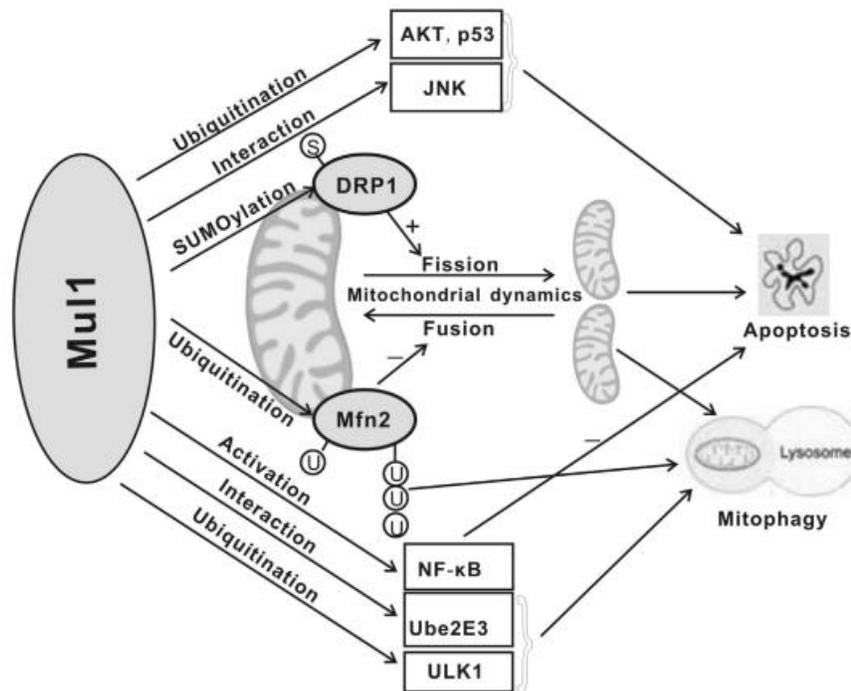


Figura 3: Funciones de MUL1. Esta E3 ligasa 1) promueve la fisión mitocondrial a través de sumoilación de DRP1; 2) suprime la fusión mitocondrial a través de la ubiquitinación de Mfn2; 3) la activación de NF-κB mediada por MUL1 inhibe la apoptosis; 4) la ubiquitinación de AKT, p53 o ULK1 por MUL1 contribuye a la apoptosis o mitofagia; 5) la interacción entre MUL1 y JNK o Ube2E3 contribuye a la apoptosis o mitofagia. [Adaptado de Peng et. al, 2016].

10.5) MUL1 e hipertrofia cardiaca

Como ya fue mencionado, en el tratamiento de cardiomiocitos primarios de rata neonata con miristato 500 μ M durante 24 h genera hipertrofia, ya que aumenta el área celular cerca de un 34%, acompañado de un incremento en los niveles del marcador β -MHC. Por otro lado, el miristato también aumenta los niveles proteicos de MUL1 y disminuye los niveles de Mfn2. Este efecto es prevenido si se silencia MUL1 previo al tratamiento con miristato, lo que sugiere que MUL1 desempeña un rol en la hipertrofia por estrés lipotóxico (Vásquez, 2018). Lo anterior fue también corroborado por Zhao et al, 2017, observándose los mismos resultados utilizando un estímulo hipertrófico con fenilefrina sobre cardiomiocitos primarios de rata, lo que también lograron replicar mediante la sobreexpresión de mir-485-5p, un inhibidor de MUL1 conservado en humanos, ratones y ratas. Estos antecedentes sugieren que MUL1 promovería la hipertrofia del cardiomiocito, que puede deberse a su capacidad de ubiquitinar a Mfn2, una proteína reguladora de la dinámica mitocondrial y que participa de los contactos RE-mitocondria.

HIPÓTESIS TEÓRICA DE TRABAJO

MUL1 media la pérdida de comunicación estructural y funcional del retículo sarcoplásmico-mitocondria en el cardiomiocito expuesto a miristato.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de Mul1 en la disminución de contactos RE-mitocondria inducida por miristato en el cardiomiocito.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar si miristato a través de MUL1 promueve la pérdida estructural del acoplamiento RE-mitocondria en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.
- 2) Estudiar si miristato a través de MUL1 conduce a la pérdida funcional de la comunicación RE-mitocondria en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

Modelo experimental:

Se utilizarán cardiomiocitos ventriculares primarios de rata neonata, obtenidos 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. Los protocolos se aprueban por el Comité de Ética Institucional. Esta tesis se financia con el apoyo del proyecto FONDECYT 1200490.

Obtención de cultivo primario:

Se extraen los corazones de rata y se lavan en medio Hanks a 37°C. Se separan las aurículas del ventrículo, y se realiza el picado del tejido en el mismo medio. Se realizan de 5 a 6 digestiones en baño de agitación durante 15 min, con 5 mL de medio de digestión a 37°C con colagenasa tipo II (20 mg/100 mL Hanks) y pancreatina (60 mg/100 mL Hanks). Luego de la primera digestión, se descarta el sobrenadante para eliminar células muertas y elementos de la sangre que puedan interferir con las enzimas. Se agrega al pellet medio DME:M199 (4:1) 10% FBS, se resuspende por pipeteo, y se preplaquea en placas de cultivo de 100 mm por 2 h y media, para que se adhieran los fibroblastos. Se recolecta en tubo Falcon de 15 mL, se centrifuga a 1000 RPM por 5 minutos a 22-24°C, y se resuspende en medio DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS. Se determina la concentración de células vivas usando una cámara de Neubauer y azul de tripán. Se siembran en placas de cultivo con gelatina (2% p/v) con 20 uL de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) por cada

mL de DME:M199 (4:1), y se guardan en incubadora con 5% de CO₂. Al día siguiente se lavan con PBS a 37°C.

Modelo de lipotoxicidad in vitro:

Los cardiomiocitos se tratan con miristato (C14:0), para esto se realiza la solución stock de miristato agregando 50mg en 10 mL de agua nanoestéril (20 mM), se agrega a tubo con 10 mL de NaOH 4 mM, y se deja sonicando a 40-50°C hasta que la solución se torna transparente. Luego se agrega BHT hasta una concentración de 25 µM y se conjuga con la solución de BSA 100 mM en baño de cultivo en agitación a 37°C durante una hora, y se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 1 N. Se filtra la solución de complejo Mir 500 µM + BSA 100 µM con filtro de 0,22 µm antes de usar. Para estimar la concentración de ácido graso libre, se usa como referencia al palmitato (C:16), un ácido graso que presenta características fisicoquímicas similares. A una concentración de 500 µM y una razón de 3,3:1 moléculas de ácido graso por moléculas de BSA, hay una concentración de palmitato libre de 25 nM, que se espera sea similar a la concentración libre de miristato.

Silenciamiento de cardiomiocitos:

Los cardiomiocitos se transfectan con siRNA para MUL1 200 nM y siRNA control 200 nM usando como vehículo el reactivo Lipoafectamina RNAiMAX (Invitrogen). Se dejan reposar 5 min los tubos con interferente y vehículo de transfección por separado, luego se realizan las mezclas, dejadas 20 min en reposo para la formación de complejos de lipoafectamina-siRNA, que se incuban 24 h en medio OPTIMEM.

A continuación, se muestra la secuencia del siRNA a utilizar:

MUL1 rata: 5'-GGGAAGUGUGUGCCUU-3'; 5'-UAAGGCACACACUUUCC-3'

Extracción de RNA mensajero en cultivos de cardiomiocitos:

Luego del estímulo lipotóxico, las placas se lavan 3 veces con PBS 1X y se homogenizan con 1 ml de TRizol, con ayuda de una micropipeta. Posteriormente, en un tubo Eppendorf se le agrega 200 μ L de cloroformo, se agita por inversión y se centrifuga a 12000 g por 15 min a 4°C. Luego se distinguen 3 fases en el tubo, se obtiene el sobrenadante que corresponde al RNA, cuidando de no tocar la interfase que contiene DNA ni la fase orgánica, que tiene proteínas. Se precipita la muestra con 500 μ L de isopropanol, se agita por inversión y se guarda -20°C toda la noche. Posteriormente se agrega ó 1 μ L de reactivo *glicoblue* para teñir el precipitado, se centrifuga a 12.000 g por 10 min a 4°C, y se descarta el sobrenadante. El pellet se lava en 1 ml de etanol 75% frío, se mantiene en hielo 5 minutos, y se centrifuga a 12.000 g por 5 min a 4°C. Se elimina el etanol, se deja secar el precipitado por 15 min y se resuspende en 20 μ L de agua libre de RNAsas, y se agita brevemente en vórtex. Finalmente se cuantifica la concentración en (ng/ μ L) en NanoDrop.

Formación de cDNA:

En un tubo Eppendorf de 200 μ L, se agrega el volumen necesario de muestra para tener 1000 ng de RNA y se completa a 16 μ L con agua libre de RNAasa. Se agregan 4 μ L de reactivo iScript™ cDNA, y deja en termociclador Biometra con programa de temperaturas (46°C, 96°C y 72°C) con ciclos de 30 min. Los niveles de mRNA se

cuantifican mediante RT-qPCR, y para la normalización se utiliza un control interno correspondiente al gen 18S. La concentración de los partidores utilizados es de 500 nM para los de MUL1 y 250 nM para los de 18S.

Las secuencias de los partidores utilizados son las siguientes:

- MUL1 rat Forward: 5'-GGCCATTCTTTCAGAAGCAC-3'
- MUL1 rat Reverse: 5'-TCCACAAACTGGCTGTTGAG-3'
- 18S Forward: 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'
- 18s Reverse: 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'

Extracción de proteínas:

Luego del estímulo, se mantienen las placas de 35 mm en hielo y se lavan 3 veces con PBS 1X, y se realiza un raspado en 50 µL de RIPA con ayuda de una espátula. Se recolectan las muestras en un tubo *Eppendorf* y se centrifugan a 12.000 rpm durante 12 min a 4°C, y se rescata el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se realiza por método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad CA, EE.UU) y por BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Por último, se denaturan las proteínas en una placa calefactora a 95°C durante 5 min con tampón SDS-PAGE 4X en una relación de volúmenes de muestra y tampón de 4:1, y se mantiene guardado a 4°C.

Western Blot:

Se realizan geles en gradiente de 5-20% poliacrilamida, y se cargan de 20 a 30 µg de proteína por cada pocillo del gel y se corre la electroforesis a 80V en *buffer* de electroforesis 1X a temperatura ambiente. Luego se realiza la transferencia a una

membrana de PDVF previamente activada en metanol a 37 mA durante 16 h en *buffer* de electrotransferencia 1X. Luego se comprueba la transferencia de las proteínas con reactivo rojo Ponceau, que se lava posteriormente con agua destilada y TBS1X-Tween 20 0,1%. Se realiza el bloqueo de las membranas con TBS1X-Tween 20 0,1% + (BSA 5%p/v o leche 5%p/v) en agitación durante una 60 o 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incuban los anticuerpos primarios preparados en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS1X-Tween 20 0,1%, y se incuban con el anticuerpo secundario Anti-IgG de rabbit o mouse conjugado con peroxidasa durante una hora. Se realizan 3 lavados de 5 min con TBS1X-Tween 20 0,1%, y se incuban las membranas unos minutos con solución quimioluminiscente EZ-ECL, y se detecta la señal en equipo revelador LI-COR.

Las diluciones de anticuerpo usadas son las siguientes:

-MUL1 (ab209263) (1:1000)

-Secundarios: Anti-IgG rabbit (1:5000)

Propuestos: Mfn2 y β -MHC.

Inmunofluorescencia:

Los cubreobjetos con células se mantienen en hielo y se lavan 3 veces con PBS 1X, y se fijan durante 20 min en solución de paraformaldehído al 7% a 4°C. Se lava 3 veces con PBS 1X, y se permeabiliza con tritón 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizan 3 lavados más con PBS 1X y se realiza el bloqueo en BSA 3% p/v preparado en PBS 1X. Posteriormente se incuban en cámara húmeda durante 3 h el anticuerpo para troponina C preparado en solución de

bloqueo a una dilución de 1:1000, se lava y se incuba el anticuerpo secundario 568 anti-ratón durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegido de la luz. Se lava 3 veces con PBS 1X y se monta sobre un portaobjetos usando una mezcla de reactivo de montaje DAKO con colorante fluorescente de ADN Hoechst a una dilución de 1:1000. Para determinar si miristato a través de MUL1 promueve la pérdida estructural del acoplamiento RE-mitocondria, posterior a las 24 h de tratamiento con miristato a los cardiomiocitos previamente tratados con siMUL1 o siControl, se les realiza marcaje por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-KDEL y anti-mtHsp70, para el RE y la mitocondria respectivamente, para evidenciar los organelos por microscopía confocal.

Determinación del área y perímetro celular:

En las inmunofluorescencias con el marcador cardiospecífico troponina C se analizan como mínimo 50 células por condición, utilizando la herramienta de medición de área y perímetro del programa ImageJ.

Determinación de niveles de ATP intracelulares:

Los cardiomiocitos se siembran a una densidad de 20.000/células por pocillo en placas de 96 pocillos. El contenido de ATP se mide usando un kit de ensayo Luciferina/Luciferasa (Cell-Titer Glo Kit, Promega).

Determinación del consumo de O₂:

Los cardiomiocitos se siembran a una densidad de 3×10^6 células por cada placa de 60 mm. Las células son tripsinizadas y re-suspendidas en PBS y se colocan en una

cámara sellada acoplada a un electrodo Clark (Oxygraph Plus System, Hansatech Instrument) a 25 °C para medir la cantidad de oxígeno que permanece en la cámara. Luego de tres minutos las células se estimulan con CCCP 200 nM para determinar la tasa de respiración desacoplada.

Determinación del potencial de membrana mitocondrial:

Se siembran NRVM a una densidad de 250.000 células/pocillo en una placa de 12 pocillos. Al finalizar el experimento, las células se precargan con TMRM (200 nM) durante 30 min y se tripsinizan. Se observa fluorescencia usando citometría de flujo. Se utiliza CCCP 50 µM como control positivo para el potencial mitocondrial.

Determinación de colocación entre RE-mitocondria:

En las inmunofluorescencias con marcadores KDEL y mtHsp70 para RE y mitocondria, se evalúa el solapamiento de ambos canales de emisión a través del algoritmo de *Mander*, como se ha descrito en (Mander et al, 1993).

Determinación de niveles citoplasmáticos y mitocondriales de Ca²⁺

Para determinar si miristato a través de MUL1 conduce a la pérdida funcional de la comunicación RE-mitocondria, se evalúa la transferencia de Ca²⁺ desde RE hacia la mitocondria. Para ello, posterior al estímulo con el ácido mirístico en las células previamente tratadas siMUL1 o siControl, se incuban con la sonda fluorescente FURA 2AM 5µM para medir los niveles de Ca²⁺ citoplasmático y la sonda Rhod-2 AM 5,4 µM para el análisis de los niveles de Ca²⁺ mitocondrial. Adicionalmente, durante el experimento para promover la salida de Ca²⁺ desde el RE las células se

estimulan con histamina 100 mM (agonista de IP₃R). Al final de la medición de Ca²⁺, se utiliza CCCP 10 μM a modo de control.

Análisis estadístico:

Los análisis de las diferencias entre cada grupo del diseño experimental se realizan mediante análisis ANOVA de una vía y los resultados de cada experimento se expresan en forma independiente como promedio ± SEM.

RESULTADOS ESPERADOS

En esta memoria se propuso analizar el efecto de ácido graso miristato sobre los niveles de MUL1, una E3 ligasa que regula a las proteínas de dinámica mitocondrial, ya que media la degradación de Mfn2 por ubiquitinación y estabiliza a Drp1 por sumoilación. Mfn2 controla la fusión mitocondrial, y en células MEF y Hela se ha observado que regula los contacto RE-mitocondria, manteniendo la transferencia de lípidos y Ca^{+2} , que es fundamental tanto para la función mitocondrial, como en la activación de la vía CaN/NFAT, que gatilla hipertrofia patológica en el cardiomiocito (Figura 4). Se espera observar el aumento de los niveles de MUL1 inducido por miristato, y su efecto sobre la disminución de los contactos RE-mitocondria mediada por la capacidad de esta proteína de degradar a Mfn2, que regula la proximidad entre ambos organelos.

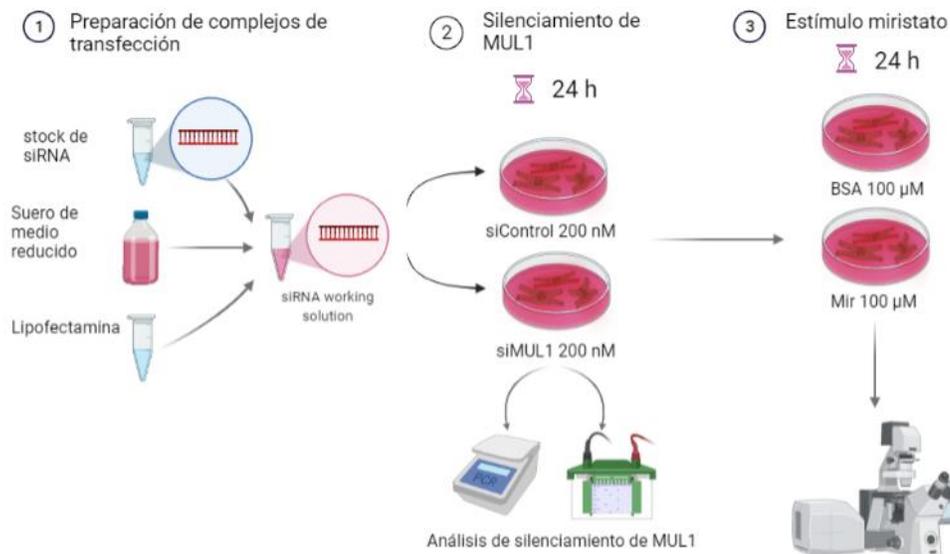


Figura 4: Esquema de trabajo propuesto. Se realiza un silenciamiento de MUL1 por 24 h con siMUL1 200nM y siControl 200 nM. Luego de las 24 h de transfección con siRNA, se analizan los niveles de MUL1 por western blot y RTqPCR. Para estudiar el rol de MUL1 en el efecto del miristato sobre los contactos RE-mitocondria mediante microscopía confocal, se realiza un estímulo de 24 h con el ácido graso miristato luego de la transfección.

1. Validación del modelo de hipertrofia inducido por miristato:

Se propone demostrar que el tratamiento con miristato 500 μM durante 24 h produce un efecto hipertrófico sobre el cardiomiocito, que se traduce en un aumento del área celular observada inmunofluorescencia con marcaje cardioespecífico de troponina C, tanto para miristato como para el control con NE. Además, mediante *Western blot* se espera observar un aumento del marcador hipertrófico $\beta\text{-MHC}$ (Figura 5)

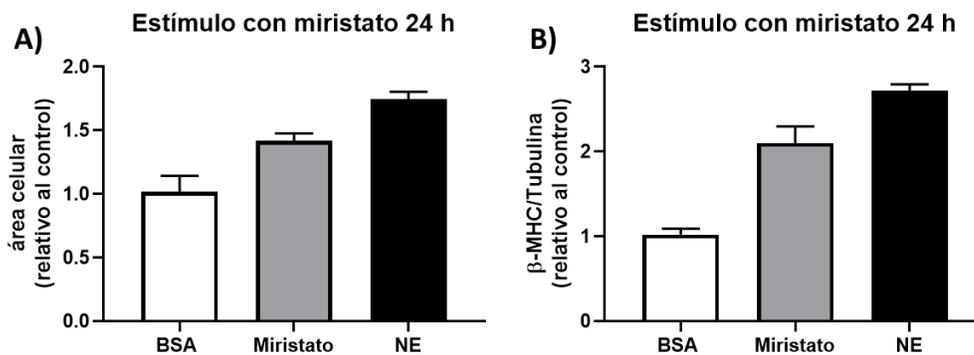


Figura 5: Efecto de miristato en la hipertrofia del cardiomiocito. Las células se tratan con BSA 100 μM , miristato 500 μM + BSA 100 μM y NE 10 μM durante 24 h. **A)** Cuantificación del área celular en inmunofluorescencia con marcaje de troponina C. Análisis estadístico por ANOVA de una vía. **B)** Densitometría de WB de $\beta\text{-MHC}$ con $\beta\text{-tubulina}$ como control de carga. Análisis estadístico por ANOVA de una vía. Resultado propuesto.

2. Efecto de miristato sobre la dinámica mitocondrial:

Se determinarán los niveles de Mfn2, una proteína reguladora de la dinámica mitocondrial, que también tiene un rol de anclaje en los contactos RE-mitocondria, que le permite controlar la distancia entre ambos organelos. Para este fin, los cardiomiocitos se tratan con miristato 500 μM y BSA 100 μM a modo de control durante 24 h. Debido a la capacidad de MUL1 de ubiquitinar a Mfn2 para su

degradación por parte del proteosoma, se espera observar una disminución de los niveles de Mfn2 en comparación al control con BSA (Figura 6).

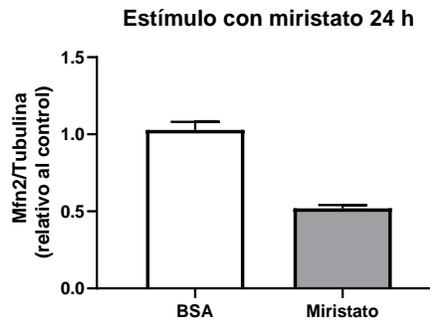


Figura 6: Efecto de miristato en los niveles proteicos de Mfn2. Se tratan las células con un BSA 100 μ M y 500 μ M, se cuantifican los niveles proteicos de Mfn2 por WB. Análisis estadístico por ANOVA de una vía. Resultado propuesto.

Objetivo específico 1:

Posteriormente, se procedería a evaluar si el aumento de los niveles proteicos de MUL1 inducido por el tratamiento con miristato tiene algún efecto sobre la comunicación RE-mitocondria a nivel estructural. Esto se realizaría por inmunofluorescencia, mediante el análisis de colocalización de marcadores específicos del RE y la mitocondria, KDEL y mtHsp70 respectivamente (Figura 4).

En la literatura se mostró que el miristato aumenta el área del cardiomiocito y los niveles proteicos de MUL1 (Vásquez, 2018). Por esta razón, se espera que el miristato produzca un efecto similar al mostrado en Gutiérrez et al, 2014, en que el agente hipertrófico NE disminuyó los contactos RE-mitocondria. Se busca mostrar que el tratamiento con miristato disminuya el nivel de colocalización entre ambos organelos, mientras que el silenciamiento de MUL1 prevenga esta pérdida del acoplamiento estructural (Figura 7).

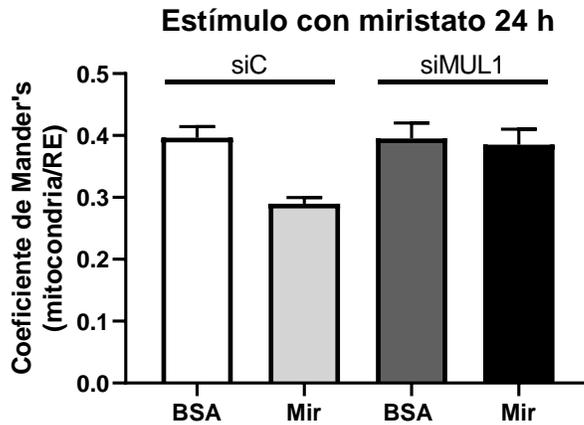


Figura 7: Silenciamiento de MUL1 previene la pérdida de proximidad entre RE-mitocondria inducida por miristato. Cuantificación por algoritmo de Mander de la colocalización de ambos organelos en inmunofluorescencia con marcaje de mtHsp70 y KDEL. Análisis estadístico por ANOVA de una vía. Resultado propuesto.

Objetivo específico 2:

Se busca demostrar que la pérdida de los contactos RE-mitocondria inducida por miristato se vea alterada también a nivel funcional, acompañado de una menor entrada de Ca^{+2} a la mitocondria, acumulándose en el citoplasma, y que un silenciamiento de MUL1 revierta este efecto. Para este fin se realizaría un análisis por microscopía confocal utilizando sondas de Ca^{+2} fluorescentes. Para la medición de los niveles de Ca^{+2} citoplasmático se utilizaría la sonda FURA 2AM 5uM, mientras que para el Ca^{+2} mitocondrial se mediría mediante la sonda Rhod-2 AM 5,4 μ M (Figura 4).

Ca⁺² mitocondrial: Luego del estímulo con histamina, que es un agonista de IPR₃, se induciría la salida de Ca^{+2} desde el RE. Debido a que el tratamiento previo con miristato disminuiría los contactos RE-mitocondria, se espera observar una menor

entrada de Ca^{+2} a la mitocondria luego del tratamiento con este ácido graso en relación con el control BSA. Se espera también que el silenciamiento de MUL1 prevenga esta disminución de Ca^{+2} mitocondrial, y que el estímulo de control con el desacoplante CCCP disipe el potencial mitocondrial, provocando una salida masiva de Ca^{+2} desde la mitocondria, observando una abrupta caída en la fluorescencia (Figura 8).

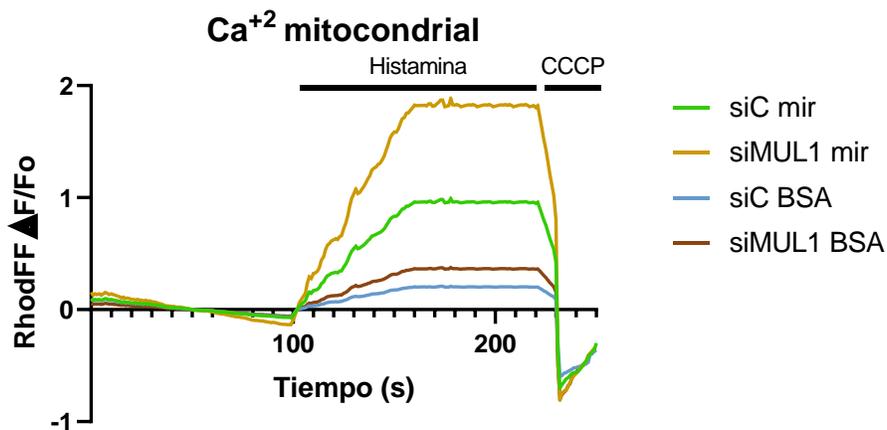


Figura 8: Silenciamiento de MUL1 previene la pérdida de la captación de Ca^{+2} mitocondrial inducido por miristato en cardiomiocitos primarios de rata neonata. Cuantificación de la señal fluorescente de la sonda sensible a Ca^{+2} Rhod-2 AM 5,4 μM mediante microscopía confocal, luego de estímulo con histamina 100 mM. Luego del estímulo, se utiliza a modo de control al desacoplante CCCP. Análisis estadístico por ANOVA de una vía. Resultado propuesto.

Ca^{+2} citoplasmático: Debido a la disminución de los contactos RE-mitocondria causada por el tratamiento con miristato, se espera una mayor acumulación de este ión en el citoplasma en comparación con el control BSA. Además, se espera que este efecto sea dependiente de MUL1, por lo que el silenciamiento de esta proteína podría prevenir el aumento en la señal fluorescente de la sonda de Ca^{+2} citoplasmático (Figura 9).

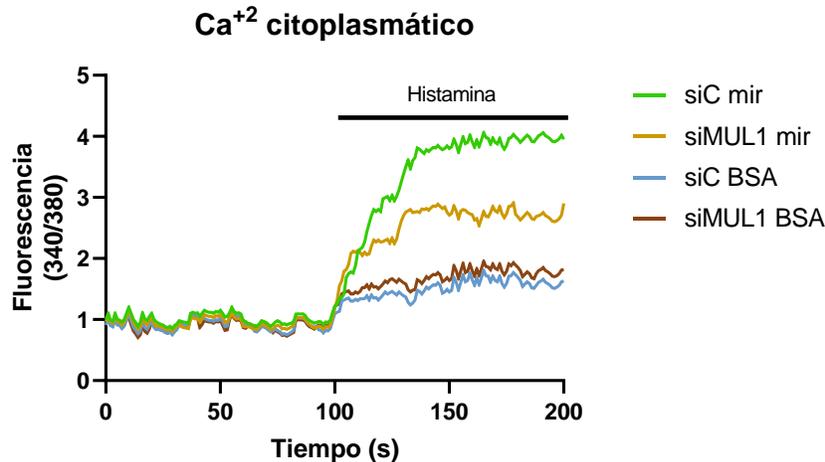


Figura 9: Silenciamiento de MUL1 previene el aumento en los niveles de Ca²⁺ citoplasmático inducido por miristato en cardiomiocitos primarios de rata neonata. Cuantificación de la señal fluorescente de la sonda sensible a Ca²⁺ FURA 2AM 5uM mediante microscopía confocal, luego de estímulo con histamina 100 mM. Análisis estadístico por ANOVA de una vía. Resultado propuesto.

Efecto de miristato en el metabolismo energético mitocondrial:

Posteriormente, se analizará cómo la pérdida de la comunicación RE-mitocondria inducida por miristato se acompaña de cambios en el metabolismo metabólico del cardiomiocito en condiciones de estrés lipotóxico. Para esto, se determinarán los niveles de ATP intracelular utilizando el kit de ensayo Luciferina/Luciferasa Cell-Titer Glo, en que se espera observar un aumento del ATP intracelular. Luego se correlacionará este aumento en la concentración de ATP con una mejora en la función mitocondrial determinando la tasa de consumo de O₂ en la mitocondria. Se analizará también el potencial de membrana mediante microscopía confocal, midiendo la fluorescencia de la sonda TMRM (Figura 10).

Estímulo con miristato 24 h

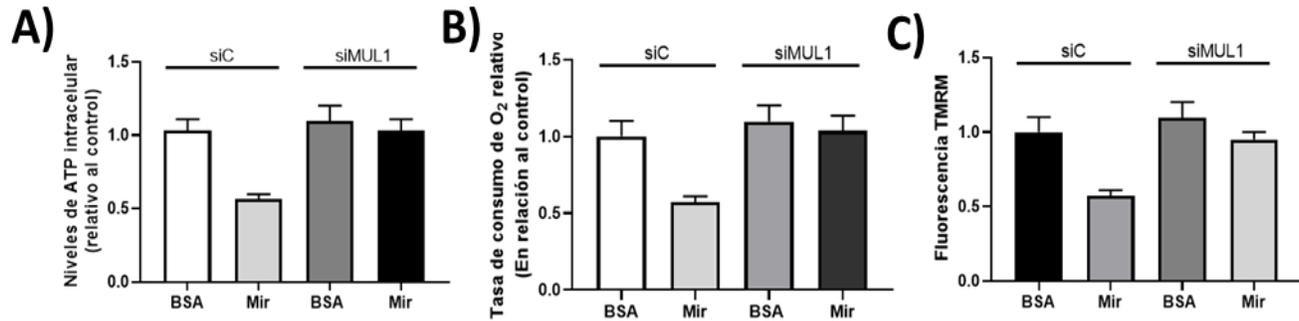


Figura 10: Miristato induce alteraciones metabólicas en el cardiomiocito.

A) Efecto del miristato sobre los niveles de ATP intracelular, medidos usando la reacción de luciferina/luciferasa. **B)** Efecto de miristato sobre la tasa relativa máxima de consumo de O₂, evaluada con un electrodo de Clark, en que se añade el agente desacoplante CCCP (200 nM) luego de medir los niveles basales por 3 minutos sin tratamiento. **C)** Efecto del miristato sobre el potencial de membrana de la mitocondria, midiendo la fluorescencia relativa de la sonda TMRM (200 nM) por citometría de flujo, y usando CCCP 50 μ M como control positivo para el potencial mitocondrial. Resultado propuesto.

ANEXO: RESULTADOS PRELIMINARES Y DISCUSIÓN

1. Validación del modelo de hipertrofia en el cardiomiocito.

Se evaluó el efecto del miristato sobre el área y perímetro del cardiomiocito mediante inmunofluorescencia, con marcaje cardiospecífico de la proteína troponina C. Como se muestra en la [Figura 11](#), no se observan cambios significativos en el área celular en las condiciones de miristato 500 μM ni NE 10 μM respecto al control con BSA (miristato 8709 ± 158 ; NE 1026 ± 137 vs BSA 871 ± 116). En cuanto al perímetro celular, tampoco se observan cambios significativos en la condición de miristato 500 μM con relación al control, pero si para NE 10 μM (miristato 183 ± 4 NE 248 ± 25 vs BSA 177 ± 2 ; $P < 0,05$), indicando que NE produce un cambio en la morfología celular.

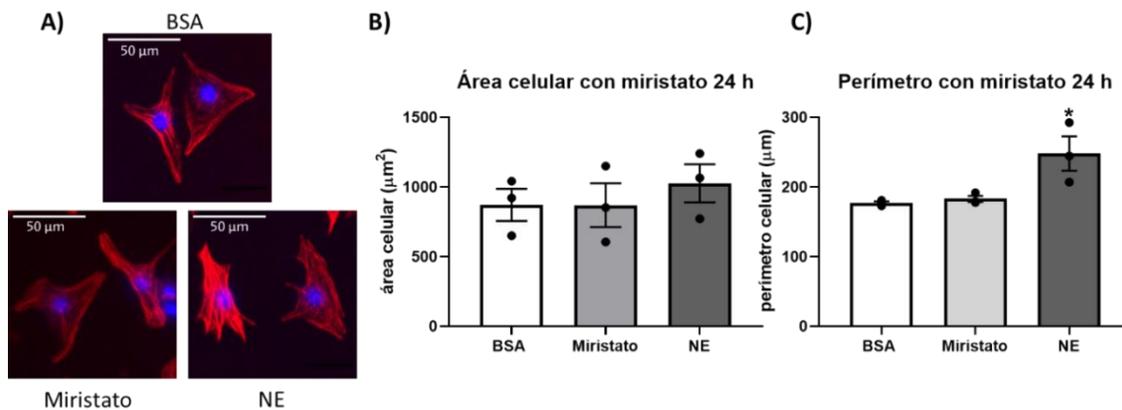


Figura 11: Efecto de miristato en el área celular de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos fueron tratados con BSA 100 μM , miristato 500 μM + BSA 100 μM y NE 10 μM durante 24 h. A) Imagen representativa de inmunofluorescencia con marcaje de troponina C. B) Cuantificación del área celular. C) Cuantificación del perímetro celular. Se muestra el promedio \pm SEM. ANOVA de una vía con post test de Dunn ($n=3$).

Dado que miristato no muestra cambios significativos en área y perímetro, para descartar que fuera por efecto del reactivo BSA se realiza una comparación de los valores de área celular obtenidos para la condición control BSA y medio de mantención (DMEM:M199) 0% FBS. En la [Figura 12](#) se muestra que no hay diferencias entre los valores de las áreas correspondientes a ambos controles (BSA $940, \pm 54$ vs MM 980 ± 28).

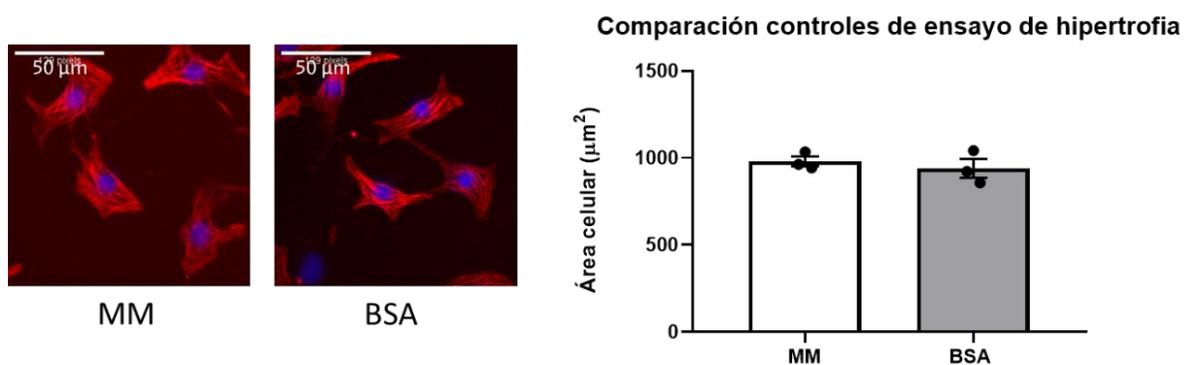


Figura 12: Comparación de controles de ensayo de hipertrofia. Los cardiomiocitos de cultivo primario fueron tratados con medio de mantención y BSA 100 μM durante 24 h. A) Imagen representativa de inmunofluorescencia con marcaje de troponina C. B) Cuantificación del área celular de al menos 50 células en cada por condición. Se muestra el promedio ± SEM. ANOVA con post test de Dunn. (n=3)

2. Validación del silenciamiento de MUL1 mediante transfección de siRNA.

Dado que el objetivo de la tesis era determinar si el modelo de estrés lipotóxico con miristato induce hipertrofia de los cardiomiocitos de rata neonata dependiente de la proteína MUL1, se redujo la expresión de la proteína a través de la transfección de los cardiomiocitos con siRNA para MUL1 a una concentración de 200 nM durante 24 h.

La [Figura 13A](#) muestra que el uso del siRNA produce una reducción estadísticamente significativa del mRNA de MUL1 ($0,29 \pm 0,12$; $P < 0,05$). Mientras que en la [Figura 13C](#) se observa el efecto del silenciamiento de MUL1 a nivel proteico ($0,5 \pm 0,02$).

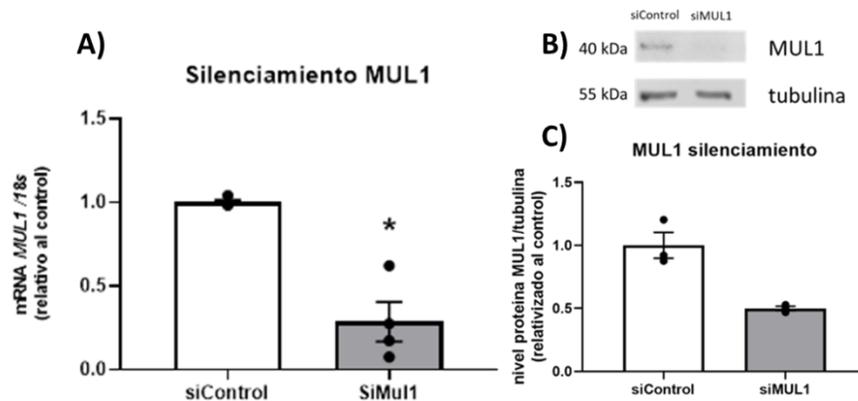


Figura 13: Efecto del silenciamiento de MUL1. **A)** Cuantificación del mRNA de MUL1 luego del silenciamiento. Se transfectaron los cardiomiocitos con un siRNA MUL1 (200 nM) y siRNA control (200 nM) por 24 h y se midieron los niveles de mRNA de MUL1 por RT-qPCR, con el gen 18S como control interno. Se muestra el promedio \pm SEM. * $P < 0,05$ con respecto al siControl, análisis t-test con post test Mann-Whitney (n=4). **B)** Imagen representativa del efecto del silenciamiento en los niveles proteicos de MUL1 por WB, con β -tubulina como control de carga. Se transfectaron los cardiomiocitos de cultivo primario con un siMUL1 200 nM y siControl 200 nM durante 24 horas. **C)** Cuantificación densitométrica de MUL1. Se muestra el promedio \pm SEM. Análisis por t-test con post test de Mann-Whitney (n=3).

3. Efectos del estrés lipotóxico inducido por miristato sobre los niveles de MUL1. Además, se evaluaron los niveles de MUL1 luego del tratamiento con BSA 100 μ M y miristato 500 μ M. La [Figura 14A](#) muestra que no hay cambios significativos a nivel proteico de MUL1 en la condición de miristato 500 μ M (miristato $0,9 \pm 0,08$ vs BSA $1 \pm 0,04$), en que los datos de la condición con miristato son bastante cercanos al promedio. También se analizaron los niveles de mRNA de MUL1 luego del

tratamiento con miristato por 24 h. Consistentemente, en la [Figura 14B](#) se muestra tampoco hubo cambios significativos (miristato $0,76 \pm 0,12$ vs BSA $1 \pm 0,32$).

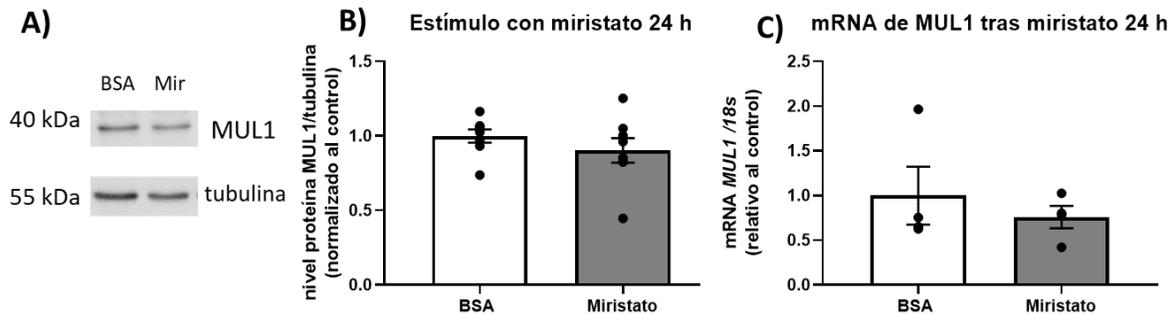


Figura 14: Efecto del miristato en los niveles de MUL1. **A)** Imagen representativa del efecto del miristato en los niveles proteicos de MUL1. Se trataron los cardiomiocitos de cultivo primario con BSA 100 μ M y miristato 500 μ M + BSA 100 μ M durante 24 horas y se midieron los niveles de MUL1 por WB, con tubulina como control. **B)** Cuantificación densitométrica de MUL1. Se muestra el promedio \pm SEM. Análisis por t-test, $P > 0,05$ ($n=8$). **C)** Efecto del miristato en los niveles de mRNA de MUL1. Los cardiomiocitos de cultivo primario fueron tratados con BSA 100 μ M y miristato 500 μ M + BSA 100 μ M durante 24 horas y se determinaron los niveles de mRNA de MUL1 por RT-qPCR, con el gen 18S como control interno. Se muestra el promedio \pm SEM. Análisis t-test Mann Whitney, $P > 0,05$ ($n=4$).

DISCUSIÓN

En la actualidad, las ECV corresponden a un tercio de las muertes a nivel mundial, en las que predominan factores de riesgo como una dieta poco saludable, sedentarismo, y consumo de tabaco y alcohol, junto a un aumento sostenido en la prevalencia de enfermedades metabólicas como la DM2 y obesidad. Esto produce un aumento en la deposición de ácidos grasos en diversos tejidos, como el corazón, ya que se supera la capacidad de almacenamiento en el tejido adiposo.

Si bien el corazón es un órgano que requiere una alta demanda energética, y una parte importante de esta se obtiene a partir de la β -oxidación de ácidos grasos realizada en la mitocondria, un exceso de ácidos grasos saturados promueve la producción de especies lipotóxicas como DAG y ceramidas. Estas moléculas inducen alteraciones a nivel estructural y metabólico en el cardiomiocito, y activan señales de estrés que pueden desencadenar efectos pro-hipertroóficos y pro-apoptóticos. Se ha mostrado que una dieta alta en ácidos grasos saturados induce hipertrofia cardíaca y disfunción del ventrículo izquierdo, pero se requiere determinar nuevos mecanismos que medien el desarrollo de hipertrofia del cardiomiocito en respuesta al estrés lipotóxico.

Por esta razón, el objetivo de esta tesis es analizar los efectos del ácido graso miristato sobre los niveles de MUL1, una E3 ligasa mitocondrial que puede regular proteínas de la dinámica mitocondrial que además son relevantes para su

interacción con el RE y la regulación de los niveles de Ca^{+2} en los diferentes compartimientos, lo que es fundamental tanto para la función mitocondrial, como también en la activación de señales canónicas de hipertrofia patológica en el cardiomiocito. Estos se centran en el estudio del aumento de los niveles de MUL1 inducido por miristato, y su efecto sobre la disminución de los contactos RE-mitocondria mediada por la capacidad de esta proteína de degradar a Mfn2, que regula la proximidad de ambos organelos. A continuación, se discutirán las razones de por qué los resultados obtenidos no coinciden con lo que se esperaba obtener según la literatura, y las medidas tomadas para intentar resolverlo.

1) Resultados preliminares: Validación de modelo de hipertrofia en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata, inducido por estrés lipotóxico con ácido graso miristato.

1. Efecto de miristato en la hipertrofia del cardiomiocito:

En primer lugar, en las inmunofluorescencias con marcaje cardiospecífico de troponina C, se esperaba obtener un aumento en el área celular del cardiomiocito luego del tratamiento con miristato. En la literatura se ha reportado que la infusión con una mezcla de ácidos grasos saturados rica en miristato produjo hipertrofia del ventrículo izquierdo en ratones, luego de un tratamiento por 7 días (Riquelme et al, 2011). Coincidentemente, se mostró que este ácido graso produce un aumento superior a un 20% en cardiomiocitos primarios de rata adulta mediante un mecanismo dependiente de la producción de ceramidas (Russo et al, 2012). Por otra parte, el efecto hipertrófico del miristato en el cardiomiocito también fue evidenciado en datos previos del laboratorio (Vásquez, 2018).

De la misma forma, se esperaba también un aumento significativo en el área celular tras el estímulo con NE, que es un agente pro-hipertrófico altamente estudiado. En un estudio publicado en que se utilizó la misma concentración de NE 10 μ M produjo un aumento de un 30% en la hipertrofia de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (Ocaranza et al, 2010). Sin embargo, en esta ocasión tampoco dio los resultados esperados.

Inicialmente se consideró que el reactivo BSA utilizado como condición control podría estar teniendo un efecto sobre los cardiomiocitos, pero esto fue descartado tras realizar la comparación de los valores de área celular obtenidos entre BSA y medio de mantención (DMEM:M199) 0% FBS, en que no se muestran diferencias entre ambos controles.

Sin embargo, tras el cambio del lugar físico del laboratorio se detectaron problemas en el cultivo. En primer lugar, se observaba un porcentaje de fibroblastos entre el 50 y 70%, por lo que debió ajustar la concentración de BrdU, un nucleótido análogo de timidina utilizado para inhibir la proliferación de este tipo celular. Cabe destacar que bajo condiciones ideales el cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata no debería presentar más de un 10-20% de fibroblastos, que es otra de las células importantes y abundantes en el tejido cardíaco. Por otro lado, los cardiomiocitos presentaban signos de estrés, tales como una morfología alterada, vacuolización y una menor contracción observada en el cultivo, por lo que se debió

realizar una re-estandarización del proceso de cultivo en colaboración con todo el laboratorio.

Inicialmente, se pensó que las células no estarían respondiendo al estímulo con miristato debido a que ya se encontraban basalmente hipertrofiadas por problemas en el proceso de cultivo. Esto podría deberse a una contaminación en los reactivos, problemas con la concentración de las enzimas de digestión utilizadas o con la concentración de BrdU, que si bien inhibe la proliferación de fibroblastos a altas concentraciones puede resultar tóxica para los cardiomiocitos. No obstante, los valores de área celular en la condición control son cercanos a 1000 μm^2 , siendo un poco más bajos que los valores reportados en publicaciones de otro grupo de investigación relacionado al laboratorio, que reporta un área de 1200 μm^2 en sus controles, y trabaja el cultivo bajo las mismas condiciones (Ocaranza et al, 2010). Esto demuestra que las células, no estaban basalmente hipertrofiadas, sólo no estarían respondiendo al estímulo, posiblemente debido a su estado de estrés. Respecto a la NE, que se utiliza como control de hipertrofia, si bien no se observa un aumento significativo en el área celular, si hubo un cambio en la morfología del cardiomiocito, por lo que se observa una respuesta. Es posible también que con un mayor número de datos el cambio en el área celular observado para la NE podría ser significativo.

En otros trabajos que estudian el efecto de otro ácido graso, palmitato de sodio, sobre la apoptosis, inflamación o hipertrofia en cardiomiocitos (Zahabi & Deschepper, 2001; Kuzmicic et al., 2014, Ying et al., 2015, Geng et al., 2019 y Xue et al., 2019), se utilizó un rango de concentraciones de BSA de 30 a 150 μM para conjugarlo, pero no justifican el por qué utilizaron dichas concentraciones. Sin embargo, en el trabajo de Zahabi & Deschepper, 2001 se evaluaron 3 concentraciones diferentes de BSA (75, 150 y 300 μM) conjugadas con palmitato/oleato (0,2; 0,4 y 0,8 mM, respectivamente). Pese a que en las tres condiciones se mantenía la misma relación entre las concentraciones de BSA y ácidos grasos, se evaluó en cardiomiocitos de rata neonata el cambio en el área celular, secreción de ANF e incorporación de [^3H]-fenilalanina luego de estimular con NE 0,1 mM y se demostró una distinta respuesta a la hipertrofia celular (Zahabi & Deschepper, 2001).

Por esto, posterior al término de esta memoria en el laboratorio se volvió a estandarizar la concentración de BSA, probando las concentraciones utilizadas en los trabajos anteriormente mencionados de 30, 50, 80, 100 y 150 μM , comparadas al medio de cultivo DMEM 1X al 5% FBS. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en el área ni el perímetro celular de los cardiomiocitos, pero se decidió utilizar la concentración de 30 μM debido a que el estudio de Xue et al., 2019 evaluó hipertrofia en cardiomiocitos de rata neonata, lo que finalmente solucionó el problema con el cultivo al trabajar con el modelo lipotoxicidad inducida por palmitato 120 μM .

2. Efectos del estrés lipotóxico inducido por miristato sobre los niveles de MUL1.

Además, la hipótesis proponía que el efecto del miristato sobre la hipertrofia del cardiomiocito dependiera de un aumento de los niveles de MUL1, que sería también inducido por el tratamiento con este ácido graso. En la literatura se reportó que un estímulo hipertrófico con fenilefrina durante 24 h produjo un aumento de MUL1 superior a un 60%, acompañado de una disminución de los niveles de Mfn2 (Zhao et al, 2017). Sin embargo, como se mostró anteriormente, no se pudo replicar el efecto hipertrófico del miristato luego del tratamiento durante 24 h. Tampoco se observó un cambio significativo en los niveles de MUL1 a nivel proteico respecto al control BSA, y coincidentemente, tampoco se observa un aumento en los niveles de transcrito de MUL1. Una posibilidad sería estudiar si las células responden al estímulo con miristato considerando tiempos de estímulo mayores, como 48 o 72 horas, y observar si así produce cambios en el área celular o en los niveles de MUL1.

Al no poder replicar los resultados previos del laboratorio, ni obtener resultados que coincidan con lo reportado en la literatura, no se pudo continuar con los objetivos de esta memoria.

CONCLUSIONES

- Contrario a lo que indica la literatura y los resultados previos del laboratorio, el estrés lipotóxico inducido por miristato no produjo un aumento del área celular en cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata.
- Tampoco se observaron cambios en MUL1 a nivel de proteína y mRNA posterior al tratamiento con miristato.
- Acorde a la literatura, se esperaba que el miristato disminuyera el nivel de colocación entre el RE y la mitocondria, disminuyendo los contactos entre ambos organelos a nivel estructural.
- Se esperaba también demostrar el efecto del miristato en la disminución de contactos RE-mitocondria a nivel funcional, con una acumulación de Ca^{+2} en el citoplasma y una menor entrada de este ión a la mitocondria, y que este efecto sea prevenido con el silenciamiento de MUL1.

No se logró probar la hipótesis de esta tesis, debido a que no se lograron replicar los resultados de la validación del modelo de hipertrofia inducido por miristato en cardiomiocitos de cultivo primario, debido a la necesidad de re-estandarizar el proceso de cultivo celular. Sin embargo, acorde a la literatura se esperaba justificar el efecto hipertrófico de este ácido graso mediante la disminución de los contactos RE-mitocondria a nivel físico y funcional, que produciría la acumulación de Ca^{+2} en el citoplasma, pudiendo activar así vías de hipertrofia patológica en el cardiomiocito, tales como la de CaN/NFAT.

REFERENCIAS

1. Aguilera, C., Labbé, T., Busquets, J., Venegas, P., Neira, C., & Valenzuela, A. Obesidad: ¿Factor de riesgo o enfermedad? *Revista médica de Chile* 147(4), 470-474 (2019).
2. Alpert M., Lambert C., Terry B., Cohen M., Mukerji V., Massey C., Hashimi M., & Panayiotou H. Influence of left ventricular mass on left ventricular diastolic filling in normotensive morbid obesity. *Am Heart J* 130(5), 1068-73 (1995).
3. Bae S., Kim S., Jung J., Yoon Y., Cha H., Lee H., Kim K., Kim J., An I., Kim J., Um H., Park I., Lee S., Nam S., Jin Y., Lee J., & An S. Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase. *Cell Res* 22(5), 873-85 (2012).
4. Bai D., Ueno L., & Vogt P. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer* 125(12), 2863-70 (2009).
5. Bekhite M., González-Delgado A., Hübner S., Haxhikadrija P., Kretschmar T., Müller T., Wu J., Bekfani T., Franz M., Wartenberg M., Gräler M., Greber B., & Schulze P. The role of ceramide accumulation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes on mitochondrial oxidative stress and mitophagy. *Free Radic Biol Med* 167, 66-80 (2021).
6. Braschi E., Zunino R., & McBride H. M. MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO reports* 10(7), 748-754 (2009).
7. Bravo-Sagua R., Parra V., López-Crisosto C., Díaz P., Quest A. F., & Lavandero S. (2017). Calcium Transport and Signaling in Mitochondria. *Comprehensive Physiology* 7(2), 623-634 (2017).
8. Calle X., Garrido-Moreno V., Lopez-Gallardo E., Norambuena-Soto .I, Martínez D., Peñaloza-Otárola A., Troncossi A., Guerrero-Moncayo A., Ortega A., Maracaja-Coutinho V., Parra V., Chiong M., & Lavandero S. Mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1 (MUL1) as a novel therapeutic target for diseases associated with mitochondrial dysfunction. *IUBMB Life* (2022).
9. Chiu H., Kovacs A., Ford D., Hsu F., Garcia R., Herrero P., Saffitz J., & Schaffer J. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 107(7), 813-22 (2001).
10. de Vries J., Vork M., Roemen T., de Jong Y., Cleutjens J., van der Vusse G., & van Bilsen M. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res* 38(7), 1384-94 (1997).
11. Ebbesson S., Tejero M., López-Alvarenga J., Harris W., Ebbesson L., Devereux R., MacCluer J., Wenger C., Laston S., Fabsitz R., Howard B., & Comuzzie A. Individual saturated fatty acids are associated with different components of insulin resistance and glucose metabolism: the GOCADAN study. *Int J Circumpolar Health* 69(4), 344-51 (2010).
12. Erion D., & Shulman G. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med.* 16(4), 400-2 (2010).
13. Gao H., Feng X., Li Z., Li M., Gao S., He Y., Wang J., Zeng S., Liu X., Huang X., Chen S., & Liu P. Downregulation of adipose triglyceride lipase promotes cardiomyocyte hypertrophy by triggering the accumulation of ceramides. *Arch Biochem Biophys* 1(565), 76-88 (2015).
14. García M., *Proteína ubiquitina ligasa E3 mitocondrial 1 (MUL1) en la comunicación retículo endoplásmico-mitocondria en células musculares esqueléticas bajo estrés lipotóxico*, Tesis en curso para optar al grado de Químico Farmacéutico, Pontificia Universidad Católica de Chile (2018).
15. Garrido-Moreno, V., Díaz-Vegas, A., López-Crisosto, C., Troncoso, M. F., Navarro-Marquez, M., García, L., Estrada, M., Cifuentes, M., & Lavandero, S. GDF-11 prevents cardiomyocyte hypertrophy by maintaining the sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication. *Pharmacological research* 146, 104273 (2019).
16. Geng Z., Fan W., Zhou B., Ye C., Tong Y., Zhou Y. & Xiong X. FNDC5 attenuates obesity-induced cardiac hypertrophy by inactivating JAK2/STAT3-associated inflammation and oxidative stress. *J Transl Med.* 17(1):107 (2019).
17. Goldberg I. J., Trent C. M., & Schulze P. C. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell metabolism* 15(6), 805-812 (2012).
18. Gutiérrez T., Parra V., Troncoso R., Pennanen C., Contreras-Ferrat A., Vasquez-Trincado C., Morales P. E., Lopez-Crisosto C., Sotomayor-Flores C., Chiong M., Rothermel B. A., & Lavandero S. Alteration in mitochondrial Ca²⁺ uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell communication and signaling: CCS*, 12, 68 (2014).
19. Haffar T., Bérubé-Simard F. & Bousette N. Cardiomyocyte lipotoxicity is mediated by Il-6 and causes down-regulation of PPARs. *Biochem Biophys Res Commun.* 459(1):54-9 (2015).
20. Haffar T., Bérubé-Simard F. & Bousette N. Impaired fatty acid oxidation as a cause for lipotoxicity in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 468(1-2), 73-8 (2015).

21. Hickson-Bick D., Buja L., & McMillin J. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32(3), 511-9 (2000).
22. Khalilimeyodi A., Daneshmehr A., & Sharif Kashani B. Ca²⁺-dependent calcineurin/NFAT signaling in β -adrenergic-induced cardiac hypertrophy. *General physiology and biophysics* 37(1), 41–56 (2018).
23. Kong J., & Rabkin S. Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta*. 1485(1), 45-55 (2000).
24. Kuzmicic J., Parra V., Verdejo H., López-Crisosto C., Chiong M., García L., Jensen M., Bernlohr D., Castro P. & Lavandero S. Trimetazidine prevents palmitate-induced mitochondrial fission and dysfunction in cultured cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol*. 91(3):323-36 (2014).
25. Li W., Bengtson M. H., Ulbrich A., Matsuda A., Reddy V. A., Orth A., Chanda, S. K., Batalov S., & Joazeiro C. A. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS one* 3(1), e1487 (2008).
26. Liu T., Zhang L., Joo D., & Sun S. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2:17023 (2017).
27. Lokireddy S., Wijesoma I., Teng S., Bonala S., Gluckman P., McFarlane C., Sharma M., & Kambadur R. The ubiquitin ligase Mul1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. *Cell Metab* 16(5), 613-24 (2012).
28. Lopaschuk, G.D. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90, 207–58 (2010).
29. Lopez-Crisosto C., Pennanen C., ζ -Trincado C., Morales P. E., Bravo-Sagua R., Quest A., Chiong M., & Lavandero S. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nature reviews. Cardiology* 14(6), 342–360 (2017).
30. Lu A., Le, H., Li L., Lai L., Liang W., & Xu S. Role of mitochondrial Ca²⁺ uniporter in remifentanyl-induced postoperative allodynia. *The European journal of neuroscience* 47(4), 305–313 (2018).
31. MacDonnell S., Weisser-Thomas J., Kubo H., Hanscome M., Liu Q., Jaleel N., Berretta R., Chen X., Brown J., Sabri A., Molkentin J., & Houser S. CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signaling in cardiac myocytes. *Circ Res* 105(4), 316-25 (2009).
32. Manders E., Verbeek F., and Aten J. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* 169, 375-382 (1993).
33. Margozzini, P., & Passi, A. Encuesta Nacional de Salud, ENS 2016-2017: un aporte a la planificación sanitaria y políticas públicas en Chile. *ARS MEDICA Revista De Ciencias Médicas* 43(1), 30–34 (2018).
34. Ocaranza M., Lavandero S., Jalil J., Moya J., Pinto M., Novoa U., Apablaza F., Gonzalez L., Hernandez C., Varas M., Lopez R., Godoy I., Verdejo H., & Chiong M. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens* 28(5), 1054-64 (2010).
35. Peng J., Ren K. D., Yang J., & Luo X. J. Mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1: A key enzyme in regulation of mitochondrial dynamics and functions. *Mitochondrion* 28, 49–53 (2016).
36. Pennanen C., Parra V., López-Crisosto C., Morales P. E., Del Campo A., Gutierrez, T., Rivera-Mejías P., Kuzmicic J., Chiong M., Zorzano A., Rothermel B. A., & Lavandero S. Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca²⁺-calcineurin signaling pathway. *Journal of cell science* 127(Pt 12), 2659–2671 (2014).
37. Riquelme C., Magida J., Harrison B., Wall C., Marr T., Secor S., & Leinwand L. Fatty acids identified in the Burmese python promote beneficial cardiac growth. *Science* 334(6055), 528-31 (2011).
38. Russo S. B., Baicu C. F., Van Laer A., Geng T., Kasiganesan H., Zile M. R., & Cowart L. A. Ceramide synthase 5 mediates lipid-induced autophagy and hypertrophy in cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation* 122(11), 3919–3930 (2012)
39. Şahin B, İlğün G. Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries. *Health Soc Care Community*. 30(1), 73-80 (2022).
40. Schrauwen P., Schrauwen-Hinderling V., Hoeks J., & Hesselink M. K. Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta* 1801(3), 266–271 (2010).
41. Schulze P., Drosatos K., & Goldberg I. Lipid Use and Misuse by the Heart. *Circ Res* 118(11), 1736-51 (2016).
42. Shengnan W., & Ming-Hui Z. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in the heart. *Archives of biochemistry and biophysics* 662, 201–212 (2019).
43. Sikder K., Shukla S., Patel N., Singh H., & Rafiq K. High Fat Diet Upregulates Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis via Intervention of PPAR- γ . *Cell Physiol Biochem* 48(3), 1317-1331 (2018).
44. Sultan A, Singh J, Howarth FC. Mechanisms underlying electro-mechanical dysfunction in the Zucker diabetic fatty rat heart: a model of obesity and type 2 diabetes. *Heart Fail Rev* 25(5), 873-886 (2020).

45. Szabadkai G., Bianchi K., Várnai P., De Stefani D., Wieckowski M., Cavagna D., Nagy A., Balla T. & Rizzuto I. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* 175, 901–911 (2006).
46. Szczepaniak L., Victor R., Orci L., & Unger R. Forgotten but not gone: the rediscovery of fatty heart, the most common unrecognized disease in America. *Circ Res* 101(8), 759-67 (2007).
47. Takeishi Y., Goto K., & Kubota I. Role of diacylglycerol kinase in cellular regulatory processes: a new regulator for cardiomyocyte hypertrophy. *Pharmacol Ther* 115(3), 352-9 (2007).
48. Torrealba N., Aranguiz P., Alonso C., Rothermel B. A., & Lavandero S. Mitochondria in Structural and Functional Cardiac Remodeling. *Advances in experimental medicine and biology* 982, 277–306 (2017).
49. Vásquez C., *Papel de Mul1 en la hipertrofia cardíaca y desensibilización a insulina inducidas por estrés lipotóxico*, Tesis en curso para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile (2018).
50. Wang Y., Qian Y., Fang Q., Zhong P., Li W., Wang L., Fu W., Zhang Y., Xu Z., Li X. & Liang G. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nat Commun.* 3;8:13997 (2017).
51. Wende A. R., Symons J. D., & Abel E. D. Mechanisms of lipotoxicity in the cardiovascular system. *Current hypertension reports* 14(6), 517–531 (2012).
52. Wilkins B. J., Dai Y. S., Bueno O. F., Parsons S. A., Xu J., Plank D. M., Jones F., Kimball T. R., & Molkentin D. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation research* 94(1), 110–118 (2004).
53. Wilson E. & Metzakopian E. ER-mitochondria contact sites in neurodegeneration: genetic screening approaches to investigate novel disease mechanisms. *Cell death and differentiation*, 10.1038/s41418-020-00705-8 (2021).
54. Xue R., Zhao M., Wu Q., Yang S., Cui Y., Yu X., Liu J. & Zang W. Regulation of mitochondrial cristae remodelling by acetylcholine alleviates palmitate-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Free Radic Biol Med.* 145:103-117 (2019).
55. Ying Y., Zhu H., Liang Z., Ma X. & Li S. GLP1 protects cardiomyocytes from palmitate-induced apoptosis via Akt/GSK3b/b-catenin pathway. *J Mol Endocrinol.* 55(3):245-62 (2015).
56. Zhang K., Zhou Q., Guo Y., Chen L., & Li L. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) involve in the regulation of mitochondrial dysfunction and heart failure. *Acta Biochim Biophys Sin* 50(6), 618-619 (2018).
57. Zhang L., Malik S., Pang J., Wang H., Park K., Yule D., Blaxall B., & Smrcka A. Phospholipase C ϵ hydrolyzes perinuclear phosphatidylinositol 4-phosphate to regulate cardiac hypertrophy. *Cell.* 153(1), 216-27 (2013).
58. Zhao Y., Ponnusamy M., Liu C., Tian J., Dong Y., Gao J., Wang C., Zhang Y., Zhang L., Wang K., & Li P. MiR-485-5p modulates mitochondrial fission through targeting mitochondrial anchored protein ligase in cardiac hypertrophy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1863, 2871-2881 (2017).
59. Zemirli N., Pourcelot M., Ambroise G., Hatchi E., Vazquez A., & Arnoult D. Mitochondrial hyperfusion promotes NF-kappaB activation via the mitochondrial E3 ligase MULAN. *FEBS J.* 281, 3095-3112 (2014).