

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“TRIMETAZIDINA PROTEGE AL CARDIOMICITO DE LA FISIÓN
MITOCONDRIAL Y COLAPSO METABÓLICO INDUCIDO POR PALMITATO”**

**Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Farmacología**

Por:

JOVAN PAOLO KUZMICIC PREVITALI

Director de Tesis

DR. SERGIO LAVANDERO GONZÁLEZ

SANTIAGO – CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

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

JOVAN PAOLO KUZMICIC PREVITALI

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de de 2013.

Director de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero G. _____

Comisión Informante:

Dr. Juan Carlos Vera C. (Presidente) _____

Dr. Jorge Martínez W. _____

Dr. Jorge Ferreira P. _____

Dr. Hernán Lara P. _____

**Dedicada a Diego García,
para que este trabajo, y muchos otros,
alimenten tu pequeña e infinita curiosidad.**

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares y fue dirigida por el Dr. Sergio Lavandero, perteneciente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y del Centro Estudios Moleculares de la Célula, Programa Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las investigaciones de la producción intracelular de ceramidas se realizaron en el Laboratorio del Dr. David Bernlohr del Department of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics, Faculty of Biological Sciences, University of Minnesota, Twin Cities, Minnesota, USA en colaboración con el Dr. Michael Jensen, de la Endocrine Research Unit, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA.

Para su realización, esta tesis contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca de Doctorado Nacional años 2009-2013, CONICYT 21090278 (J.K.).
- Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral años 2012-2013, CONICYT 24110170 (J.K.).
- Beca de Pasantías y Cotutelas Doctorales en el Extranjero años 2011-2012, CONICYT-CHILE 75110042 (J.K.).
- Beca del Programa de Investigación DOMEYKO en Salud de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile, año 2011 (J.K.)
- Beca "PABMB/ASBMB Promoting Research Opportunities for Latin American Biochemists (PROLAB)" de la American Society of Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB), USA, años 2011-2012 (J.K.)
- Proyecto FONDAP 15010006 (2002-2012) a S.L.
- Proyectos FONDECYT 1080436 (2008-2012) y 1120212 (2012-2015) a S.L.
- Proyecto MECESUP UCH0606 (S.L.)
- Proyecto Anillo de Investigación en Ciencia y Tecnología ACT 1111 (2012-2015) a S.L.

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

Publicaciones

Kuzmicic J, Castro P, Parra V, López-Crisosto C, Verdejo HE, Chiong M, García L, Lavandero S. Trimetazidine prevents palmitate-induced mitochondrial fission and dysfunction in cardiomyocytes. MS en preparación, 2013.

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

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

Curtis JM, Hahn WS, Stone MD, Inda JJ, Drouillard DJ, **Kuzmicic JP**, Donoghue MA, Long EK, Armién AG, Lavandero S, Arriaga E, Griffin TJ, Bernlohr DA. Protein carbonylation and adipocyte mitochondrial function. *J Biol Chem.* 2012;287:32967-80.

Bravo-Sagua R, Rodríguez AE, **Kuzmicic J**, Gutierrez T, Lopez-Crisosto C, Quiroga C, Díaz-Elizondo J, Chiong M, Gillette TG, Rothermel BA, Lavandero S. Cell death and survival through the endoplasmic reticulum-mitochondrial axis. *Curr Mol Med.* 2013;13:317-29.

Parra V, Moraga F, **Kuzmicic J**, López-Crisosto C, Troncoso R, Torrealba N, Criollo A, Díaz-Elizondo J, Rothermel BA, Quest AF, Lavandero S. Calcium and mitochondrial metabolism in ceramide-induced cardiomyocyte death. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832:1334-44.

Parra V, Verdejo HE, Iglewski M, del Campo A, Troncoso R, Jones D, Zhu Y, **Kuzmicic J**, Pennanen C, Lopez-Crisosto C, Jaña F, Ferreira J, Noguera E, Chiong M, Bernlohr DA, Klip A, Hill JA, Rothermel BA, Abel ED, Zorzano A, Lavandero S. Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFκB-Opa-1 signaling pathway. **Diabetes**, published ahead of print 2013;doi:10.2337/db13-0340.

Hahn WS, **Kuzmicic J**, Burrill JS, Donoghue MA, Jensen MD, Lavandero S, Arriaga E, Bernlohr DA. Pro-inflammatory cytokines regulate adipocyte mitochondrial dynamics and cellular metabolism. MS en revisión, 2013.

Congresos Internacionales

Kuzmicic J, Verdejo H, García L, González S, Pedrozo Z, Toro B, Zalaquett R, Chiong M, Lavandero S, Corbalán R. Evidence of impaired cardiac autophagic flux in patients developing post-operative atrial fibrillation. ESC Congress 2010. Estocolmo, Suecia, 2010.

Kuzmicic J, Hahn W, Burrill J, Lavandero S, Bernlohr D. Effect of proinflammatory cytokines on mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. Experimental Biology Congress 2012. San Diego, California, USA, 2012.

Kuzmicic J, Parra V, Verdejo H, Chiong M, Lavandero S, Castro P. Trimetazidine protects cardiomyocytes from mitochondrial fission and dysfunction induced by palmitate. XX Meeting ISHR Latin American Section. Santiago, Chile, 2012.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar estas líneas agradeciendo a todos quienes hicieron posible este trabajo:

Al Dr. Sergio Lavandero, por ser un excelente tutor y acogerme en su laboratorio sin conocerme demasiado. Por abrirme las puertas a un universo diferente y por haber guiado este trabajo, cuyos frutos se reflejan no solo en este escrito. Haber llegado a este laboratorio fue el comienzo de una gran experiencia que, espero, no se acabe ahora.

Al Dr. Mario Chiong y a Fidel Albornoz, quienes siempre estuvieron dispuestos a extender una mano y a brindarme su ayuda, desde las cosas más sencillas hasta las más complejas. Sin vuestra compañía, todo habría sido infinitamente más difícil.

A mis amigos “mitocondrios”, grupo del cual tuve el honor de guiar durante algunos meses (pese al dolor de cabeza que eso significó). A ellos les debo gran parte de las ideas que aquí se realizaron, los trabajos que hemos desarrollado y la motivación para seguir adelante en la búsqueda del conocimiento. Siempre estuvieron ahí para extender nuestros propios límites y obligarnos a ir un paso más adelante. Muchas gracias por haber sido una guía todos estos años.

Quisiera dedicarles un espacio especial a aquellos amigos con quienes compartí de manera especial esta experiencia y este nuevo hogar. A Valentina Parra y Hugo Verdejo, ustedes fueron aquellos ejemplos a seguir. Tengo el

orgullo de considerarlos mis amigos, con quienes compartimos muchos momentos, no solo científicos, y quienes fueron mis compañeros de vida durante este tiempo. Muchas gracias Valentina por tu amistad, tu cariño y por estar ahí siempre que te necesité. Gracias Hugo por tu compañía y tus consejos. A Andrea del Campo, muchas gracias por acompañarme en este recorrido, por ser mi paño de lágrimas en todos esos momentos difíciles y por todos esos cafés bien conversados. A Carolina Fernández, por ser esa amiga incondicional. Gracias a Rodrigo, Felipe, Roberto y Christian, por alegrarme esos días negros y darme ganas de ir al laboratorio a pasar un momento agradable y no solo a trabajar. Muchas gracias a todos por formar parte de esta linda familia y transformar nuestro laboratorio en una experiencia increíble día a día.

Quiero agradecer a mi familia por todo el apoyo y el cariño durante estos años. A mis padres, Boris y Marisa, por haberme entregado las herramientas para por ser quién soy hoy y por haber fomentado esa curiosidad por el conocimiento desde pequeño. A mis hermanos, Stevan y Lenko, por darme una razón más para hacer las cosas bien, por vuestro cariño y apoyo. A mis tíos, Liliana y José, junto con Carolina y Cristián, por haberme brindado un hogar durante estos años, aguantar mis mañas, y por apoyarme en este proceso. A mis sobrinos, especialmente a Diego, por ser una fuente de inspiración de que, a pesar de lo difícil de las cosas, uno siempre sale adelante. A mis nonos, por

haberme acogido y cuidado todos estos años. A todos ustedes muchas gracias.

Por último quiero agradecer a Catalina, quién me acompañó desde el mismísimo comienzo de esta etapa. Muchas gracias por todo tu apoyo incondicional, tus consejos, tu sabiduría y tu cariño. Sin ti nunca habría logrado llegar hasta aquí.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	10
ÍNDICE DE FIGURAS	14
ABREVIATURAS	18
RESUMEN	22
SUMMARY	25
1. INTRODUCCIÓN	28
1.1. Metabolismo cardíaco	28
1.2. Metabolismo de ácidos grasos en el corazón.....	31
1.3. Funciones generales de la mitocondria	33
1.4. Fisión y fusión mitocondrial.....	35
1.5. Dinámica mitocondrial y metabolismo	42
1.6. Cambios metabólicos asociados a patología	44
1.7. Manipulación del sustrato metabólico en IC	45
1.8. Trimetazidina	47
1.9. Gluco-lipotoxicidad celular	49
1.10. Toxicidad por palmitato en cardiomiocitos.....	54
1.11. Palmitato y morfología mitocondrial.....	57
2. HIPÓTESIS	59
3. OBJETIVO GENERAL	59
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59

5. MATERIALES Y MÉTODOS	60
5.1. Reactivos	60
5.2. Modelo de cultivo celular	61
5.3. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata	61
5.4. Preparación de lípidos	63
5.5. Cálculo de la concentración de palmitato libre	63
5.6. Diseño experimental	64
5.7. Preparación de extractos celulares totales de proteínas	64
5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida	67
5.9. Electrotransferencia de proteínas	67
5.10. Western blot.....	67
5.11. Inmunofluorescencia indirecta	69
5.12. Determinación del potencial de membrana mitocondrial y masa mitocondrial mediante citometría de flujo	70
5.13. Determinación de viabilidad celular y población SubG1 mediante citometría de flujo	71
5.14. Determinación de niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno mediante citometría de flujo	73
5.15. Determinación de los niveles intracelulares de ATP mediante luminometría.....	74
5.16. Medición de la velocidad de consumo celular de oxígeno mediante oxigrafía de Clark	74

5.17. Detección de esfingolípidos intracelulares por cromatografía en fase líquida y espectroscopía de masa.....	76
5.18. Determinación de la morfología mitocondrial	77
5.19. Determinación de depósitos intracelulares de lípidos neutros	78
5.20. Inmunodetección de esfingolípidos <i>in situ</i>	79
5.21. Análisis digital de imágenes	80
5.22. Análisis estadístico	81
6. RESULTADOS	82
6.1. Efectos de palmitato sobre la morfología mitocondrial	82
6.2. Efectos de palmitato sobre la distribución subcelular de las proteínas de fisión mitocondrial.....	86
6.3. Efectos de palmitato sobre la masa mitocondrial en cardiomiocitos	96
6.4. Efectos de palmitato sobre los niveles de las proteínas de dinámica mitocondrial	100
6.5. Efectos de palmitato sobre el metabolismo mitocondrial en los cardiomiocitos	103
6.6. Efectos de palmitato sobre la producción endógena de ceramidas	110
6.7. Efectos de palmitato en la sobrevivencia celular	112
6.8. Efectos de TMZ sobre la morfología mitocondrial de los cardiomiocitos...	115
6.9. Efectos de TMZ sobre los niveles de las proteínas de dinámica y masa mitocondrial	117
6.10. Efectos de TMZ sobre el metabolismo mitocondrial de los	

cardiomiocitos	122
6.11. Acción protectora de TMZ frente a la fisión y disfunción mitocondrial inducida por palmitato	126
6.12. Efectos de TMZ sobre el almacenamiento intracelular de lípidos y la producción de ceramidas	130
7. DISCUSIÓN	134
7.1. Relación entre morfología mitocondrial y metabolismo	135
7.2. Palmitato y fisión mitocondrial	139
7.3. Disfunción mitocondrial por palmitato	141
7.4. Palmitato, síntesis de ceramidas y fisión mitocondrial	144
7.5. TMZ y fusión mitocondrial.....	145
7.6. Potenciación metabólica por TMZ	147
7.7. Efecto protector de TMZ sobre la lipotoxicidad por palmitato.....	151
7.8. Relación entre TMZ y la acumulación de lípidos neutros	152
7.9. Lipotoxicidad	153
7.10. Modelo propuesto y proyecciones	155
8. CONCLUSIONES	160
9. BIBLIOGRAFÍA	162

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Metabolismo energético cardiaco	30
Figura 2. Proteínas de la fisión y fusión de la red mitocondrial en células mamíferas	37
Figura 3. Trimetazidina inhibe la β -oxidación de ácidos grasos	50
Figura 4. Acciones deletéreas de los AGLs en el cardiomiocito	53
Figura 5. Efectos de palmitato 2 nM sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocitos en cultivo	84
Figura 6. Efectos de palmitato 25 nM sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocitos en cultivo	85
Figura 7. Palmitato 2 nM no altera la distribución subcelular de DRP-1 en cardiomiocitos en cultivo	88
Figura 8. Palmitato 25 nM induce la translocación de DRP-1 hacia la mitocondria en cardiomiocitos en cultivo	90
Figura 9. Segmentación radial	93
Figura 10. Efectos de palmitato sobre la distribución radial de DRP-1 en cardiomiocitos en cultivo	94
Figura 11. Palmitato no afecta los niveles de expresión de HSP70 en cardiomiocitos en cultivo	98
Figura 12. Palmitato 25 nM induce pérdida de la fluorescencia de Mitotracker green en cardiomiocitos en cultivo	99

Figura 13. Palmitato no altera los niveles totales de DRP-1 en cardiomiocitos en cultivo	101
Figura 14. Palmitato no afecta los niveles totales de FIS-1 en cardiomiocitos en cultivo	102
Figura 15. Palmitato 2 nM no altera el potencial mitocondrial en cardiomiocitos en cultivo	104
Figura 16. Palmitato induce pérdida del potencial mitocondrial a tiempos tardíos en cardiomiocitos en cultivo	105
Figura 17. Palmitato reduce los niveles intracelulares de ATP en cardiomiocitos en cultivo	106
Figura 18. Palmitato reduce la velocidad de respiración basal y desacoplada en cardiomiocitos en cultivo	107
Figura 19. Palmitato no produce cambios en la cantidad de EROs en los cardiomiocitos en cultivo	109
Figura 20. Palmitato aumenta los niveles intracelulares de ceramidas en cardiomiocitos en cultivo	110
Figura 21. Palmitato reduce la viabilidad celular en cardiomiocitos en cultivo	113
Figura 22. Palmitato induce apoptosis en cardiomiocitos en cultivo	114
Figura 23. Efecto de trimetazidina sobre la morfología mitocondrial en cardiomiocitos en cultivo	116

Figura 24. TMZ no altera los niveles totales de las proteínas de fisión mitocondrial en cardiomiocitos en cultivo	118
Figura 25. TMZ no altera los niveles totales de las proteínas de fusión mitocondrial en cardiomiocitos en cultivo	119
Figura 26. TMZ no afecta los niveles de expresión de HSP70 en cardiomiocitos en cultivo	121
Figura 27. TMZ aumenta potencial mitocondrial a bajas concentraciones en cardiomiocitos en cultivo	123
Figura 28. TMZ aumenta los niveles intracelulares de ATP a bajas concentraciones en cardiomiocitos en cultivo	124
Figura 29. TMZ aumenta la velocidad de respiración basal y desacoplada a bajas concentraciones en cardiomiocitos en cultivo	125
Figura 30. TMZ protege de la fisión mitocondrial inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo	127
Figura 31. TMZ protege frente a la disminución de los niveles de ATP inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo	128
Figura 32. TMZ protege frente a la disminución del consumo celular de oxígeno inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo.....	129
Figura 33. TMZ promueve la acumulación de palmitato en forma de gotas de lípidos neutros en cardiomiocitos en cultivo	131

Figura 34. TMZ inhibe la producción de ceramidas inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo133

Figura 35. Modelo propuesto: Regulación de la morfología y función mitocondrial en respuesta a palmitato, TMZ y efecto protector de TMZ frente a palmitato158

ABREVIATURAS

Acetil-CoA	:	Acetil co-enzima A
ADP	:	Adenosina difosfato
AGL	:	Ácido graso libre
Akt	:	Proteína serina treonina kinasa B o PKB
AMP	:	Monofosfato de adenosina
ANT	:	Translocador de nucleótidos de adenina
ANOVA	:	Análisis de varianza
ATP	:	Adenosina trifosfato
β ox	:	β oxidación
BSA	:	Albúmina de suero bovino
CAF4P	:	Proteína de la fisión mitocondrial en levaduras
cAMP	:	Adenosina monofosfato cíclico
CCCP	:	Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
CPT1	:	Carnitina palmitoil transferasa 1
CPT2	:	Carnitina palmitoil transferasa 2
CK	:	Creatina kinasa
CoA	:	Coenzima A
CT	:	Carnitina acil traslocasa
C16:0	:	Palmitato
C18:0	:	Estearato

C18:1	:	Palmitoleato
DAG	:	Diacilglicerol
DME	:	Medio Eagle de cultivo modificado por Dulbecco
DNA	:	Ácido desoxirribonucleico
DNM-1	:	Proteína ortóloga de levaduras de DRP-1
DRP-1	:	Proteína relacionada a las dinaminas tipo-1
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
EROs	:	Especies reactivas del oxígeno
FABPmb	:	Isoforma de membrana plasmática de la proteína ligante de ácidos grasos
FACS	:	Acil-CoA sintetasa de ácidos grasos
FADH2	:	Forma oxidada del dinucleótido de flavina-adenina
FATP1/6	:	Proteínas transportadoras de ácidos grasos 1/6
FAT/CD36	:	Traslocasa de ácidos grasos (fatty acid traslocase/ <i>cluster of differentiation 36</i>)
FBS	:	Suero fetal bovino
FCS	:	Suero fetal de ternera
FIS-1	:	Proteína de la fisión mitocondrial en mamíferos
GED	:	Dominio efector de las GTPasas
GLUT	:	Proteína transportadora de glucosa
GTP	:	Guanosina trifosfato
GTPasa	:	Guanosina trifosfatasa

GSK3	:	Proteína glicógeno sintasa kinasa tipo 3
HSP70	:	Proteína " <i>heat shock protein 70</i> "
Hank's	:	Solución salina balanceada
H ₂ DCFDA	:	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
IC	:	Insuficiencia cardiaca
LPL	:	Lipoproteína lipasa
MDV1P	:	Proteína de la fisión mitocondrial en levaduras
MFF	:	Factor de fisión mitocondrial
MFN1/2	:	Proteína mitofusina 1/2
mRNA	:	Ácido ribonucleico mensajero
mtDNA	:	DNA mitocondrial
M199	:	Medio de cultivo 199
NBCS	:	Suero de cabra recién nacida
NADH	:	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMA-1	:	Metaloproteasa mitocondrial dependiente de zinc
OPA-1	:	Proteína de la atrofia óptica tipo-1
O ₂ ⁻	:	Anión superóxido
PA	:	Ácido fosfatídico
PARL	:	Proteasa romboidal mitocondrial
PARP	:	Polimerasa de poliADP-ribosa
PBS	:	Tampón fosfato salino
PCr	:	Fosfocreatina

PI	:	Yoduro de propidio
PKA	:	Proteína kinasa A
PMSF	:	p-Fenilmetilsulfonilfluoruro
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	:	Gel de poliacrilamida desnaturante
SEM	:	Error estándar de la media
SLP-2	:	Del inglés " <i>Stomatin-like protein 2</i> "
SUMO	:	Del inglés " <i>Small ubiquitin-like modifier</i> "
TAG	:	Triacilglicerol
TBS	:	Tampón tris salino
TBST	:	Tampón tris salino con Tween-20 0,1 % v/v
TCA	:	Ciclo del ácido cítrico
TMRE	:	Tetrametilrodamina metil éster
TMZ	:	Trimetazidina (1-(2,3,4-trimetoxibencil)piperacina)
Tris	:	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UPLC/MS/MS	:	Del inglés " <i>ultra high performance liquid chromatography</i> " acoplada a espectroscopía de masa
UCPs	:	Proteínas desacoplantes mitocondriales
VLDL	:	Lipoproteína de muy baja densidad
Ψ_{mt}	:	Potencial de membrana mitocondrial
3-CAT	:	3-Cetoacil tiolasa mitocondrial

RESUMEN

La insuficiencia cardiaca (IC) es una enfermedad caracterizada por alteraciones del metabolismo energético y la actividad mitocondrial del corazón, acompañada de una disminución del contenido cardiaco de ATP y alteraciones en los niveles de lípidos plasmáticos, evidenciado por un aumento de la concentración de palmitato, entre otros. Trimetazidina (TMZ) es un fármaco con eficacia antianginosa demostrada que actúa inhibiendo la β -oxidación (β ox) de ácidos grasos. Evidencias previas de la literatura sugieren que TMZ es útil en pacientes con IC. Paralelamente, ha sido ampliamente descrito que palmitato ejerce efectos tóxicos a nivel celular en distintos modelos, incluyendo los cardiomiocitos, por mecanismos poco comprendidos actualmente. En vista de lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar los efectos de palmitato y TMZ sobre la morfología y función mitocondrial de los cardiomiocitos. De manera complementaria se estudió, además, el posible efecto protector de TMZ frente a la toxicidad por sobrecarga de palmitato.

Para este fin, cardiomiocitos se aislaron de corazones de ratas neonatas, los cuales se trataron con palmitato (2 y 25 nM libre entre 0 y 24h) y/o TMZ (0,1-100 μ M por 24 h). Para evaluar los cambios morfológicos, las células se tiñeron con la sonda MitoTracker Green-FM y se visualizaron en un microscopio confocal. Para evaluar la función mitocondrial, se determinaron algunos parámetros metabólicos, entre los que se incluyó el consumo celular

de oxígeno, mediante oxigrafía de Clark, los niveles intracelulares de ATP, mediante un kit comercial (CellTiter-Glo) y el potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo usando la sonda tetrametil rodamina metil éster. Además se evaluó la acumulación intracelular de lípidos con la sonda LipidTOX mediante microscopía de fluorescencia y la producción de ceramidas por medio de inmunofluorescencia indirecta.

Los resultados mostraron que palmitato causó fisión mitocondrial, evidenciada como un aumento del 81% número de mitocondrias por célula ($p < 0,05$, $n=5$) y una disminución del 51% del volumen mitocondrial promedio ($p < 0,01$, $n=5$). Palmitato, además, causó una disminución del 18% en el consumo basal de oxígeno ($p < 0,05$, $n=3$) y de un 16% en la producción intracelular de ATP ($p < 0,05$, $n=6$). Paralelamente, TMZ produjo los efectos contrarios, es decir fusión mitocondrial evidenciada por una disminución del 44% en el número de mitocondrias ($p < 0,05$, $n=5$) y un aumento en el 40% de su volumen promedio ($p < 0,05$, $n=5$). Además, TMZ incrementó en un 15% el potencial mitocondrial ($p < 0,01$, $n=5$), en un 18% el consumo basal de oxígeno ($p < 0,01$, $n=3$) y el ATP intracelular en un 15% ($p < 0,01$, $n=6$). De manera interesante, la preincubación con TMZ protegió a los cardiomiocitos de la fisión dependiente de palmitato. Respecto a los resultados de metabolismo, observamos la misma tendencia: palmitato disminuyó todos los parámetros metabólicos, mientras que TMZ los aumentó y la preincubación con TMZ protegió frente a los efectos de palmitato. De manera interesante, la

preincubación con TMZ incrementó la acumulación de lípidos neutros al interior de las células evidenciada como un aumento 4,3 veces ($p < 0,05$, $n=6$) en el número de gotas de lípido por célula de 4,7 veces el área total de lípidos ($p < 0,05$, $n=6$). Ambos parámetros aumentaron más en presencia de palmitato y TMZ. Por otro lado, TMZ fue capaz de bloquear el aumento del 70% ($p < 0,01$, $n=5$) en la producción intracelular de ceramidas inducida por palmitato.

Del presente trabajo se concluye que palmitato indujo fisión y disfunción mitocondrial, mientras que TMZ sola causa fusión mitocondrial y potenciación metabólica, mientras que el pre tratamiento con TMZ protegió a los cardiomiocitos frente a la lipotoxicidad observada con palmitato. De estos resultados se desprende que el efecto beneficioso de TMZ en el tratamiento de IC podría depender de modificaciones de la función mitocondrial relacionadas al manejo de la sobrecarga celular de lípidos. Sin embargo, el mecanismo de acción específico requiere futuros estudios.

SUMMARY

Heart failure (HF) is a disease characterized by several alterations in cardiac metabolism and mitochondrial activity. This is accompanied by a decrease in cardiac ATP content and alterations in the levels of plasma lipids, evidenced by an increase in palmitate concentration, among others. Trimetazidine (TMZ) is an antianginal drug that inhibits fatty acid β -oxidation. Previous evidence suggests that TMZ could be helpful in the treatment of HF patients. In parallel, it has been greatly described that palmitate can exert toxic cellular effects in several models, including cardiomyocytes. However, the mechanism is poorly understood. Taking these evidences, the aim of the present study was to evaluate the effects of palmitate and TMZ on the mitochondrial morphology and function in cardiomyocytes. Additionally, we also evaluated the potential protective effect of TMZ on the toxicity induced by palmitate overload.

In order to accomplish this, we isolated neonatal rat cardiomyocytes that were treated with palmitate (2 and 25 nM free, 0-24h) and/or TMZ (0.1-100 μ M, 24 h). To assess changes in mitochondrial morphology, the cells were treated with MitoTracker Green FM and visualized under a confocal microscope. To analyze the changes in mitochondrial function, we determined some metabolic parameters including cellular oxygen consumption, by Clark oxygraphy, the intracellular levels of ATP, by a commercial kit (CellTiter-Glo) and the mitochondrial membrane potential by flow cytometry with the dye tetramethyl

rhodamine methyl ester. Furthermore, the intracellular lipid accumulation was evaluated by fluorescence microscopy with the dye LipidTOX and the production of ceramides was evaluated by indirect immunofluorescence.

Among the most relevant findings, we described that palmitate induced a significant mitochondrial fission evidenced by a 81% increase in the number of mitochondria per cell ($p < 0.05$, $n = 5$) and a 51% decrease in mitochondrial mean volume ($p < 0.01$, $n = 5$). Palmitate also induced a 18% decrease in the basal oxygen consumption rate ($p < 0.05$, $n = 3$), together with a 16% decrease in the intracellular ATP levels ($p < 0.05$, $n = 6$). On the other hand, TMZ had the opposite effects; it induced mitochondrial fusion by decreasing the number of mitochondria per cell (44%, $p < 0.05$, $n = 5$) and increasing their mean volume (40%, $p < 0.05$, $n = 5$). Additionally, TMZ increased by 15% the mitochondrial membrane potential ($p < 0.01$, $n = 5$), by 18% the basal oxygen consumption rate ($p < 0.01$, $n = 3$), and by 15% the intracellular ATP levels ($p < 0.01$, $n = 6$). The pretreatment with TMZ had a protective effect from the lipotoxic damage of palmitate by preventing mitochondrial fission. Relative to the metabolic findings, we report that palmitate induced a metabolic collapse evidenced by a decrease in all the parameters assessed, while TMZ had the opposite effects (increased metabolism) and protected from the palmitate-induced damage. Interestingly, the pretreatment with TMZ increased by 4.3 fold ($p < 0.05$, $n = 6$) the number of lipid droplets per cell and by 4.7 fold ($p < 0.05$, $n = 6$) the total lipid area. Both parameters further increased in the presence of palmitate and TMZ. On the

other hand, TMZ was also able to blunt the 70% increase ($p < 0.01$, $n = 5$) in the intracellular ceramide production induced by palmitate.

From the present report we conclude that palmitate induced mitochondrial fission and dysfunction, while TMZ alone causes mitochondrial fusion and metabolic potentiation. The pretreatment with TMZ protected the cardiomyocytes from palmitate-induced lipotoxicity. From these data we can speculate that the beneficial effects of TMZ on HF treatment could be related to changes in mitochondrial function and the cellular handling of lipid overload. However, the precise mechanism of such protection requires future studies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Metabolismo cardiaco

El corazón tiene como función bombear sangre, a través del sistema circulatorio, para asegurar la entrega de nutrientes y la eliminación de productos de desecho en todos los tejidos del organismo. Este órgano está compuesto principalmente por dos tipos celulares: los cardiomiocitos, que dan cuenta de la función contráctil y equivalen a un tercio del contenido total de células; y los fibroblastos, cuyo papel es modelar la matriz extracelular, representando los dos tercios de células restantes (Weber et al., 1993). Los cardiomiocitos son células post-mitóticas, altamente especializadas que se diferencian rápidamente en el periodo neonatal para cumplir la función contráctil (Chien et al., 1991).

Debido a su función mecánica incesante, el corazón tiene una alta demanda energética y debe generar ATP continuamente para mantener la actividad contráctil, los procesos metabólicos basales y la homeostasis iónica. Se estima que la cantidad necesaria de ATP diario para el corazón equivale a 70 veces su peso (Taegtmeyer, 1994). La importancia del balance energético cardiaco y sus implicancias en patología se hacen particularmente evidentes en el caso de la insuficiencia cardiaca (IC). De hecho, ya a finales de los años 30 se describió una reducción en los niveles de fosfatos de alta energía en los corazones de pacientes con IC (Herrmann & Decherd, 1939), poniendo en evidencia la relación entre metabolismo energético y patología. De manera más

reciente, estudios espectroscópicos han confirmado estos hallazgos en la IC (Neubauer et al., 1995; Neubauer, 2007).

En el corazón adulto normal, la gran mayoría (~95%) de la producción de ATP proviene de la fosforilación oxidativa mitocondrial, mientras que el remanente se obtiene mediante glicólisis anaeróbica y el GTP formado en el ciclo de Krebs (Lopaschuk et al., 2010) (**Figura 1**). El contenido de ATP en el corazón es relativamente bajo (5 $\mu\text{mol/g}$) y la tasa de hidrólisis de ATP es elevada ($\sim 30 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ en reposo), por lo que el *pool* de ATP miocárdico se renueva por completo cada 10 s, aproximadamente (Neely & Morgan, 1974). Para suplir esta demanda energética, el corazón puede utilizar una variedad de fuentes de carbono para la síntesis de ATP. Sin embargo, en el corazón adulto, alrededor del 70% del ATP proviene de la β -oxidación (βox) de ácidos grasos (Neely & Morgan, 1974).

La βox es regulada de manera compleja y dependiente de varios factores, incluyendo: a) el suministro de ácidos grasos al corazón; b) la competencia con otras fuentes de energía (glucosa, lactato, cuerpos cetónicos, aminoácidos); c) la demanda energética del corazón; d) el suministro de oxígeno; e) el control alostérico de la incorporación, esterificación y transporte mitocondrial de los ácidos grasos; y f) la función mitocondrial, incluyendo el control directo sobre la βox , el ciclo de Krebs y la actividad de la cadena transportadora de electrones (Lopaschuk et al., 2010). Alteraciones en la βox pueden tener consecuencias energéticas y funcionales graves en el corazón.

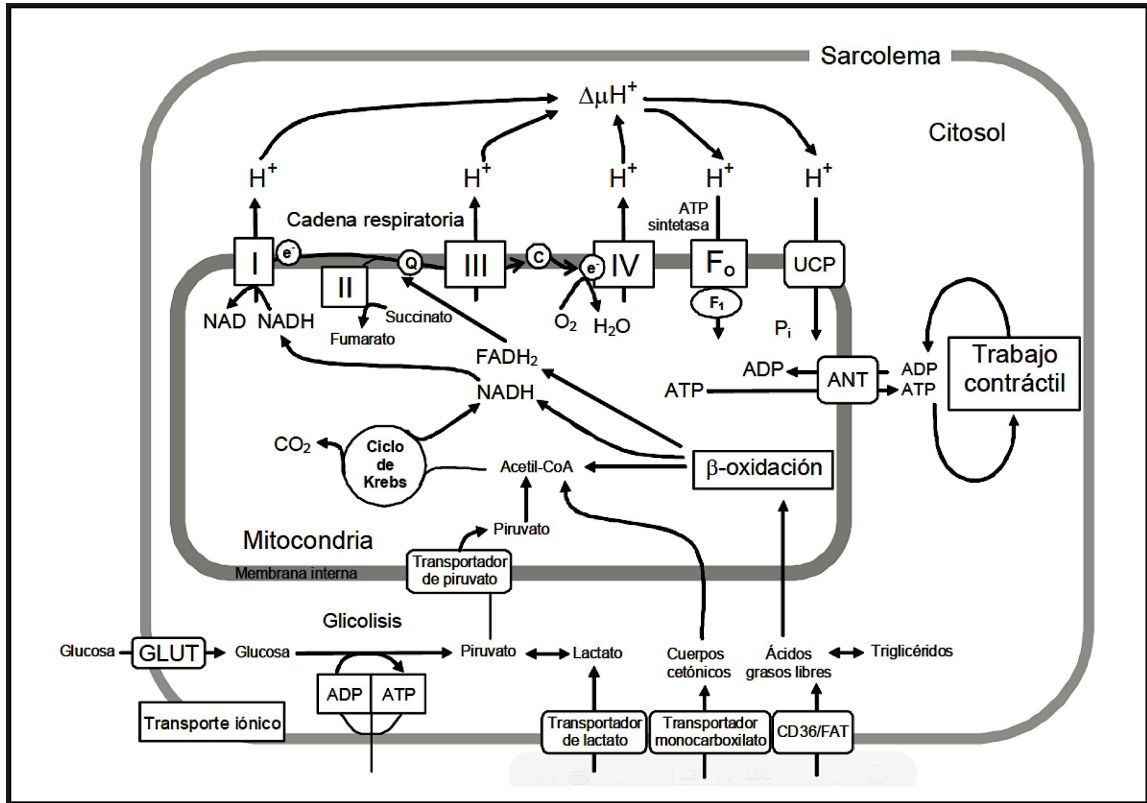


Figura 1. Metabolismo energético cardíaco. La βox de los ácidos grasos y el ciclo de Krebs producen NADH y FADH₂, los cuales son oxidados por los complejos I y II de la cadena de electrones, respectivamente. Los electrones son transportados por la cadena de electrones hasta el aceptor final (O₂). La energía libre de la cadena de electrones se usa para bombear protones fuera de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana para así generar una gradiente electroquímica a través de la membrana mitocondrial interna. Esta gradiente se utiliza para generar ATP mediante la ATP sintetasa. En forma alternativa, los protones (H⁺) pueden entrar a la mitocondria por un mecanismo no acoplado a la síntesis de ATP, lo cual se efectúa a través proteínas desacopladoras (UCPs), resultando en disipación de energía como calor. GLUT, transportador de glucosa; ANT, transportador de nucleótidos de adenosina; I, II, III y IV corresponden a los complejos I, II, III y IV de la cadena transportadora de electrones; Fo y F1 son las subunidades de la ATP sintetasa.

1.2. Metabolismo de ácidos grasos en el corazón

La regulación de la β ox ocurre en casi todas las etapas de la vía metabólica, desde los niveles de lipoproteína lipasa (LPL), la incorporación de ácidos grasos al cardiomiocito, la esterificación a coenzima A (CoA), la incorporación a la mitocondria, hasta la tasa misma de β ox. Además, la velocidad de β ox es muy dependiente de la actividad del ciclo de Krebs y de la cadena transportadora de electrones (Lopaschuk et al., 2010).

Los ácidos grasos llegan al corazón como ácidos grasos libres (AGLs) unidos a albúmina o como ácidos grasos liberados desde triacilglicerol (TAG) contenido en quilomicrones o en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (van der Vusse et al., 2000). Normalmente, ambas fuentes contribuyen al suministro total de ácidos grasos en el corazón.

Los niveles circulantes normales de AGLs están en un rango entre 0,2 y 0,6 mM (Stanley, 2005). Sin embargo, esta concentración puede variar dramáticamente desde valores muy bajos, como en la circulación fetal, hasta 2 mM en condiciones patológicas como isquemia cardiaca y diabetes descontrolada (Kurien & Oliver, 1971). Además, la activación simpática puede liberar AGLs desde tejido adiposo (Kurien & Oliver, 1971), aumentando su concentración plasmática. Esto cobra importancia fisiopatológica en condiciones que implican aumento del tono simpático como ocurre durante isquemia cardiaca (Kurien & Oliver, 1971) o en la IC crónica (Stanley, 2005). El aumento crónico de los niveles de AGLs es un importante determinante del

aumento en la captación y β ox de ácidos grasos en tejido cardíaco observado en estas patologías.

Aunque inicialmente se postulaba que el transporte de ácidos grasos ocurriría por difusión pasiva, debido a su naturaleza hidrofóbica, hoy en día la evidencia experimental apoya fuertemente la idea de que el transporte de ácidos grasos opera asociado a proteínas receptoras (Lopaschuk et al., 2010). Dentro éstas se incluyen la traslocasa de ácidos grasos (FAT)/CD36 (Goldberg et al., 2009), la isoforma de membrana plasmática de la proteína ligante de ácidos grasos (FABPmb) y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP 1/6) (van der Vusse et al., 2000). FAT/CD36 es la proteína más estudiada y tiene el papel protagónico en el transporte de ácidos grasos en cardiomiocitos. Mediante estudios de inhibición (Luiken et al., 2004) y deleción genética (Kuang et al., 2004) se estableció que el 50-60% de la incorporación de ácidos grasos ocurre vía FAT/CD36 en el corazón (Lopaschuk et al., 2010).

Una vez en el interior del cardiomiocito, los ácidos grasos son transportados a la mitocondria para su oxidación. La carnitina palmitoiltransferasa (CPT) 1 es una enzima mitocondrial clave en este proceso al catalizar la conversión de los acil-CoA de cadena larga a acil-carnitina de cadena larga. Luego los acil-carnitina formados son trasladados a través de la membrana interna de la mitocondria por la carnitina:acil-carnitina traslocasa (CT), que involucra el intercambio de carnitina por acil-carnitina (Longo et al., 2006). CT transporta acil-carnitina a la matriz mitocondrial para su oxidación y

carnitina libre para la reacción de CPT 1. Además, CT tiene baja especificidad por ésteres de carnitina y es un paso crítico en la incorporación de ácidos grasos a la mitocondria, como lo evidencia el desarrollo de diversas cardiomiopatías y alteraciones rítmicas en los corazones de pacientes con deficiencias de CT (Longo et al., 2006).

1.3. Funciones generales de la mitocondria

Las mitocondrias son organelos complejos y altamente especializados que juegan un papel esencial en la homeostasis metabólica de las células eucariontes. Son organelos de doble membrana con cuatro compartimentos definidos: membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna y matriz mitocondrial (Soubannier & McBride, 2009). Las mitocondrias cumplen varias funciones en las células: son los centros generadores de energía, en forma de ATP, a través de la fosforilación oxidativa, participan en el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos, además de participar en los procesos de muerte y envejecimiento celular (Scheffler, 2001).

La visión clásica de la morfología mitocondrial ha cambiado desde los estudios iniciales, mediante microscopía electrónica, que mostraban a las mitocondrias como organelos esféricos e independientes. Actualmente, se entiende que las mitocondrias forman un retículo complejo, interconectado y dinámico, mantenido por un balance de eventos opuestos de fisión y fusión mitocondrial (Westermann, 2002; Kuzmich et al., 2011; Parra et al., 2011).

Cada tipo celular tiene una morfología y distribución intracelular característica, en donde el número de túbulos y sus conexiones están dinámicamente controladas. El término “dinámica mitocondrial” se ha acuñado para referirse al menos a tres procesos diferentes (Kuzmicic et al., 2011; Parra et al., 2011): a) El remodelado de la red mitocondrial mediante los procesos de fisión y fusión, los cuales están íntimamente conectados al estado metabólico de la célula mediante la actividad de un grupo de GTPasas relacionadas con la familia de las dinaminas; b) La motilidad subcelular, particularmente relevante en células polarizadas, que corresponde al desplazamiento de las mitocondrias asociadas a los motores moleculares kinesina 1 y 3 y a los adaptadores Milton y Miro (Hirokawa & Takemura, 2005), lo que asegura el suministro local de ATP en aquellos procesos biológicos con mayores requerimientos energéticos, junto con el uso de las mitocondrias como tampones intracelulares de calcio (Saxton & Hollenbeck, 2012); y c) al remodelamiento de la ultraestructura y condensación de la matriz mitocondrial, procesos tradicionalmente considerados como un reflejo del estado metabólico (Scalettar et al., 1991). De esta forma, los cambios en dinámica mitocondrial coinciden con un amplio número de procesos fisiológicos. Por ejemplo, durante la apoptosis el remodelado de las crestas mitocondriales coincide con la transición entre diferentes estados respiratorios de la mitocondria y con el acceso de proteínas como citocromo c al poro de transición mitocondrial (Zhang et al., 2008). Tradicionalmente se ha considerado que el remodelado de las crestas

mitocondriales y la condensación de la matriz son un reflejo del estado metabólico de la mitocondria (Scalettar et al., 1991). De manera concordante, la pérdida de la función de estructuración de las crestas mitocondriales, dependiente de la proteína OPA-1, lleva a una caída en el potencial mitocondrial, fisión de la red y susceptibilidad aumentada a la muerte por apoptosis (Olichon et al., 2003).

1.4. Fisión y fusión mitocondrial

El ciclo mitocondrial normal implica procesos frecuentes y controlados de fisión y fusión (**Figura 2**) con alta frecuencia en la célula (Kuzmicic et al., 2011; Parra et al., 2011). Perturbaciones en estos eventos llevan a la disfunción de las mitocondrias. La fusión permite la difusión de metabolitos de la matriz mitocondrial y el intercambio de proteínas y DNA. Por otra parte, la fisión permite la separación de elementos despolarizados del retículo. Estas mitocondrias disfuncionales de menor potencial tienen menor probabilidad de fusionarse nuevamente y, con frecuencia, son degradadas por procesos autofágicos (mitofagia) (Twig et al., 2008).

Maquinaria molecular de fisión

En mamíferos, la fisión mitocondrial está regulada por la proteína DRP-1, una proteína relacionada con la familia de las dinaminas, GTPasas que regulan el tráfico de vesículas y la endocitosis. El mecanismo de acción

molecular de DRP-1 (y las dinaminas) aún no está definido. Sin embargo, se postula que tienen una acción de mecanoenzimas, participando activamente en el corte de membranas por constricción (Bossy-Wetzel et al., 2003). Para el ortólogo de levaduras, DNM-1, se ha determinado que tiene la capacidad de oligomerizar y formar espirales dependientes de GTP, indicando una regulación positiva de la función de DNM-1 de acuerdo a la concentración de este nucleótido (Ingerman et al., 2005). Mutaciones en el dominio de unión a GTP bloquean la capacidad de agregación *in vitro* y la fisión mitocondrial *in vivo* (Naylor et al., 2006). DRP-1

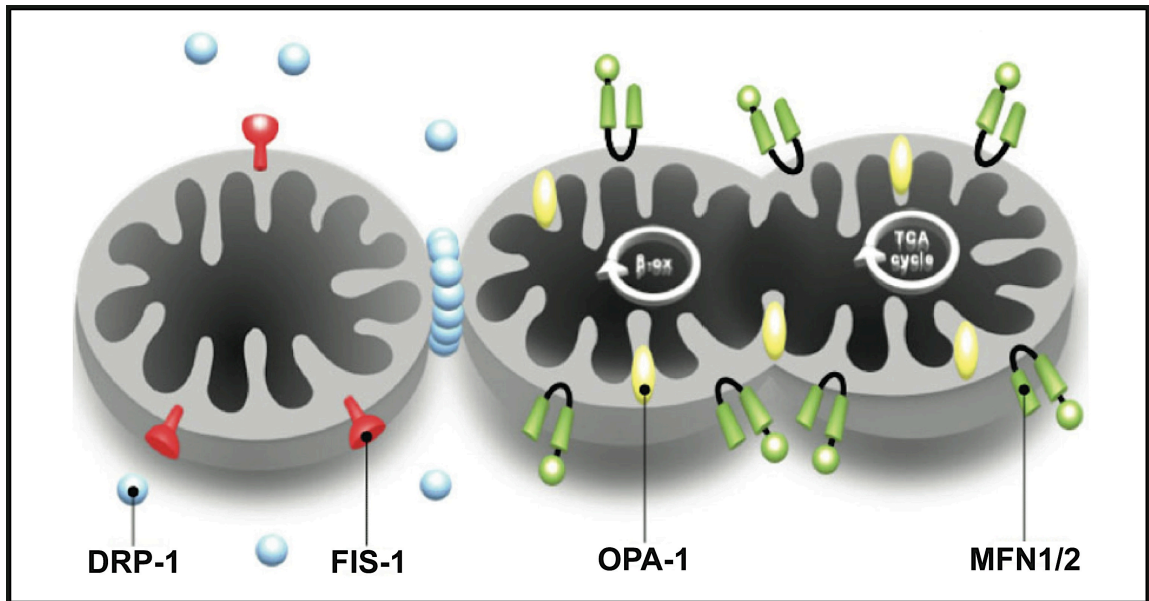


Figura 2. Proteínas de la fisión y fusión de la red mitocondrial en células mamíferas. Durante la fisión, la proteína FIS-1 recluta a la GTPasa DRP-1 en sitios definidos de la membrana mitocondrial externa. En cambio, en la fusión, dos mitocondrias se acoplan a través de las proteínas MFN-1 y MFN-2 por interacciones de dominios cola-cola, las cuales se encuentran localizadas en la membrana mitocondrial externa. Posteriormente, la proteína OPA-1, parcialmente anclada a la membrana mitocondrial interna, es la encargada de llevar a cabo en forma completa el proceso de fusión mitocondrial (Adaptado de Parra et al., 2011).

también forma oligómeros en presencia de GTP *in vitro*, con mayor eficiencia que DNM-1, pero no en espirales extendidos, sino que en anillos simples (Yoon et al., 2001).

DRP-1 es una proteína de ubicación citoplasmática que carece de secuencia de destinación mitocondrial, por lo que debe ser reclutada a la membrana mitocondrial para ejercer su función. Se ha postulado que la proteína FIS-1, ubicada en la membrana mitocondrial externa, actúa como receptor mitocondrial para el ensamblaje de complejos de fisión mitocondrial (Bossy-Wetzel et al., 2003). Sin embargo, estos hallazgos no han sido confirmados en células mamíferas. Paralelamente se ha mostrado que disminuciones leves de la expresión de FIS-1, mediante siRNA, no alteran la translocación de DRP-1 hacia la mitocondria (Lee et al., 2004). En levaduras, en cambio, las mutaciones de FIS-1 bloquean por completo la traslocación de DNM-1 a la mitocondria. Además, se ha descrito la existencia de algunas proteínas adaptadoras como MDV1P y CAF4P (Griffin et al., 2005) relacionadas con la fisión mitocondrial de levaduras. MDV1P participa en la activación de DNM-1 luego de que es reclutada en la mitocondria (Tieu et al., 2002). La existencia de estas proteínas, o similares, no ha sido demostrada en mamíferos. Sin embargo, recientemente se describió el papel del factor de fisión mitocondrial (MFF) en el reclutamiento de DRP-1 hacia la mitocondria mediante interacción directa en células HeLa (Otera et al., 2010).

Interesantemente, la fisión mitocondrial mediada por la interacción DRP-1-MFF parece ser independiente de FIS-1 (Otera et al., 2010).

La regulación de la actividad de las proteínas involucradas en fisión depende de modificaciones post-transduccionales como ubiquitinación, SUMOilación y fosforilación. La traslocación de DRP-1 a la mitocondria depende de SUMOilación (Wasiak et al., 2007), ya que la sobreexpresión de SUMO-1 (Harder et al., 2004) o el silenciamiento de la proteasa SUMO/sentrin protease 5 (SEN5) (Zunino et al., 2007) aumentan la estabilidad de DRP-1 y su traslocación a la mitocondria, promoviendo la fisión mitocondrial. Además, DRP-1 es blanco de fosforilación de ciclina B1 (Taguchi et al., 2007), proteína quinasa A (PKA) (Cribbs & Strack, 2007) y glicógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β) (Chou et al., 2012). Dependiendo del sitio de fosforilación, la actividad de DRP-1 puede aumentar o disminuir, por lo que en este punto pueden converger la información de las cascadas de señalización celular y el proceso de dinámica mitocondrial.

Actualmente, la evidencia disponible acerca del papel fisiológico de la fisión mitocondrial y su relación con los estados metabólicos, o la eficiencia mitocondrial, son materia de debate. Sin embargo, la fisión mitocondrial se ha relacionado con procesos de muerte celular. De hecho, durante la apoptosis, la morfología mitocondrial cambia a un estado fisionado, con aumento del número y reducción del tamaño de las mitocondrias (Frank et al., 2001). Además, el reclutamiento de DRP-1 a la mitocondria requiere la interacción con BAX, la

cual está relacionada con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la salida de citocromo c (Martinou & Youle, 2006). En esta línea de trabajo, nuestro grupo ha evaluado la relación entre los procesos de fisión mitocondrial y los eventos tempranos de la muerte inducida por ceramidas en el cardiomiocito, encontrando resultados similares (Parra et al., 2007; Parra, et al., 2013a). Por otra parte, la fisión mitocondrial se ha vinculado con la respuesta a condiciones de estrés metabólico (Yu et al., 2006) y autofagia (Twig et al., 2008). Sin embargo, la fisión mitocondrial ocurre constantemente, en todas las células y en condiciones normales.

Maquinaria molecular de fusión

En la fusión mitocondrial participan tres GTPasas de alta masa molecular, cuyas funciones son clave para este proceso: mitofusinas 1 y 2 (MFN-1 y MFN-2) y OPA-1 (Chen et al., 2003; Eura et al., 2003; Cipolat et al., 2006). Las mitofusinas difieren levemente en su actividad, mientras que MFN-1 tiene una alta tasa de hidrólisis y baja afinidad por nucleótidos, similar a las dinaminas, MFN-2 presenta baja velocidad de hidrólisis con una afinidad por nucleótidos similar a la de otras GTPasas regulatorias (Ishihara et al., 2004). Las mitofusinas junto con proteínas, como MIB y Stomatin-like protein 2 (SLP-2), participan en el establecimiento de complejos macromoleculares que regulan la fusión de la membrana mitocondrial externa (Eura et al., 2006; Hájek et al., 2007). Para la fusión mitocondrial, además de la participación de estos

complejos, es necesaria la modificación lipídica de la membrana. En mamíferos, esta función depende de la actividad de una fosfolipasa D mitocondrial que cataliza el paso de cardiolipina a ácido fosfatídico (PA). A pesar de que el rol de PA en la fusión mitocondrial no está establecido, es posible que participe ayudando a la curvatura de las membranas posterior al anclaje de MFN-1 y MFN-2 o permitiendo el reclutamiento de otros mediadores del proceso (Choi et al., 2006). OPA-1 es una proteína asociada a la fusión de las membranas internas y presenta una secuencia de destinación mitocondrial (Bossy-Wetzel et al., 2003), se encuentra en el espacio intermembrana y asociada a la cara interna de la mitocondria (Olichon et al., 2002). Existen al menos 8 isoformas de OPA-1 generadas por corte y empalme alternativo (Delettre et al., 2001) y por acción de las metaloproteasas AAA (Guillery et al., 2008), la proteasa romboidal PARL (Cipolat et al., 2006) y la peptidasa independiente de ATP OMA1 (Ehses et al., 2009). Al igual que su ortólogo en levaduras, es posible que el procesamiento de OPA-1 dependa del estado metabólico de la mitocondria. Se ha descrito que en condiciones de pérdida de potencial, como ocurre durante la apoptosis, se favorece la degradación de las formas de alta masa molecular de OPA-1, lo que parece asociarse con la incapacidad de realizar fusión en estos elementos despolarizados (Guillery et al., 2008). La evidencia disponible sugiere que la fusión de las membranas externa e interna son eventos que operan de forma independiente y separada. La fusión de la membrana externa requiere baja hidrólisis de GTP, mientras

que la fusión de las membranas internas requiere de altos niveles de GTP y potencial mitocondrial intacto (Malka et al., 2005).

1.5. Dinámica mitocondrial y metabolismo

La dinámica mitocondrial es un proceso conservado evolutivamente, muy coordinado y altamente regulado a fin de mantener la función del retículo mitocondrial (Soubannier & McBride, 2009). Los primeros trabajos que relacionaron morfología mitocondrial y función metabólica los realizaron Chen y colaboradores (Chen et al., 2005). Ellos sugirieron que la disminución de los niveles de la proteína OPA-1 o cualquiera de las MFNs, mediante siRNA, produce un fenotipo mitocondrial fragmentado, con pérdida del contenido de DNA mitocondrial y con menor actividad metabólica, medida como menor consumo de oxígeno y menor potencial electroquímico mitocondrial (Chen et al., 2005). En estudios con animales genéticamente modificados, la eliminación de proteínas asociadas a la fusión mitocondrial resultó ser fatal por fallas en la placentación o muerte embrionaria precoz (Chen et al., 2003; Davies et al., 2007). Estos resultados ponen en evidencia la importancia de la fusión mitocondrial para la estabilidad celular. Sin embargo, la relación que existe entre las GTPasas de fusión mitocondrial con la maquinaria metabólica mitocondrial no está establecida, ni tampoco las razones de por qué la eliminación de alguna de estas proteínas interfiere en la respiración celular.

Algunas evidencias recientes indican hacia una conexión entre la actividad metabólica celular y la morfología del retículo mitocondrial. La modificación de los niveles de MFN-2 impacta directamente en el metabolismo celular. La pérdida de función de MFN-2 se asocia a disminución en la oxidación de piruvato, glucosa y ácidos grasos, mientras que la ganancia de función produce lo opuesto (Pich et al., 2005). Por otro lado, algunas condiciones metabólicas como hiperglicemia se asocian a fisión de la red mitocondrial y, tanto los niveles de RNA mensajero (mRNA), como la expresión proteica de MFN-2 están disminuidos en ratas Zucker obesas (Bach et al., 2003) y en pacientes obesos y diabéticos (Bach et al., 2005). Estos resultados ponen de manifiesto la relación entre alteraciones en la dinámica mitocondrial, metabolismo y patología.

Con respecto a la fisión mitocondrial, se ha descrito que su inhibición a través de la expresión un dominante negativo de DRP-1 (Drp1K38A) se asocia con pérdida de la capacidad mitocondrial para aumentar la tasa respiratoria (Yu et al., 2006). La actividad de DRP-1 está regulada por diversas cascadas de señalización celular asociadas a los procesos de sobrevivencia y ciclo celular, entre otros. Se ha descrito que la fosforilación de DRP-1 en Ser585 por Cdk1/ciclina B promueve la fisión mitocondrial durante la mitosis, posiblemente para asegurar la distribución equitativa de las mitocondrias entre las células hijas (Taguchi et al., 2007). Además, DRP-1 es fosforilada en Ser656 por PKA, desfosforilada por calcineurina y su estado de fosforilación controlado por los

niveles de Ca^{2+} y el tono simpático. En este caso, la fosforilación de DRP-1 lleva a la inactivación de su función promotora de fisión, aportando un mecanismo para la integración de las señales celulares de Ca^{2+} , los niveles celulares de AMP cíclico (cAMP) y el control de la morfología mitocondrial (Cribbs & Strack, 2007).

1.6. Cambios metabólicos asociados a patología

En el corazón fetal, los sustratos primarios son glucosa y lactato. A medida que el recién nacido madura, la utilización de AGLs incrementa hasta constituir el sustrato metabólico predominante en el adulto. Los mecanismos que regulan este *switch* metabólico están pobremente descritos, pero parece depender de factores nutricionales y hormonales. El cambio en el suministro de nutrientes, junto a modificaciones del ambiente hormonal, como la caída de los niveles de insulina y el incremento en los niveles de glucagón en el momento inmediatamente posterior al parto, contribuyen a la modificación paulatina de los sistemas enzimáticos celulares entre los 3-5 días post nacimiento (Onay-Besikci, 2006). Este cambio metabólico perdura en la vida adulta, transformándose los AGLs en el sustrato preferencial para el cardiomiocito sano (Sack et al., 2000).

En condiciones de sobrecarga de presión o volumen, como ocurre en la IC, el cardiomiocito experimenta un proceso de “remodelado metabólico” cuyo resultado final es la depleción intracelular progresiva de ATP. A medida que la

disfunción metabólica avanza, el flujo en el ciclo de creatina decae, lo que se asocia a un incremento paralelo de las concentraciones intracelulares de ADP, AMP (Ingwall, 2007) y ácidos grasos. En forma compensatoria, tanto la captación de glucosa, así como su utilización, aumentan (Alaoui-Talibi et al., 1997; 1997), probablemente como consecuencia de la activación de patrones genéticos fetales (Taylor et al., 2001). A medida que evoluciona la IC la utilización de AGLs y glucosa decae en las etapas más avanzadas (Taylor et al., 2001). Sin embargo, los mecanismos precisos son desconocidos. En este contexto de alteraciones en el metabolismo celular, el modelo de rata neonata ofrece la ventaja única de permitir evaluar una ventana crítica de cambios metabólicos. Al emular lo observado en el desarrollo normal del recién nacido humano, y en condiciones patológicas como la hipertrofia ventricular y la insuficiencia cardiaca. Este modelo permite estudiar el mecanismo subyacente a las enfermedades vinculadas a trastornos en el metabolismo de sustratos.

1.7. Manipulación del sustrato metabólico en IC

La comprensión de la fisiopatología de la IC crónica ha progresado importantemente durante las últimas décadas, lo que ha llevado al establecimiento de una terapia estándar que incluye inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas del receptor para aldosterona, bloqueadores β -adrenérgicos y, más recientemente, la terapia de resincronización cardiaca (Morrow & Givertz, 2005). La eficacia de la terapia es

variable, dependiendo de la etiología de la enfermedad, pero la mortalidad de la IC se mantiene cercana al 10%. Actualmente se desconoce la razón por la cual la IC progresa, pese a la administración de terapia óptima, aunque se ha sugerido que podría deberse a una pérdida en la eficacia del bloqueo neurohumoral en los estadios más avanzados de la enfermedad (Mann, 1999).

La evidencia disponible sugiere que las alteraciones del metabolismo cardiaco juegan un papel central en el desarrollo y progresión de la IC, por lo que la modulación metabólica se ha plantado como una futura alternativa terapéutica en la IC (Kuzmicic et al., 2011). Desde una perspectiva estequiométrica, la utilización de AGLs como sustrato preferencial requiere un 12% más de O₂ por unidad de ATP que el generado vía glicólisis (Abozguia et al., 2006). Sin embargo, se ha mostrado que el desplazamiento metabólico hacia un estado de máxima utilización de AGLs se asocia a incrementos de hasta un 50% en el consumo de O₂ (Korvald et al., 2000). Aún más, elevadas concentraciones de AGLs se asocian a un deterioro de hasta un 30% en la eficiencia mecánica del corazón (Myrmel et al., 1992; Korvald et al., 2000), sugiriendo que la elevación de los AGLs induce un efecto de “desperdicio” de O₂ que supera ampliamente al predicho estequiométricamente.

La manipulación directa de la preferencia de sustrato metabólico cardiaco es posible mediante inhibidores de la β ox o de la CPT-1. Estas alternativas han mostrado tener mecanismos de acción complejos y no completamente dilucidados, pero todos convergen en una disminución de la

utilización de AGLs en pro de un aumento de la oxidación de glucosa (Essop & Opie, 2004; Morrow & Givertz, 2005). En esta línea, se han descrito algunos efectos secundarios positivos de algunos fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de IC, por ejemplo: el bloqueador β -adrenérgico carvedilol, ampliamente utilizado en el manejo de IC, disminuye los niveles circulantes de AGLs, disminuye su β ox e incrementa el consumo de glucosa miocárdico. Este cambio de sustrato se acompaña de una disminución significativa del consumo de oxígeno cardíaco y de una optimización de la función ventricular (Wallhaus et al., 2001). El efecto de estas intervenciones en IC pueden variar según la etiología o etapa de la enfermedad (Ashrafian et al., 2007). Sin embargo, un número creciente de estudios clínicos sugieren que la inhibición parcial de la β ox constituye una alternativa promisoría. Varios de los fármacos que modifican la utilización de sustrato son actualmente empleados como antianginosos por su capacidad de disminuir el consumo de O_2 , entre los que se encuentra la trimetazidina (TMZ).

1.8. Trimetazidina

Trimetazidina (TMZ) es un agente metabólico con eficacia antianginosa demostrada y aprobado para el tratamiento de la angina en la mayoría de los países de Europa y Asia. La TMZ disminuye la β ox por una inhibición parcial selectiva de la 3-cetoacil de cadena larga CoA-tiolasa mitocondrial (3-CAT) (Allibardi et al., 1998), con una potencia de alrededor del 40% y una

concentración inhibitoria media (IC50) de 75 nM (Kantor et al., 2000). Además, TMZ posiblemente actúa sobre la CPT-1 (Hamdan et al., 2001). Estos efectos estimulan la utilización de glucosa (Kantor et al., 2000) y producción de ATP en diversos modelos de estudio (Guarnieri & Muscari, 1990a; de Leiris & Boucher, 1993) (**Figura 3**). Estudios recientes sugieren que TMZ mejora la función ventricular y calidad de vida en pacientes con IC de etiología isquémica (Fragasso et al., 2003; Di Napoli et al., 2005), aunque los mecanismos subyacentes a este beneficio no son claros (MacInnes et al., 2003) y sus efectos sobre la mortalidad no han sido evaluados.

TMZ no ejerce efectos hemodinámicos, inotrópicos o cronotrópicos (Stanley & Marzilli, 2003). En modelos animales de cardiopatía isquémica (Ikizler et al., 2006), hipertensiva (Tabbi-Anneni et al., 2003) y en escasos modelos de cardiomiopatía no isquémica (D'hahan et al., 1997; 1998), el uso de TMZ se asocia a una menor progresión de la IC. Sin embargo, MacInnes y colaboradores (MacInnes et al., 2003) describieron que TMZ no bloquea la 3-CAT en extractos de corazones de rata ni la 3-CAT recombinante humana, sugiriendo que los efectos beneficiosos descritos pudiesen depender de otros mecanismos. En esta línea, se ha descrito que TMZ aumenta la incorporación de AGLs de cadena larga a la membrana del cardiomiocito, disminuyendo su disponibilidad en el citosol y, por ende, su lipotoxicidad (Sentex et al., 1997). TMZ también se asocia con la preservación de los niveles de fosfocreatina y ATP (Kantor et al., 2000), reducción de la acidosis celular (Brottier et al., 1990;

Lu et al., 1998), de la sobrecarga de calcio (Lu et al., 1998) y disminución del daño secundario por radicales libres (Fantini et al., 1997).

En relación a los efectos de TMZ sobre la función mitocondrial, se ha señalado que es capaz de disminuir la actividad del complejo I de la cadena transportadora de electrones en modelos celulares de hipoxia (Veitch et al., 1995), lo que se asocia a menor consumo de oxígeno y la producción de especies reactivas del oxígeno (Guarnieri & Muscari, 1988). Estos efectos llevan a un incremento de la integridad mitocondrial (Morillas Blasco et al., 2005) al permitir la mantención del potencial de membrana (Monteiro et al., 2004), lo que evita la apertura del poro de transición mitocondrial (Morin et al., 1998) y la subsecuente apoptosis (Argaud et al., 2005).

La evidencia reseñada sugiere un efecto beneficioso en la adición de TMZ a la terapia habitual de IC de etiología isquémica, principalmente, por mecanismos de acción variados, pero poco explorados. Hasta la fecha no existen investigaciones de los efectos de TMZ sobre la morfología mitocondrial en cardiomiocitos, ni si TMZ podría proteger específicamente frente al daño tóxico por palmitato.

1.9. Gluco-lipotoxicidad celular

Diversos estudios apoyan la idea de la existencia de una cardiomiopatía específica para diabetes mellitus tipo 2, caracterizada por daño celular cardiaco

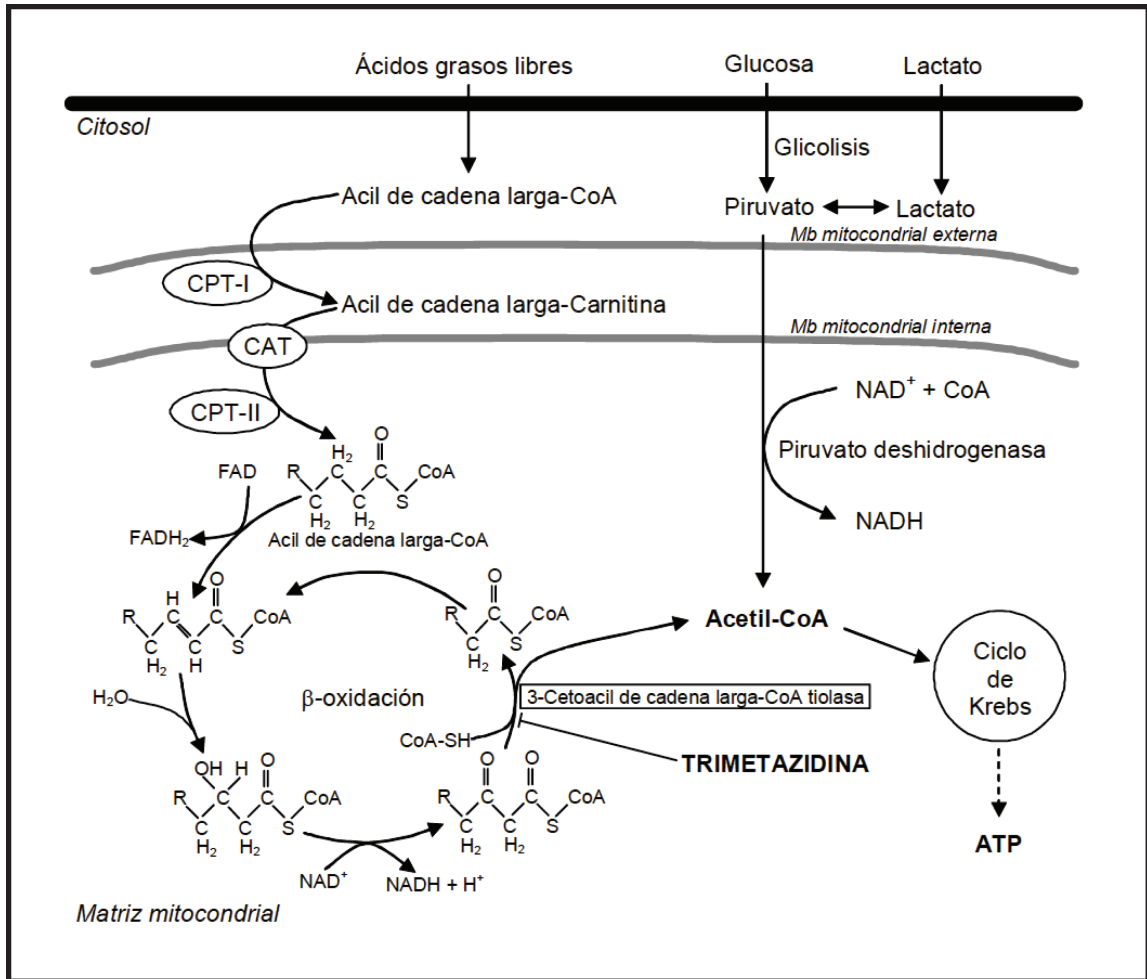


Figura 3. Trimetazidina inhibe la β oxidación de ácidos grasos. Trimetazidina (diclorhidrato de 1-[2,3,4-trimetoxibencil]-piperazina) es un inhibidor específico de la 3-cetoacil de cadena larga Coenzima A tiasa mitocondrial, enzima clave en la βox de ácidos grasos, responsable de la fragmentación del cetoacil-CoA en acil-CoA 2 átomos de carbono más corto y acetil-CoA. CAT, carnitina acil translocasa; CPT-I, carnitina palmitoil transferasa I; CPT-II, carnitina palmitoil transferasa II; CoA, coenzima A.

en ausencia de enfermedad aterosclerótica, hipertensión arterial o daño valvular evidente (Stratmann et al., 2010). La cardiomiopatía diabética conduce a alteraciones estructurales graves, como pérdida de miofibrillas, asociada al desarrollo de cardiomiopatía dilatada (Beltrami et al., 1995), y el desarreglo de sarcómeros, similar a lo que ocurre durante la IC (Mann et al., 1991). Varios mecanismos se han propuesto para explicar estos hallazgos, tales como disfunción endotelial, disfunción autonómica, desbalances metabólicos o fibrosis intersticial (Malhotra & Sanghi, 1997), pero actualmente sigue siendo materia de debate. Por otra parte, debido a que tanto la glucosa como los ácidos grasos se encuentran patológicamente elevados en pacientes diabéticos, se ha sugerido que ambos podrían ser responsables del daño celular observado a través de procesos de “glucotoxicidad” y “lipotoxicidad” (Unger, 1995; Grill & Björklund, 2000).

La gluco- y lipotoxicidad han sido estudiadas a nivel celular y se sabe que afecta el metabolismo y la función de varios tipos celulares (**Figura 4**). En condiciones de altos niveles de ácidos grasos, éstos ingresan a la célula y son convertidos a ésteres acil-CoA de cadena larga por la acil-CoA sintasa de ácidos grasos (FACS). Los acil-CoA pueden ser utilizados para la síntesis de diversos intermediarios lipídicos o transferidos a carnitina para su incorporación a la mitocondria. La conversión de ácidos grasos a lípidos complejos como TAG, diacilglicerol (DAG) y ceramidas ha comenzado a ser estudiada recientemente y se ha visto que la acumulación de algunos de estos

intermediarios se asocia con el desarrollo de resistencia a la insulina, disfunción cardíaca e IC (Summers, 2006), relacionándolos con la lipotoxicidad observada en diabetes.

Los niveles de estos intermediarios potencialmente dañinos pueden estar influenciados tanto por el suministro de ácidos grasos, como por la tasa de producción de acil-CoA. En efecto, en un modelo animal de sobreexpresión genética de FACS (Lee, et al., 2004), el aumento de la síntesis de acil-CoA de cadena larga lleva a la acumulación citoplasmática de lípidos, desorganización de las miofibrillas y cardiomiopatía dilatada severa. También es posible que una disminución de la β ox contribuya al desarrollo de lipotoxicidad por acumulación de acil-CoAs de cadena larga. Sin embargo, esto no ha sido demostrado empíricamente y el papel de la β ox en las patologías cardíacas inducidas por lípidos es controversial (Lopaschuk et al., 2010).

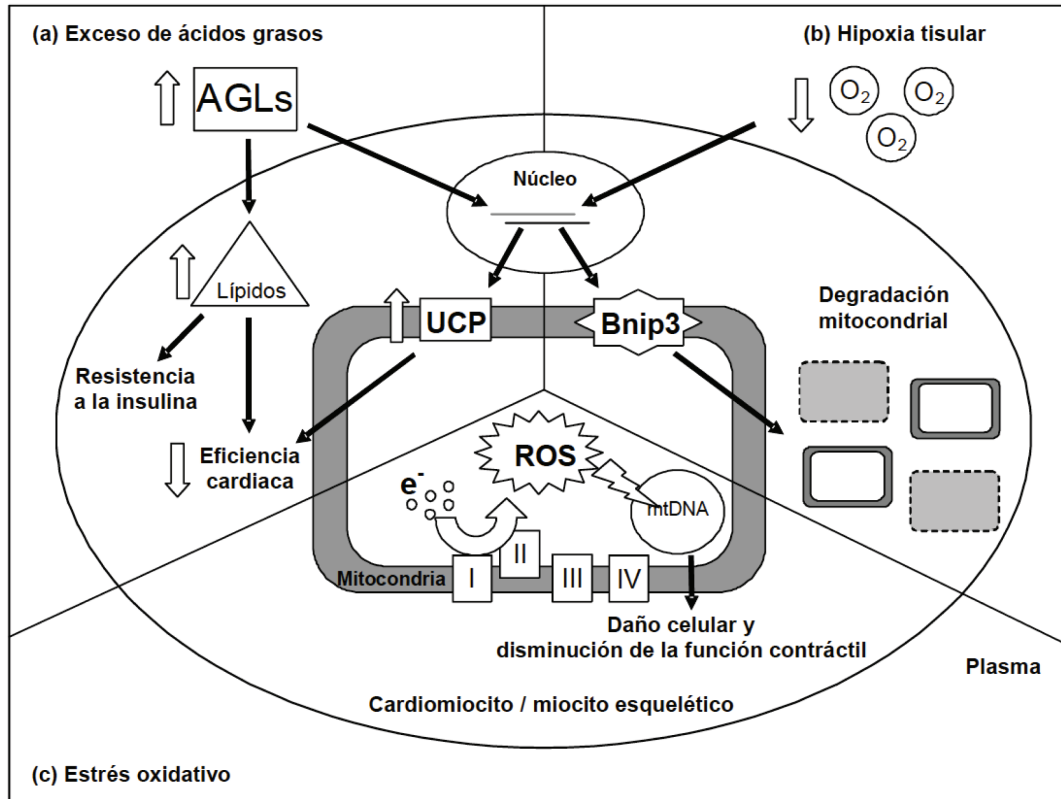


Figura 4. Acciones deletéreas de los AGLs en el cardiomiocito. (A) Los niveles plasmáticos crónicamente elevados de ácidos grasos libres (AGLs) provocados por la activación del sistema simpático aumenta la incorporación y oxidación de AGLs e inducen la expresión y actividad de las proteínas mitocondriales desacopladoras (UCPs) causando una disminución de la eficiencia cardíaca (ATP producido por oxígeno consumido). La acumulación intracelular de lípidos también puede contribuir a la resistencia a insulina. **(B)** La hipoxemia causa hipoxia en los tejidos y regula la expresión de varios genes, incluyendo a Bnip, una proteína proapoptótica de la familia Bcl2 que reside en la mitocondria, causando disfunción y degradación mitocondrial y posteriormente daño y muerte celular. **(C)** La hipoxia tisular genera una depresión en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, pérdida de electrones desde los complejos I y II y la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) tales como anión superóxido. El estrés oxidativo causa daño al DNA mitocondrial (mtDNA), disfunción mitocondrial y posterior generación de EROs, daño celular y disminución de la función contráctil.

1.10. Toxicidad por palmitato en cardiomiocitos

En la dieta y en el plasma existen distintos ácidos grasos con diferente largo de cadena, número y posición de insaturaciones. No todos los ácidos grasos son dañinos, y son los ácidos grasos saturados los que han recibido mayor estudio debido a sus efectos tóxicos descritos en numerosos modelos celulares (Shimabukuro et al., 1998; Hardy et al., 2000; Maedler et al., 2001), incluyendo los cardiomiocitos (Hickson-Bick et al., 2002). Ácidos grasos saturados como palmitato (C16:0) y estearato (C18:0) pueden inducir daño celular (Paumen et al., 1997; Hickson-Bick et al., 2002), mientras que ácidos grasos mono insaturados, como oleato (C18:1), no resultan dañinos a concentraciones similares (Hickson-Bick et al., 2000). Incluso, en algunos estudios se describe la capacidad inhibitoria que tienen los ácidos grasos insaturados sobre los efectos tóxicos inducidos por los ácidos grasos saturados (Tsang et al., 2004; Miller et al., 2005). Por otro lado, palmitato es el ácido graso saturado de cadena larga más corto, de oxidación mitocondrial y, debido a su tamaño, es poco susceptible de ser incorporado a membranas.

Debido a la mayor abundancia de palmitato, tanto en la dieta como el plasma, ha recibido mayor interés y existen diversos reportes en la literatura de los efectos tóxicos de palmitato (Kong, 2003; Tsang et al., 2004; Miller et al., 2005). Particularmente en cardiomiocitos de rata neonata, el tratamiento con palmitato se ha descrito que produce apoptosis, manifestado por la liberación del citocromo c, pérdida del potencial mitocondrial, hinchamiento (*swelling*) de

las mitocondrias, inhibición de la CPT-1, inhibición del complejo III, activación de caspasa-3, procesamiento de polimerasa de poliADP-ribosa (PARP) y fragmentación del DNA (Hickson-Bick et al., 2000; Sparagna et al., 2000).

Tanto palmitato como estearato son sustratos preferenciales para la síntesis *de novo* de ceramidas (Riboni et al., 1997), por lo que se ha sugerido que la exposición a palmitato podría aumentar el contenido celular de ceramidas, siendo esto responsable de los efectos tóxicos observados. De hecho, en líneas celulares se ha descrito que la acumulación de palmitato en citoplasma está relacionada con mayor síntesis de ceramidas y aumento de la apoptosis (Paumen et al., 1997). Además, en cardiomiocitos de rata adulta, la inhibición química de la síntesis de ceramidas disminuye el porcentaje de células con fragmentación del DNA inducida por palmitato (Dyntar et al., 2001). Sin embargo, en cardiomiocitos embrionarios de pollo, el palmitato produce muerte celular por un mecanismo diferente al de ceramida (Kong, 2003). En cardiomiocitos de rata neonata, el palmitato produce acumulación de ceramidas (Sparagna et al., 2001), pero su relación causal con el daño celular no ha sido evaluada. Por otra parte, en un estudio con animales alimentados con dietas diversamente enriquecidas en ácidos grasos se estableció que en los animales alimentados con ácidos grasos saturados el índice apoptótico en corazón estaba aumentado, al igual que el contenido intracelular de ceramidas (Okere et al., 2006). Considerando estos antecedentes, la producción de ceramidas podrían participar en la lipotoxicidad observada con palmitato. Sin

embargo, en ausencia de síntesis *de novo* de ceramida, las vías de señalización activadas por palmitato parecen ser suficientes para producir daño celular y lipotoxicidad, por lo que se cree que las ceramidas juegan un rol de sensibilización frente al estímulo nocivo (Listenberger et al., 2001).

El daño celular y muerte de cardiomiocitos están implicados en varias condiciones patológicas que se relacionan con aumento de los niveles cardiacos de ácidos grasos. En el caso de isquemia y reperfusión, el daño celular además se ha relacionado con aumentos en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Misra et al., 2009). Por lo tanto, es posible que la lipotoxicidad observada con palmitato, y otros ácidos grasos saturados, se asocie con aumento de los niveles de EROs. Está ampliamente descrito que aumentos en la concentración de EROs llevan a muerte celular por apoptosis (Matés et al., 2008) y que el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o anión superóxido (O_2^-) inducen muerte en cardiomiocitos neonatos (Harsdorf et al., 1999). Desde un punto de vista mecanístico, estas evidencias ponen en un eje central a la mitocondria, ya que este organelo controla la producción de ATP por β ox, la muerte celular por apoptosis y es el principal centro de producción de EROs en células no fagocíticas. Sin embargo, el aumento en la producción de EROs y su participación en la lipotoxicidad inducida por palmitato en cardiomiocitos parece no ser determinante (Hickson-Bick et al., 2002; Tominaga et al., 2008).

1.11. Palmitato y morfología mitocondrial

En la literatura existe poca evidencia acerca de los efectos de elevadas concentraciones de AGLs sobre la dinámica mitocondrial. Recientemente, el grupo de Zhang y colaboradores encontró, de forma novedosa, que palmitato induce fragmentación mitocondrial en células de hepatoma humano HepG2 (Zhang et al., 2010). En este modelo, la fragmentación mitocondrial ocurre asociada a la muerte celular, fenómeno previamente descrito. En un modelo diferente, el grupo de Molina y colaboradores mostró que una mezcla compleja de lípidos, que incluye palmitato y altas concentraciones de glucosa, produce fragmentación de la red mitocondrial y apoptosis en células β -pancreáticas (Molina et al., 2009). Además, en células INS-1, el mismo grupo mostró que esta mezcla de lípidos produce fragmentación mitocondrial, apoptosis, disminución de la fosforilación de Akt y menor secreción de insulina estimulada por glucosa. De manera interesante, la inhibición de la fisión mitocondrial mediante el silenciamiento de FIS-1 revirtió los efectos de palmitato sobre apoptosis. Recientemente, se describió que altas concentraciones de palmitato inducen fragmentación y disfunción mitocondrial en una línea celular de músculo esquelético (Jheng et al., 2011). Interesantemente, la inhibición farmacológica y genética de DRP-1 revirtieron este efecto (Jheng et al., 2011). Hasta la fecha, no existen estudios similares en la literatura respecto de la relación entre palmitato, dinámica mitocondrial y función mitocondrial de manera integrada en cardiomiocitos. Las evidencias aquí expuestas sugieren

que palmitato podría causar fisión y disfunción mitocondrial en nuestro modelo, lo que podría ser parcialmente revertido por la acción cardio y citoprotectora de TMZ.

2. HIPÓTESIS

TMZ protege frente a la lipotoxicidad por palmitato mediante un cambio metabólico en el cardiomiocito

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel protector de TMZ frente a la fisión y disfunción mitocondrial inducida por palmitato en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los efectos de palmitato sobre morfología, función mitocondrial y viabilidad en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.
- Estudiar los efectos de TMZ sobre morfología, función mitocondrial y el cambio metabólico en cultivos primarios de cardiomiocitos.
- Evaluar el papel protector de TMZ frente a la lipotoxicidad inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio Hank's, medio DME, medio 199, pancreatina, gelatina, tritón X-100, 5-bromo-2'-deoxiuridina, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), 1-(2,3,4-trimetoxibencil)piperazina (trimetazidina), albúmina de suero bovino (BSA) esencialmente libre de ácidos grasos (A6003), anticuerpo anti β -actina (A5441) y anti β -tubulina (T4026). El palmitato de sodio (S-1109) se obtuvo de Nu-Chek Prep Inc. (Elysian, MN, EEUU). De BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, EEUU) se adquirió el anticuerpo anti DRP-1 (611112). El anticuerpo anti FIS-1 (ALX-210-907) se obtuvo de Alexis Biochemicals (San Diego, CA, EEUU), el anticuerpo anti mtHsp70 (MA3-028) en ABR-Affinity Bioreagents (Gloster, CO, EEUU) y el anticuerpo anti ceramidas (esfingosina, MID 15B4) de Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EEUU). Los anticuerpos anti OPA-1 (ab42364) y anti MFN2 (ab50838), se compraron en Abcam (Cambridge, MA, EEUU). De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron: colagenasa tipo II, suero fetal bovino (FBS) y suero fetal de ternera (FCS). Mitotracker Green-FM (M7514), tetrametilrodamina metil éster perclorato (TMRE, T-668) y los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexas anti ratón y conejo (A-11036, A-11034, A-11031 y A-11029) se compraron en Molecular Probes-Invitrogen (Eugene, OR, EEUU). Los

anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot EZ-ECL se adquirió en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a no ser que se especifique lo contrario. El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU).

5.2. Modelo de cultivo celular

En la realización de esta tesis se utilizó un modelo celular de cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de rata. Éstos se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Todos los animales se trataron siguiendo las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de experimentación: Guide for the Use of Laboratory Animals (NIH, 2011), siendo los protocolos experimentales además aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Chile.

5.3. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, primero se extirparon y lavaron los corazones a 37°C en medio Hank's estéril, luego se removieron

las aurículas y finalmente, los corazones se homogenizaron mecánicamente con una navaja quirúrgica con el fin de favorecer la digestión enzimática y permitir una obtención eficiente de células aisladas. Los ciclos de digestión se realizaron en presencia de colagenasa de tipo II (0,02 g/100 mL Hank's) y pancreatina (0,06 g/100 mL Hank's). Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial a superficies plásticas que presentan los dos tipos celulares presentes en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos). El producto de la digestión se preplaqueó en placas de Petri de 100 mm durante 2 h en medio DME:M199 (4:1) 10% FBS. Al cabo de ese tiempo, los cardiomiocitos (sobrenadante) se recolectaron, centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min y resuspendieron en 25 mL de medio DME:M199 (4:1) 10% FBS y 5% NBCS. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán, el que permite visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer. Conocida su concentración, las células se sembraron en DME:M199 (4:1) 10% FBS y 5% NBCS a distintas densidades, según las necesidades experimentales, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina, sobre placas de cultivo cubiertas previamente con una monocapa de gelatina (2% p/v). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y 95% de aire por un máximo de 5 días (Foncea et al., 1997).

5.4. Preparación de lípidos

El palmitato conjugado a BSA (razón 3,3:1) se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por (De Vries et al., 1997) con algunas modificaciones. Brevemente, el ácido palmítico se disolvió en etanol absoluto a una concentración de 18,75 mM y se le agregó un volumen equivalente de Na_2CO_3 10 mM a temperatura ambiente. Luego, el etanol se evaporó de la mezcla al calentarla a 50-60 °C bajo flujo continuo de nitrógeno gaseoso para evitar la oxidación del palmitato. A continuación, se agregó, por goteo, 10 mL de una solución de BSA libre de ácidos grasos al 10% en PBS a 40°C, de manera de acomplejar el palmitato con la albúmina. El complejo BSA-palmitato se dializó cuatro veces a 4 °C durante 4-6 h contra 250 mL de $[\text{NH}_4]\text{HCO}_3$ 0,1 M y posteriormente liofilizado. El liofilizado se almacenó a -20 °C y se utilizó para enriquecer el medio de cultivo con las concentraciones de palmitato requeridas. Los medios enriquecidos se filtraron con poro de 0,2 μm previo a la suplementación con FBS al 5% para asegurar la esterilidad.

5.5. Cálculo de la concentración de palmitato libre

De acuerdo a lo mencionado anteriormente en la sección 5.4., el palmitato se preparó en una razón 3,3:1 moléculas de lípido por moléculas de BSA (De Vries et al., 1997). De esta forma se trabajó con concentraciones equivalentes de palmitato de 100 y 500 μM . Sin embargo, la concentración de palmitato libre en solución es órdenes de magnitud menores que las elegidas.

Para tener una estimación de la concentración de palmitato libre a la que las células fueron expuestas en este modelo, se utilizó la curva de unión de palmitato a BSA publicada por (Richieri et al., 1993). El valor de palmitato libre se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[AGL] (\nu) = m\nu + b + ce^{k\nu}$$

En donde ν corresponde a la razón de unión palmitato:BSA y m , b , c y k corresponden a constantes empíricas para la interacción palmitato-BSA (Richieri et al., 1993). De acuerdo a esta ecuación, el valor de concentración de palmitato libre para la mezcla de 500 μM corresponde a 25 nM y para la mezcla de 100 μM corresponde a 2 nM en nuestras condiciones experimentales. Estos valores corresponden a una estimación ya que el proceso de filtrado, necesario para asegurar la esterilidad del medio de cultivo, retiene parte del BSA. Además el suero contiene una concentración indeterminada de lípidos que varía en cada lote. Sin embargo, debido a la baja concentración de suero utilizada (5%), se asumió que su contribución a la concentración total de palmitato es despreciable. De aquí en adelante se hará referencia exclusivamente a las concentraciones libres de palmitato en las distintas condiciones experimentales.

5.6. Diseño experimental

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron dos estímulos principalmente. En primera instancia se evaluaron los efectos de la estimulación con palmitato

(conjugado a BSA, 2 y 25 nM libre, 0-24 h) y TMZ (0,1-100 μ M, 0-24 h) de forma separada y, posteriormente, se evaluó el efecto de la preincubación con TMZ (1 μ M, 24 h) sobre los cambios inducidos por palmitato (25 nM libre, 3 h). Con este objetivo, las células se mantuvieron intactas, al menos, durante 24 h tras el sembrado con el fin de asegurar la adhesión de los cardiomiocitos. Luego de este periodo, las placas de cultivo se lavaron para eliminar los restos de la digestión incompleta y/o los cardiomiocitos no adheridos previo a la realización de cualquier experimento. Las células se mantuvieron en DME:M199 (4:1) 5% FBS durante el período experimental, ya que la ausencia de suero genera fisión mitocondrial (Parra et al., 2007). TMZ se disolvió en agua nanopura estéril y agregada al medio de cultivo en volúmenes menores al 1% del volumen final. Para estimular las células con palmitato, el medio de cultivo se reemplazó por un medio equivalente (DME:M199 [4:1] 5% FBS) suplementado con la concentración del complejo palmitato:BSA adecuada. TMZ se reestableció en este medio en los casos necesarios y el resto de los pocillos que no recibieron palmitato se trataron de manera idéntica (cambio de medio y restitución de TMZ). Las células se cultivaron en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina en todo momento para minimizar la proliferación de los fibroblastos residuales del cultivo.

5.7. Preparación de extractos celulares totales de proteínas

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron para analizar los niveles de expresión de las siguientes proteínas (mediante Western blot) en las distintas condiciones de tratamiento:

- Proteínas de la fisión mitocondrial, DRP-1 y FIS-1.
- Proteínas de la fusión mitocondrial, MFN-2 y OPA-1.
- Proteínas constitutivas de la mitocondria, como HSP70, para evaluar posibles cambios en la masa mitocondrial inducida por los tratamientos.

Para la obtención de los extractos, las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/placa. Una vez tratadas, las células se lavaron tres veces con solución PBS fría (4 °C), luego se lisaron con 80 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; tritón X-100 1% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na_3VO_4 1 mM). El homogenizado se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU) y las proteínas se denaturaron por ebullición en tampón SDS-PAGE 4x (Tris Base 40 mM pH 8,0; EDTA 4 mM; SDS 4% p/v; glicerol 30% v/v; 2-mercaptoetanol 20% v/v; azul de bromofenol), para ser almacenado posteriormente a -20 °C.

5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos se cargó alrededor de 30 µg de proteínas, ajustando el volumen según las diferencias de concentración de los distintos extractos. Para resolver proteínas de masa molecular intermedia (50-90 kDa) se utilizaron geles resolutivos de poliacrilamida al 10% y geles concentradores al 5%. Para los casos en que proteínas de masas moleculares muy diferentes fuesen evaluadas en las mismas muestras, como DRP-1 (~90 kDa) y FIS-1 (~15 kDa) por ejemplo, se utilizaron geles resolutivos en gradiente continuo del 5 al 20% y geles concentradores al 3%. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 120 V en tampón de electroforesis.

5.9. Electrotransferencia de proteínas

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se electrotransferieron desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, EEUU) de 0,45 µm a 450 mA durante 90 min en tampón de transferencia con metanol (20% v/v).

5.10. Western blot

Una vez concluida la transferencia, las membranas se tiñeron temporalmente con rojo Ponceau (rojo Ponceau 2%, TCA 30%, ácido

sulfosalicílico 30%) para asegurar que la transferencia haya sido exitosa y que las proteínas no se encuentren degradadas antes de continuar con el procedimiento. Luego, la tinción se eliminó, lavando la membrana con solución TBS con Tween-20 (0,1 % v/v) (TBST). Las membranas se bloquearon, al menos, por 1 h a temperatura ambiente en TBST con leche descremada (5% p/v) o BSA (1% p/v), según los requerimientos de los anticuerpos primarios. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti β -actina y β -tubulina (1:5.000 en leche) o DRP-1, FIS-1, HSP70, MFN-2 y OPA-1 (1:1.000 en leche) durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Al día siguiente, las membranas se lavaron durante 45 min en TBST y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios, conjugados a peroxidasa, anti-IgG de ratón o conejo (1:5.000 en solución de bloqueo). Luego las membranas se lavaron nuevamente por 45 min con TBST e incubadas durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL. Inicialmente, las bandas se detectaron mediante exposición a películas fotográficas Kodak-Biomax y digitalizadas. Sin embargo, durante el transcurso de la tesis, el método de exposición se reemplazó por un equipo de digitalización directa de la quimioluminiscencia (Syngene). Las imágenes digitalizadas se analizaron mediante densitometría con el software ImageJ (v1.45s, para MacOS, NIH, EEUU). Luego de realizar los ensayos de Western blot, las membranas se incubaron por 1 h en solución de rojo Ponceau para desprender los anticuerpos (*stripping* suave). Posteriormente, para

corregir las posibles diferencias de carga en los geles, se analizaron los niveles de las proteínas constitutivas β -actina o β -tubulina siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

5.11. Inmunofluorescencia indirecta

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se utilizó para evaluar la distribución subcelular de las proteínas de la fisión mitocondrial, DRP-1 y FIS-1 antes y después de la estimulación con palmitato. Para este fin, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2%). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% (filtrado) en PBS durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos anti-DRP-1 (dilución 1:250) y anti-FIS-1 (dilución 1:250) en PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Al día siguiente las células se lavaron con PBS y luego se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz con el anticuerpo secundario Alexa 488 y 543, anti mouse o anti conejo, según corresponda (dilución 1:500). Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje, el cual además retarda el decaimiento de la fluorescencia. Una vez montadas, las inmunofluorescencias se observaron en

un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss Microsystems, Oberkochen, Alemania). El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (v1.45s, para MacOS, NIH, EEUU), tal como se describirá más adelante (Sección 5.20).

5.12. Determinación del potencial de membrana mitocondrial y masa mitocondrial mediante citometría de flujo

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos con una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo. Para detectar el potencial de membrana mitocondrial (Ψ_{mt}) se utilizó la sonda TMRE ($\lambda_{excitación}$: 543 nm, $\lambda_{emisión}$: sobre los 560 nm), mientras que para medir la masa mitocondrial se usó la sonda Mitotracker Green-FM ($\lambda_{excitación}$: 488 nm, $\lambda_{emisión}$: 515-530 nm). Ambas sondas se cargaron 30 min antes de la realización de las mediciones, a una concentración final en el medio de cultivo de 200 y 400 nM, respectivamente. Una vez finalizados los estímulos y la carga de la sonda, se removió el medio de cultivo y las células se suspendieron utilizando 300 μ L de una solución de tripsina-EDTA 1x en PBS durante 5 min a 37 °C. Una vez finalizados los 5 min de tripsinización, la reacción se detuvo utilizando FBS en una proporción 1:10. Posteriormente, las células ya cargadas se traspasaron a tubos BD para citometría y su fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSSCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU). La sonda TMRE se utilizó en modo *nonquenching*, por lo que una disminución en la

intensidad de la fluorescencia es proporcional a la caída del Ψ_{mt} . En el caso de la sonda Mitotracker Green-FM, la fluorescencia es proporcional a la cantidad de mitocondrias e independiente del Ψ_{mt} . Para ambos experimentos se utilizó el desacoplante CCCP (50 μ M) durante 30 min como control. Finalmente, los resultados se expresaron como los promedios de mediciones del promedio de la intensidad de la población de células vivas normalizadas con respecto a las células control (Parra et al., 2007).

5.13. Determinación de viabilidad celular y población SubG1 mediante citometría de flujo

Para estos experimentos las células se sembraron sobre placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo. Se utilizó la sonda ioduro de propidio (PI) ($\lambda_{excitación}$: 535 nm, $\lambda_{emisión}$: 617 nm) en dos configuraciones: en células intactas, para evaluar viabilidad celular por exclusión de la sonda en la población viable, y en células permeabilizadas, para evaluar el perfil de distribución del DNA y determinar el porcentaje de la población con el genoma fragmentado (población SubG1). Estas técnicas representan medidas gruesas de muerte celular por necrosis o apoptosis, respectivamente (Parra et al., 2013a).

Para determinar viabilidad celular, una vez finalizados los estímulos, se traspasó el medio de cultivo a un tubo BD para citometría y las células se suspendieron utilizando 300 μ L de una solución de tripsina-EDTA 1x en PBS

durante 5 min a 37 °C. Una vez finalizada la tripsinización, la reacción se detuvo utilizando FBS en una proporción 1:10. Posteriormente, las células se traspasaron a los tubos para citometría que contenían el medio de cultivo respectivo y se agregó PI (1 µg/ml) y su fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSSCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU). La población PI-negativa (células intactas) se definió como el primer *peak* de fluorescencia (P2) y la población PI-positiva consideró al segundo *peak* de menor intensidad (P3). Estos umbrales se fijaron utilizando como referencia las células controles y las tratadas con el control positivo (H₂O₂) y el mismo umbral se utilizó para todos los tratamientos por experimento. La viabilidad celular se expresó como porcentaje de células PI-positivas respecto del total.

Para determinar la población de células apoptóticas, los cardiomiocitos se lavaron con PBS y suspendieron con tripsina tras los estímulos. Las células en suspensión se centrifugaron a 1.500 rpm por 5 min a temperatura ambiente y el PBS se removió. Luego las células se permeabilizaron con metanol (-20 °C) hasta el día siguiente. Luego de este período, el metanol se removió por centrifugación y las células se resuspendieron en 300 µl de PBS suplementado con RNasa (0,1 mg/ml) por 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, a las células se les agregó PI (1 µg/ml) y su fluorescencia se analizó en el citómetro de flujo FACSSCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU). Esta técnica es una adaptación de la utilizada para la cuantificación de las poblaciones G1, S y G2 del ciclo celular, y se basa en que las células apoptóticas condensan su

cromatina, lo que dificulta el acceso del colorante al DNA, por lo que aparece una población celular con menor fluorescencia al lado de la prominente señal de G1.

5.14. Determinación de niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno mediante citometría de flujo

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos con una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo. Para detectar la producción intracelular general de EROs se utilizó la sonda permeable 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA) ($\lambda_{\text{excitación}}$: 429-495 nm, $\lambda_{\text{emisión}}$: 517-527 nm). La sonda se cargó 30 min antes de la realización de las mediciones a 37 °C protegida de la luz. Una vez finalizados los estímulos y la carga de la sonda, se removió el medio de cultivo y las células se suspendieron utilizando 300 uL de una solución de tripsina-EDTA 1x en PBS durante 5 min a 37 °C. Posteriormente, la reacción se detuvo utilizando FBS en una proporción 1:10 y las células se traspasaron a tubos BD para citometría. La fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSSCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU). En todos los experimentos se utilizó H₂O₂ (90 µM) como control positivo de EROs.

5.15. Determinación de los niveles intracelulares de ATP mediante luminometría

Para la medición de los niveles intracelular de ATP se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células/pocillo. Una vez finalizados los tratamientos, se lavaron las placas y se reemplazó el medio por 20 μ L de solución Krebs con Ca^{2+} (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES-Na, 5.6 mM glucosa, pH 7.4). A continuación, se adicionó el tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) en una relación 1:1. La placa se agitó durante 2 min con el fin de completar la reacción. Posteriormente, el lisado se traspasó a una placa opaca de 96 pocillos y se analizó en un luminómetro TopCountNXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EEUU), siendo la luminiscencia estable por un período de hasta 4 h de acuerdo al fabricante. Finalmente, los resultados se expresaron como los promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento o control.

5.16. Medición de la velocidad de consumo celular de oxígeno mediante oxigrafía de Clark

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 60 mm con una densidad celular de 3×10^6 células/placa. Una vez finalizados los estímulos, se lavaron las células tres veces con solución PBS. Posteriormente, las células se suspendieron utilizando 1 mL de solución tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS,

durante 5 min a 37 °C, esta reacción luego se detuvo con FBS en una proporción 1:10. Una vez finalizada la tripsinización, las células se traspasaron a un tubo Eppendorf y se centrifugaron por 5 min a 1600 rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 200 µL de PBS, los cuales se traspasaron a una cámara hermética, termorregulada (25 °C) y conectada a un electrodo. El volumen final fue de 400 µL y el registro se realizó en solución PBS. La velocidad del consumo de oxígeno se registró mediante un electrodo de Clark 5331 (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EEUU), acoplado a un sistema de registro digital con el programa WinDaq Data Acquisition Software (Akron, OH, EEUU). Los datos se guardaron en formato .csv y se analizaron utilizando el programa Origin Pro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU). Una vez que se extrajeron las pendientes de las curvas obtenidas para cada condición, los resultados se expresaron como promedios de las mediciones normalizadas con respecto a las células control (Araya-Maturana et al., 2002; 2006).

Adicionalmente, y como un control interno de todos los experimentos realizados, antes de que las células consumieran el 100% del oxígeno presente en la cámara, se evaluó la velocidad de respiración desacoplada, la cual da cuenta de la capacidad total de la cadena transportadora de electrones. Para ello, una vez que las células habían consumido aproximadamente el 75% del oxígeno de la cámara, se les agregó CCCP a una concentración final de 200 nM (Brand & Nicholls, 2011).

5.17. Detección de esfingolípidos intracelulares por cromatografía en fase líquida y espectroscopía de masa

Para estos experimentos los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/placa. Una vez finalizados los estímulos con palmitato, las células se lavaron 3 veces con PBS a temperatura ambiente, se suspendieron con 1 mL de solución de tripsina-EDTA 1x en PBS durante 5 min a 37 °C y luego la digestión se detuvo con FBS en una proporción 1:10. Posteriormente, las células en suspensión se traspasaron a un tubo Eppendorf y se centrifugaron por 5 min a 1.600 rpm en cámara fría, se aspiró el sobrenadante y se volvieron a lavar 2 veces con 1 mL de PBS frío (4 °C) para eliminar la tripsina y el suero. El *pellet* del segundo lavado se resuspendió en 100 uL de PBS, se tomaron 15 uL para determinar la cantidad de proteína por muestra (método de BCA), y el resto se centrifugó nuevamente. Se aspiró completamente el sobrenadante de la última centrifugación y *pellet* seco se congeló por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

El contenido celular de esfingolípidos se determinó mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento (del inglés: *ultra high performance liquid chromatography*) acoplada a espectroscopía de masa (UPLC/MS/MS). Para esto, los *pellets* se descongelaron y homogenizaron en un tampón de lisis (250 mM sacarosa; 25 mM KCl; 0,5 mM EDTA; 50 mM Tris, pH 7,4). Los lisados se suplementaron con una solución de estándar interno, compuesta de

17C-esfingosina, 17C-esfingosina-1-fosfato y 17C16-ceramida (Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, EEUU), y una mezcla de extracción compuesta de isopropanol:agua:acetato de etilo (30:10:60 v/v). La mezcla se agitó, sonicó y centrifugó por 10 min a 4.000 rpm. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y los *pellets* fueron re-extraídos y centrifugados nuevamente. Posteriormente, los sobrenadantes se combinaron y evaporaron bajo flujo de nitrógeno. Las muestras secas se reconstituyeron en 100 µl de LC Solvent A (1 mM formato de amonio; 0,15% ácido fórmico, en metanol) para el análisis por UPLC/MS/MS en un sistema Water Acquity UPCL (Milfor, MA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masa Thermo TSQ Quantum Ultra (Waltham, MA, EEUU) (Blachnio-Zabielska et al., 2012a; 2012b).

5.18. Determinación de la morfología mitocondrial

Para el análisis de morfología mitocondrial en cardiomiocitos se utilizó la sonda Mitotracker Green FM (400 nm) y un microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5 equipado con una cámara enfriada CCD y un software de adquisición de imágenes LSM. Para este fin, los cardiomiocitos se trataron con los diferentes estímulos, luego se lavaron tres veces con solución Krebs y se incubaron por 30 min a 37 °C con la sonda preparada en la misma solución, a partir de un stock al 20% en DMSO. Al finalizar este tiempo, los cardiomiocitos nuevamente se lavaron con solución Krebs y se utilizaron dentro de la siguiente hora. Los cubreobjetos conteniendo los cardiomiocitos cargados con

Mitotracker Green se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 μ L de solución Krebs y se visualizaron en el microscopio, tras su excitación con un láser de argón a 488 nm. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron como secuencias de profundidad de 10 imágenes en el eje Z cada 0,5 μ m, con el fin de recorrer la célula completa en el eje vertical. Se utilizó un lente objetivo de 60x con una apertura numérica de 1,2. En la mayoría de las secuencias las dimensiones de las imágenes fueron de 1024 x 1024 píxeles (Parra et al., 2007).

5.19. Determinación de depósitos intracelulares de lípidos neutros

Para analizar el contenido de lípidos neutros al interior de las células se utilizó la sonda específica HCS LipidTOX. Para esto, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/pocillo sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2%). Luego de los estímulos, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS suplementado con Hoechst (16,2 μ M) por 20 min y se mantuvieron en PBS refrigeradas hasta el momento de su utilización protegidas de la luz. Previo a la visualización en el microscopio, las células se incubaron y mantuvieron en una solución de trabajo de LipidTOX (1:1000) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se cargaron con la sonda por 30 min y se mantuvieron en esta solución durante la visualización. Se utilizó un microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5

equipado con una cámara enfriada CCD y el software de adquisición de imágenes LSM. El número total de gotas de lípido y el área total de lípidos se cuantificaron utilizando la herramienta de análisis de partículas incluida en ImageJ. Debido a la alta razón señal/ruido de la sonda y al bajo número de gotas de lípido por célula, no fue necesario deconvolucionar las imágenes para su análisis.

5.20. Inmunodetección de esfingolípidos *in situ*

La detección de esfingolípidos *in situ* se utilizó para evaluar la producción de intermediarios de la ruta de síntesis de ceramidas en células tratadas con palmitato y/o TMZ. Para este fin, se sembraron los cardiomiocitos en placas de 12 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2%). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío y se prepararon para inmunofluorescencia tal como se describió en el punto 5.11. de esta sección. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo contra esfingosina (1:100, mouse) a temperatura ambiente durante la noche en presencia de Hoechst (16,2 μ M). Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 543 (1:300) durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos utilizando DAKO como medio de montaje. Las inmunofluorescencias se observaron en un microscopio confocal

Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss Microsystems, Oberkochen, Alemania). El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (v1.45s, para MacOS, NIH, EEUU). Para este fin se delimitó el perímetro celular y se determinó la intensidad total de fluorescencia por célula, la cual se normalizó por el área celular para evitar desviaciones en la intensidad causadas por diferencias de tamaño. Los datos se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia dividida por área.

5.21. Análisis digital de imágenes

Para las secuencias de imágenes obtenidas con la sonda Mitotracker Green-FM, la eliminación de la fluorescencia fuera de foco se realizó usando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (*Point Spread Function*) correspondiente a las condiciones experimentales. Una vez deconvolucionadas las imágenes, se contó el número de partículas, definidas como todo objeto mayor de 10 voxels (píxel en 3 dimensiones), así como su volumen, todo lo cual se realizó utilizando el programa accesorio 3D Object Counter para ImageJ (Parra et al., 2007). Se determinaron el número total de objetos (mitocondrias) por célula y el volumen promedio de las partículas, equivalente al volumen total determinado dividido por el número total de partículas. Aumentos en el número de partículas, acompañados de una disminución en el volumen promedio se consideraron evidencia de fisión mitocondrial y viceversa (Parra et al., 2007).

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

5.22. Análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante análisis de varianzas (ANOVA) y se utilizaron las pruebas *a posteriori* de Tuckey o Dunnett para buscar diferencias entre todos los niveles de tratamiento o en referencia a los controles, respectivamente. La significancia estadística se consideró con un alfa de 0,05.

6. RESULTADOS

A fin de responder el primer objetivo planteado en esta tesis: “evaluar los efectos de palmitato sobre morfología, función mitocondrial y viabilidad en cardiomiocitos” se procedió a caracterizar la maquinaria de morfología mitocondrial, el metabolismo mitocondrial y la viabilidad de cardiomiocitos tratados con palmitato. Para este fin, se utilizaron dos concentraciones de palmitato, una baja e inocua y otra alta y tóxica (equivalentes a 2 y 25 nM libre), previamente descritas en modelos de cardiomiocitos (Dyntar et al., 2001; Hickson-Bick et al., 2002). Con estas concentraciones se probaron diferentes tiempos a modo de caracterizar la respuesta de los cardiomiocitos en nuestras manos.

6.1. Efectos de palmitato sobre la morfología mitocondrial

Diversos reportes en la literatura han mostrado los efectos tóxicos de palmitato. Particularmente, se ha descrito que palmitato induce apoptosis en cardiomiocitos en cultivo, caracterizado por la liberación de citocromo c, pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_{mt}), activación de caspasa-3 y fragmentación del DNA.

En la primera parte del primer objetivo se estudiaron los efectos de palmitato sobre la morfología mitocondrial mediante la evaluación del número de células con mitocondrias fragmentadas, el número de partículas mitocondriales y el volumen mitocondrial promedio por célula. Para este

objetivo, los cardiomiocitos se trataron con palmitato (2 y 25 nM libre) por 0 – 24 h y se observó la red mitocondrial utilizando la sonda Mitotracker Green-FM (400 nM) y un microscopio confocal Carl Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert 200. En la **Figura 5A** se observa que la concentración menor de palmitato (2 mM) indujo fragmentación mitocondrial aparente a las 6 h, reflejado en un aumento significativo del porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas a las 3 y 6 h (**Figura 5B**). Sin embargo, esta técnica resulta demasiado dependiente del criterio del observador, lo que podría generar falsos positivos. Por lo tanto, para contar con un criterio más objetivo, se cuantificó el número de mitocondrias por célula y el volumen promedio de forma automática utilizando el plugin Object Counter 3D para ImageJ. Aumentos en el número de mitocondrias acompañados de una disminución en el volumen promedio se consideraron como criterios de fisión mitocondrial. En las **Figuras 5C-D** se observa que palmitato 2 nM no modificó significativamente el número de mitocondrias por célula y que el volumen mitocondrial promedio solamente disminuyó de forma significativa a las 3 h. De manera más consistente, el tratamiento con la concentración mayor de palmitato (25 nM) generó fragmentación mitocondrial evidente desde las 3 h (**Figura 6A**), ya que aumentó significativamente el porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas (**Figura 6B**) y el número de mitocondrias por célula (**Figura 6C**), mientras que el volumen mitocondrial promedio disminuyó significativa (**Figura 6D**). Estos cambios fueron evidentes desde las 3 h y se mantuvieron hasta las 24 h.

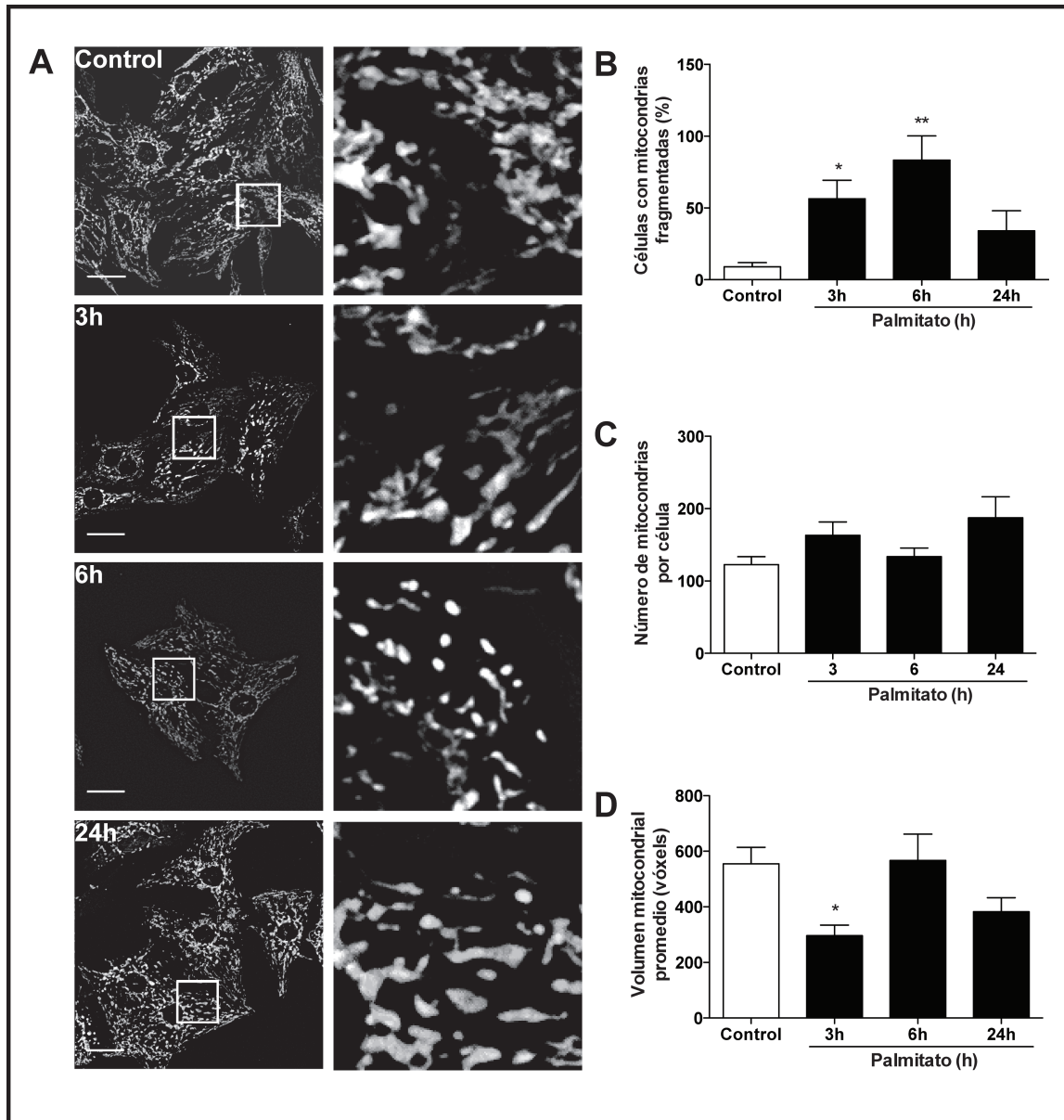


Figura 5. Efectos de palmitato 2 nM sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocitos en cultivo. Se muestran reconstrucciones 3D de imágenes deconvolucionadas de cardiomiocitos incubados con palmitato 2 nM (A) por los tiempos indicados. Escala: 20 μ m. Se determinaron el número de células con patrón mitocondrial fragmentado (B), el número de mitocondrias por células (C) y el volumen mitocondrial promedio (D). * $p < 0,05$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 6$.

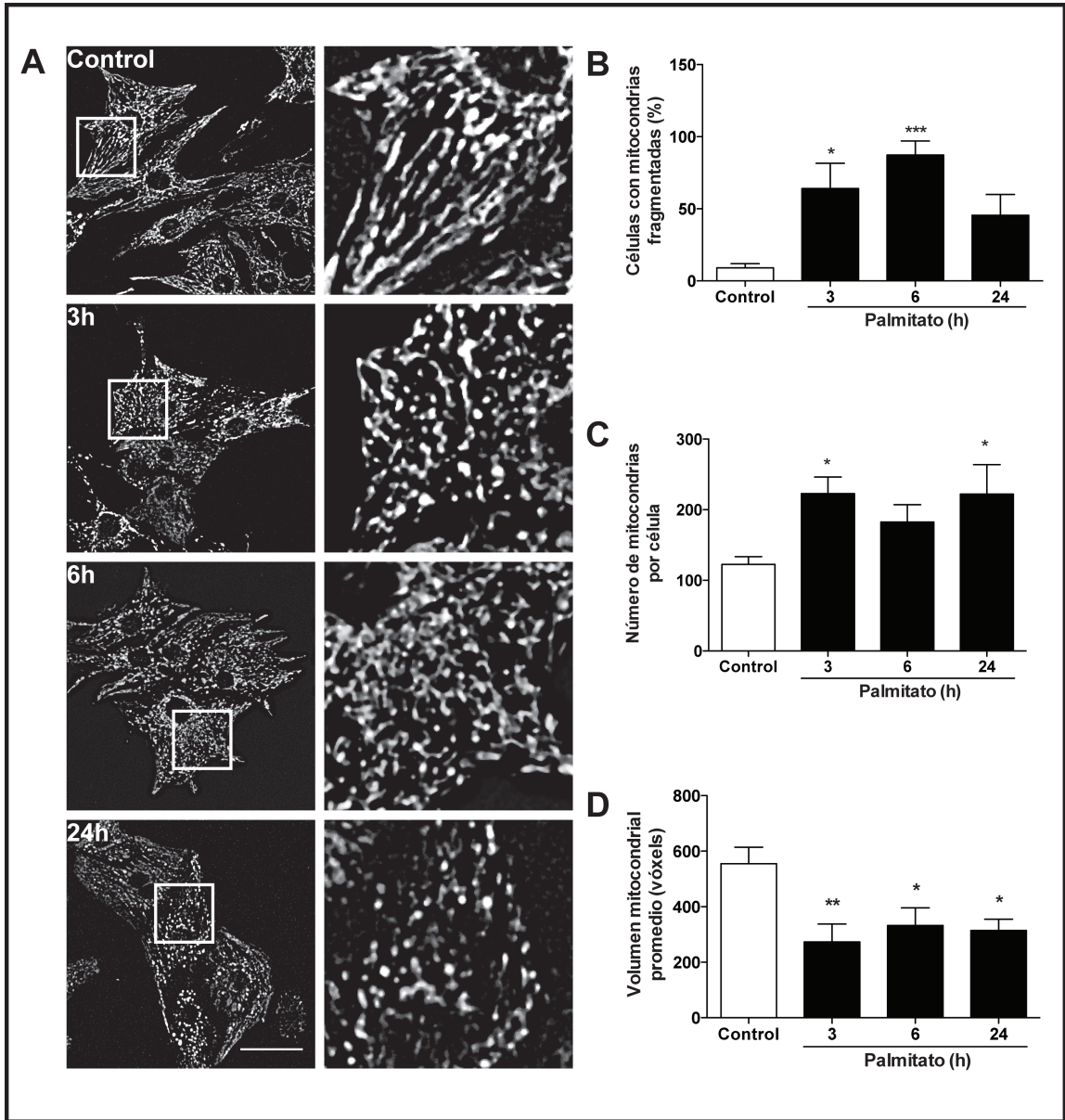


Figura 6. Efectos de palmitato 25 nM sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocitos en cultivo. Se muestran reconstrucciones 3D de imágenes deconvolucionadas de cardiomiocitos incubados con palmitato 25 nM por los tiempos indicados. Escala: 20 μ m. **(A)** Se determinaron el número de células con patrón mitocondrial fragmentado **(B)**, el número de mitocondrias por células **(C)** y el volumen mitocondrial promedio **(D)**. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,00$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, n = 6.

En conjunto, estos resultados sugieren que la red mitocondrial se fragmenta en respuesta al tratamiento con palmitato. Sin embargo, dada la naturaleza dinámica del control morfológico mitocondrial, un estado aparentemente fisionado puede ser el resultado de una disminución en la tasa de fusión o de un aumento de la tasa de fisión.

6.2. Efectos de palmitato sobre la distribución subcelular de las proteínas de fisión mitocondrial

Un criterio adicional a los ya utilizados para definir los procesos de fisión y fusión mitocondrial, es el estudio de los cambios en el estado de equilibrio de los efectores proteicos involucrados en estos procesos. La fisión mitocondrial requiere de la translocación de la proteína DRP-1 hacia el compartimiento mitocondrial (Smirnova et al., 2001). Para evaluar la participación de la maquinaria de fisión en los efectos de palmitato, se estudió la colocalización de DRP-1 con FIS-1 mediante inmunofluorescencia indirecta (Parra et al., 2007). Evidencias previas del laboratorio indican que esta maquinaria opera efectivamente en los cardiomiocitos neonatos y que aumentos en la fisión mitocondrial se asocian con un aumento de la colocalización efectiva de DRP-1 con FIS-1 (Parra et al., 2007).

Para evaluar si palmitato induce fragmentación de la red mitocondrial a través de un aumento de la fisión, las células se trataron con las mismas condiciones señaladas anteriormente y se evaluó la colocalización efectiva

mediante el coeficiente de Mander (Parra et al., 2007). La **Figura 7** muestra que palmitato 2 nM no produjo cambios significativos en el coeficiente de Mander, por lo que no afectó la localización subcelular de DRP-1. Sin embargo, como muestra la **Figura 8**, la concentración mayor de palmitato (25 nM) indujo un aumento significativo de la colocación efectiva desde las 3 hasta las 24 h. De acuerdo a lo esperado, no se detectó ningún cambio en ninguna condición en el coeficiente de Mander en el Ch2 respecto del Ch1 (**Figuras 7-8**), dado que FIS-1 es una proteína anclada a la membrana externa de la mitocondria la cual no puede desplazarse libremente, a diferencia de DRP-1 que es una proteína de ubicación fundamentalmente citosólica que es reclutada a la mitocondria. Estos resultados, en conjunto con la **Figura 6** sugieren fuertemente que palmitato 25 nM gatilla fragmentación mitocondrial mediante la activación de la maquinaria de fisión. Por otra parte, palmitato 2 nM no indujo efectos significativos en la distribución de DRP-1, confirmando los resultados observados en la **Figura 7**.

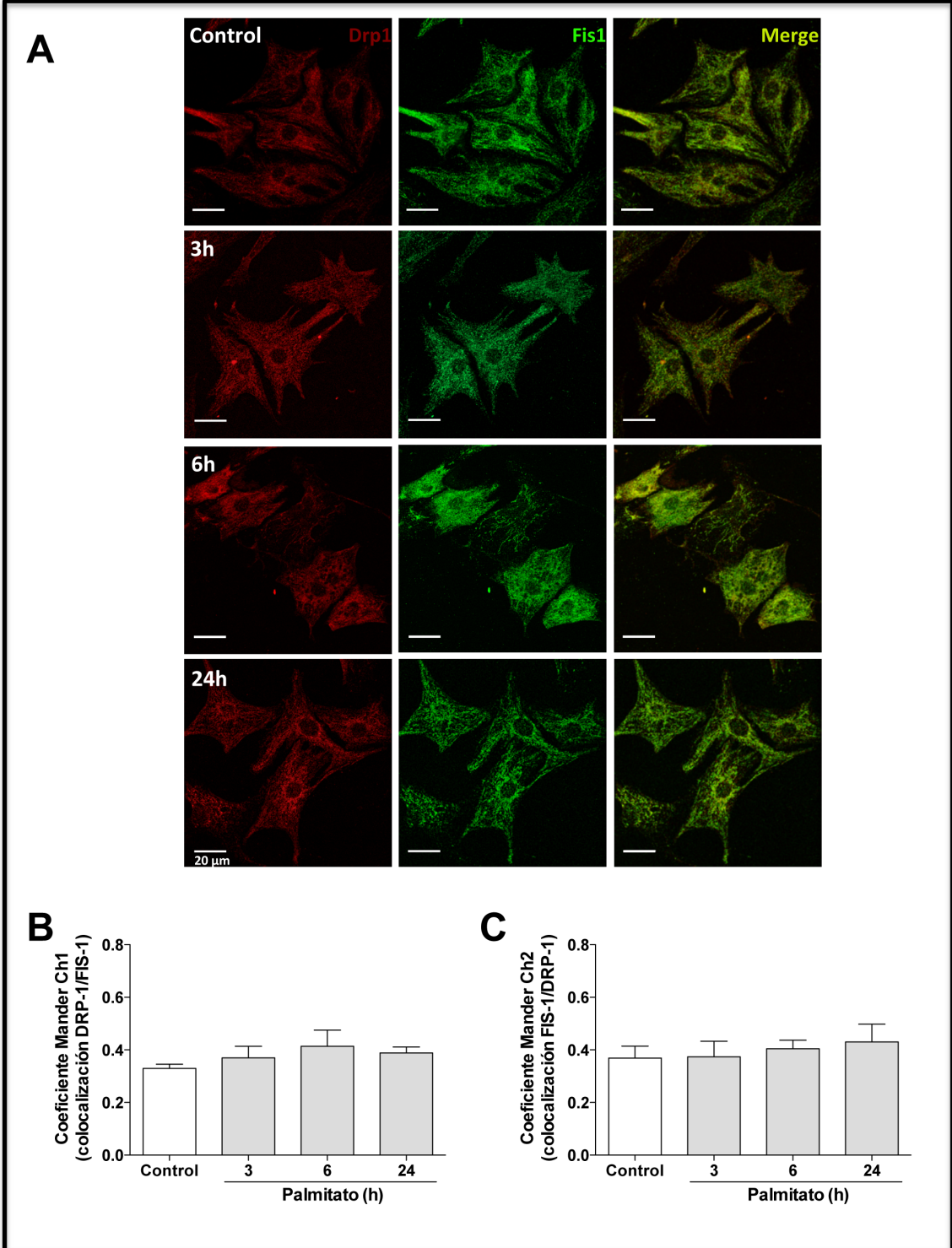


Figura 7. Palmitato 2 nM no altera la distribución subcelular de DRP-1 en cardiomiocitos en cultivo. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencias de cardiomiocitos tratados con palmitato 2 nM en los tiempos indicados. Se muestra la tinción para DRP-1 (rojo, izq) y FIS-1 (verde, centro) y “merge” (amarillo, der). Escala: 20 μ m. Los coeficientes de Mander se calcularon para la colocalización específica de DRP-1 a FIS-1 (Ch1, **B**) y de FIS-1 sobre DRP-1 (Ch2, **C**). n = 4.

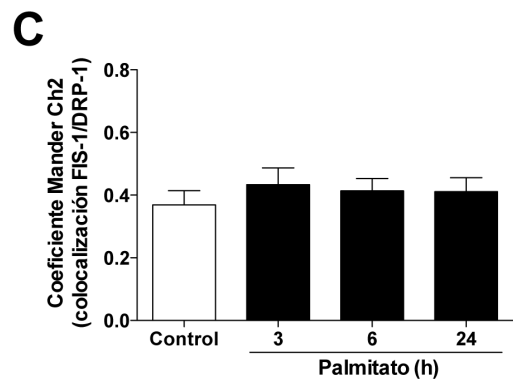
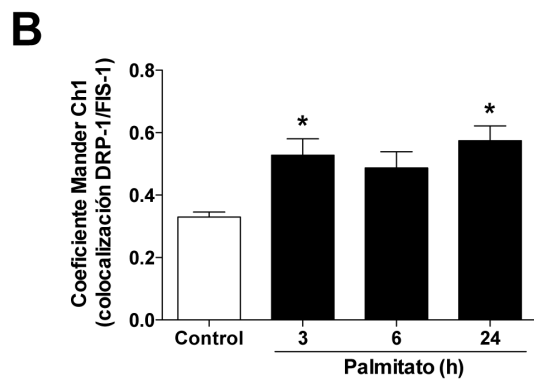
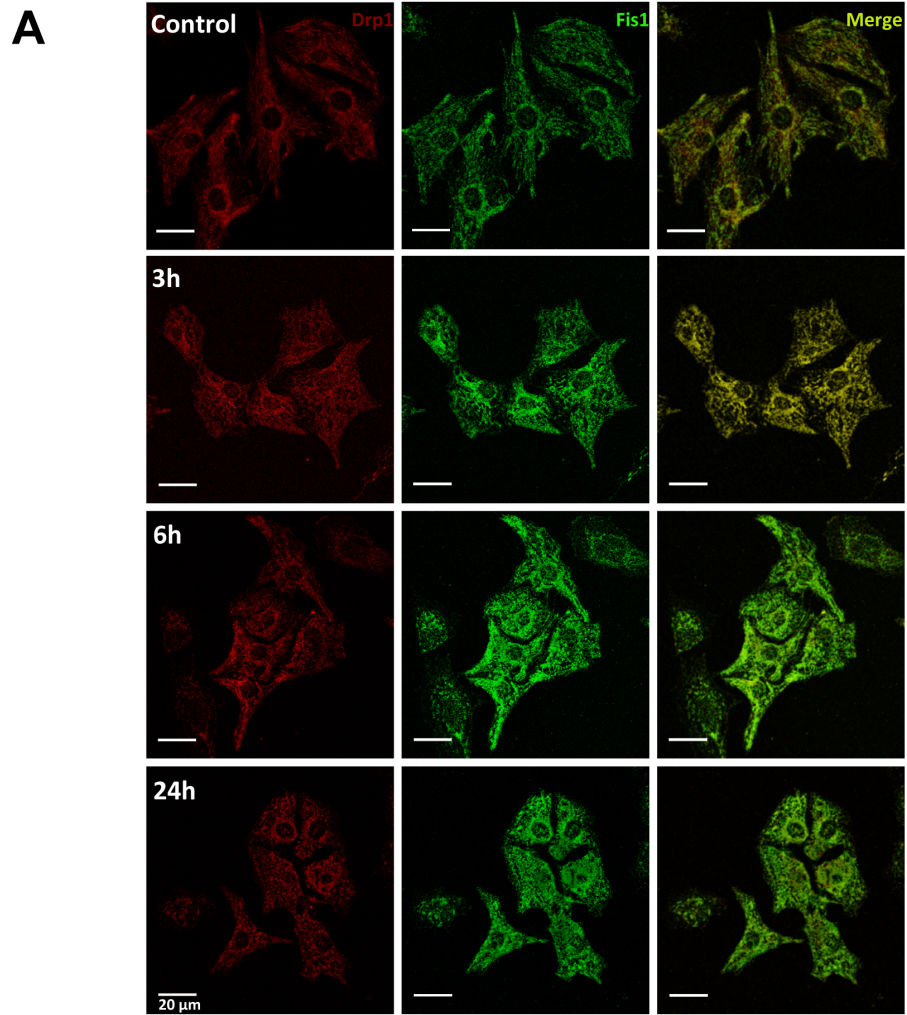


Figura 8. Palmitato 25 nM induce la translocación de DRP-1 hacia la mitocondria en cardiomiocitos en cultivo. (A) Imágenes representativas de inmuno-fluorescencias de cardiomiocitos tratados con palmitato 25 nM en los tiempos indicados. Se muestra la tinción para DRP-1 (rojo, izq) y FIS-1 (verde, centro) y “merge” (amarillo, der). Escala: 20 μ m. Los coeficientes de Mander se calcularon para la colocalización específica de DRP-1 a FIS-1 (Ch1, **B**) y de FIS-1 sobre DRP-1 (Ch2, **C**). * $p < 0.05$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 4$.

Para profundizar el estudio de la translocación de DRP-1 hacia la mitocondria, las mismas imágenes se analizaron utilizando un protocolo de segmentación radial mediante un programa desarrollado por nuestro laboratorio. Brevemente, las células se aislaron en las imágenes, sus centros (núcleos) se definieron manualmente y el análisis radial se realizó en zonas concéntricas como se muestra en la **Figura 9**. Los coeficientes de Mander se calcularon para las zonas definidas en células control y tratadas con palmitato 25 nM por 3 h como se muestra en la **Figura 10**. No se encontraron diferencias significativas en el grado de colocalización en las diferentes zonas. Estos resultados muestran que DRP-1 es reclutado a la mitocondria de forma no diferencial a lo largo de toda la célula. No se encontró ningún aumento significativo en el grado de colocalización en ninguna zona en las células tratadas con palmitato 2 nM (no mostrado).

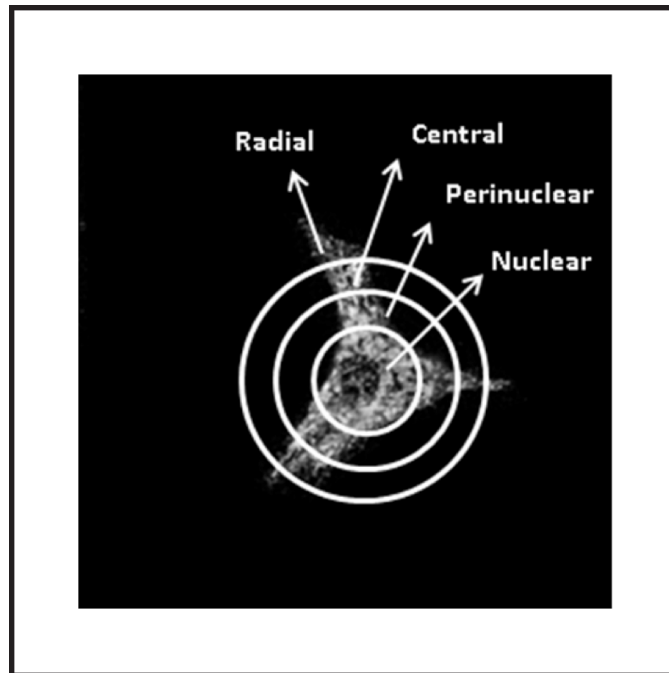


Figura 9. Segmentación radial. Se muestra una imagen de las zonas definidas en el análisis de segmentación radial. La intensidad de la señal o lo colocalización pueden ser analizadas separadamente para cada región y para la célula completa. Las regiones excéntricas se definieron como: Nuclear, Perinuclear, Central y Radial (Bravo et al., 2011).

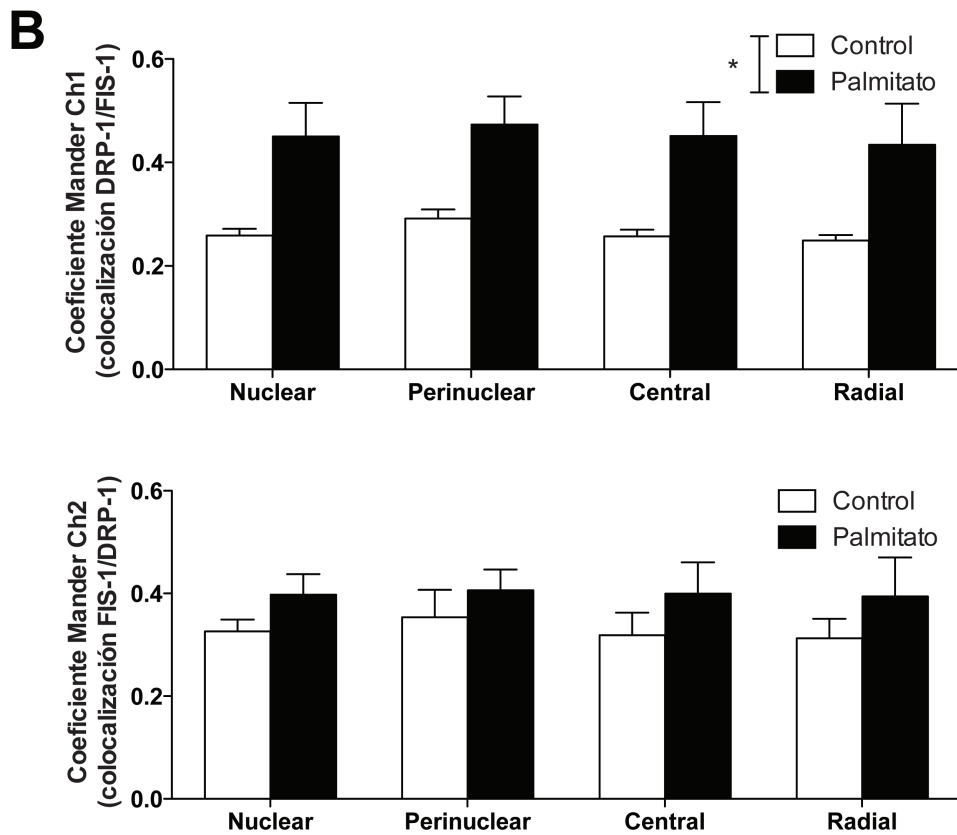
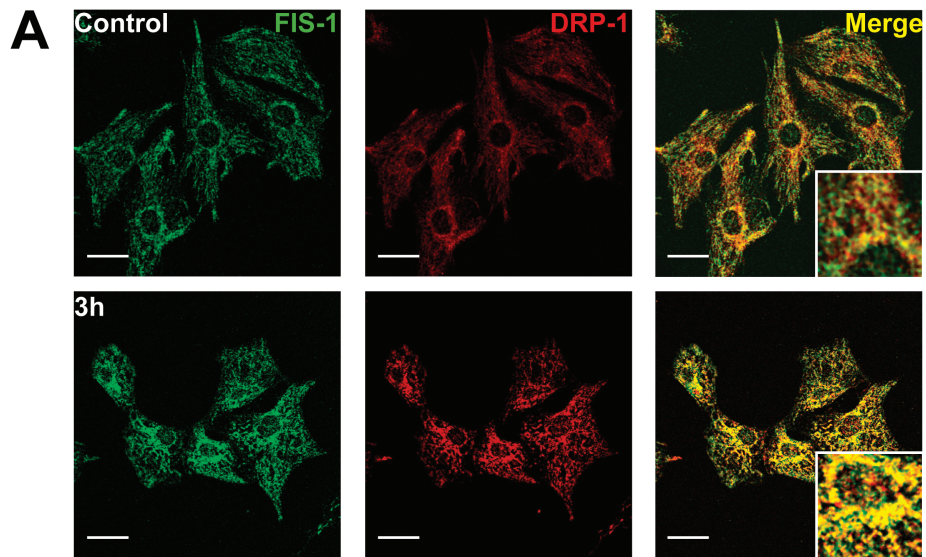


Figura 10. Efectos de palmitato sobre la distribución radial de DRP-1 en cardiomiocitos en cultivo. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencias de cardiomiocitos controles y tratados con palmitato 25 nM por 3 h. Se muestra la tinción para FIS-1 (verde, izquierda), DRP-1 (rojo, centro) y la superposición de ambas imágenes o “merge” (amarillo, derecha). Escala: 20 μ m. (B) Los coeficientes de Mander se calcularon para la colocalización específica del Ch1 sobre el Ch2 y el Ch2 sobre el Ch1 (C) en las diferentes zonas celulares. * $p < 0.05$ vs. Control, ANOVA 2-vías, $n = 4$.

6.3. Efectos de palmitato sobre la masa mitocondrial en cardiomiocitos

La morfología mitocondrial depende del balance entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial, pero también puede ser influenciada por las tasas de biogénesis mitocondrial y degradación por mitofagia (Diaz & Moraes, 2008). Los resultados descritos anteriormente sugieren fuertemente que los efectos morfológicos de palmitato se deben a cambios en la actividad de las proteínas de fisión mitocondrial. Sin embargo, alteraciones en mitogénesis o mitofagia no pueden ser descartadas. Para clarificar este punto se evaluó, mediante Western blot, la expresión de la proteína mitocondrial constitutiva HSP70, una proteína no relacionada con los procesos de dinámica mitocondrial y parte estructural del complejo de importación de proteínas mitocondriales TOM20 (Diaz & Moraes, 2008). Como se muestra en la **Figura 11**, el tratamiento con palmitato no produjo cambios en los niveles de expresión de HSP70, lo que sugiere que no hay modificaciones en la masa mitocondrial.

De manera complementaria, se evaluó la masa mitocondrial mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Green, cuya retención en la mitocondria no depende del Ψ_{mt} , a través de la determinación de la fluorescencia total de la población de células vivas. Contrario a lo anticipado, en la **Figura 12** se observa una disminución significativa de la fluorescencia en los cardiomiocitos tratados con 25 nM de palmitato a todos los tiempos. Estos resultados son contrarios a los expuestos anteriormente; sin embargo, esto podría deberse a artefactos en la técnica introducidos por el exceso de lípidos.

Se ha descrito que la incorporación de Mitotracker Green a la mitocondria, si bien no depende de potencial tal como lo muestra el control con CCCP, requiere de la interacción con lípidos y proteínas de la membrana mitocondrial interna por mecanismos no dilucidados. En las condiciones de exceso de palmitato, puede que estas interacciones se vean afectadas, alterando la incorporación adecuada de la sonda. Debido a esto, se decidió considerar solamente los resultados obtenidos mediante Western blot.

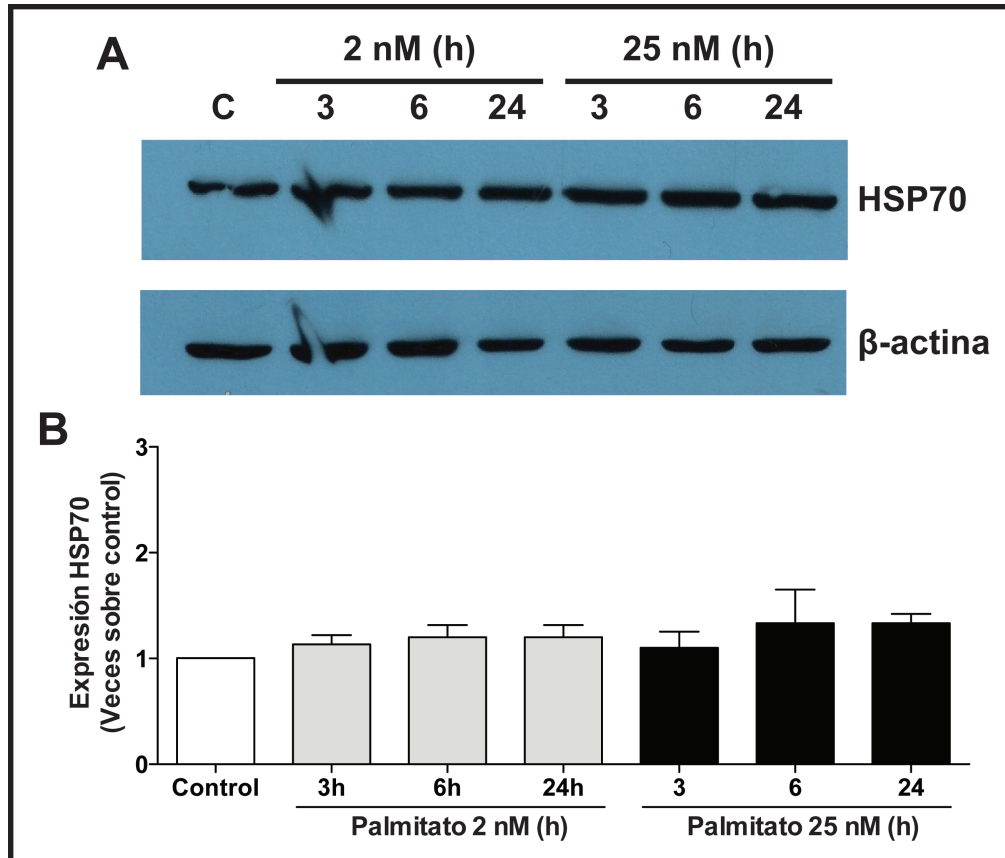


Figura 11. Palmitato no afecta los niveles de expresión de HSP70 en cardiomiocitos en cultivo. (A) Western blot representativo para HSP70 de extractos de células tratadas con palmitato a los tiempos y concentraciones indicadas. **(B)** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de HSP70 normalizado contra β -actina y expresado como veces sobre control. $n = 3$.

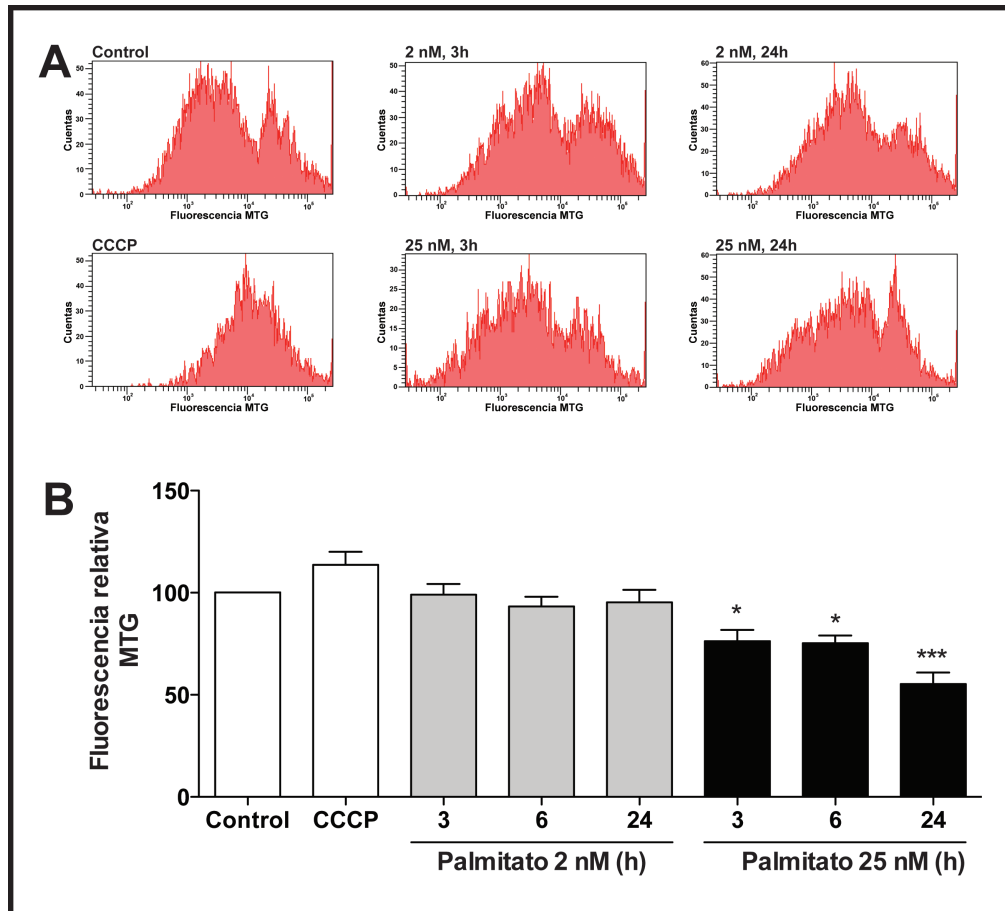


Figura 12. Palmitato 25 nM induce pérdida de la fluorescencia de Mitotracker green en cardiomiocitos en cultivo. (A) Gráficos representativos de experimentos de citometría de fluorescencia de Mitotracker green en las poblaciones de células vivas tratadas con palmitato a los tiempos y concentraciones indicadas. La fluorescencia media se determinó y normalizó a los controles. **(B)** Se muestra el efecto del desacoplante mitocondrial CCCP como control de carga de la sonda. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 4$.

6.4. Efectos de palmitato sobre los niveles de las proteínas de dinámica mitocondrial

De manera de caracterizar más profundamente la fisión mitocondrial observada con palmitato, los niveles de expresión de las proteínas de fisión DRP-1 y FIS-1 se evaluaron mediante Western blot. Las **Figuras 13-14** muestran que el tratamiento con palmitato no modificó los niveles totales de expresión de las proteínas de fisión mitocondrial.

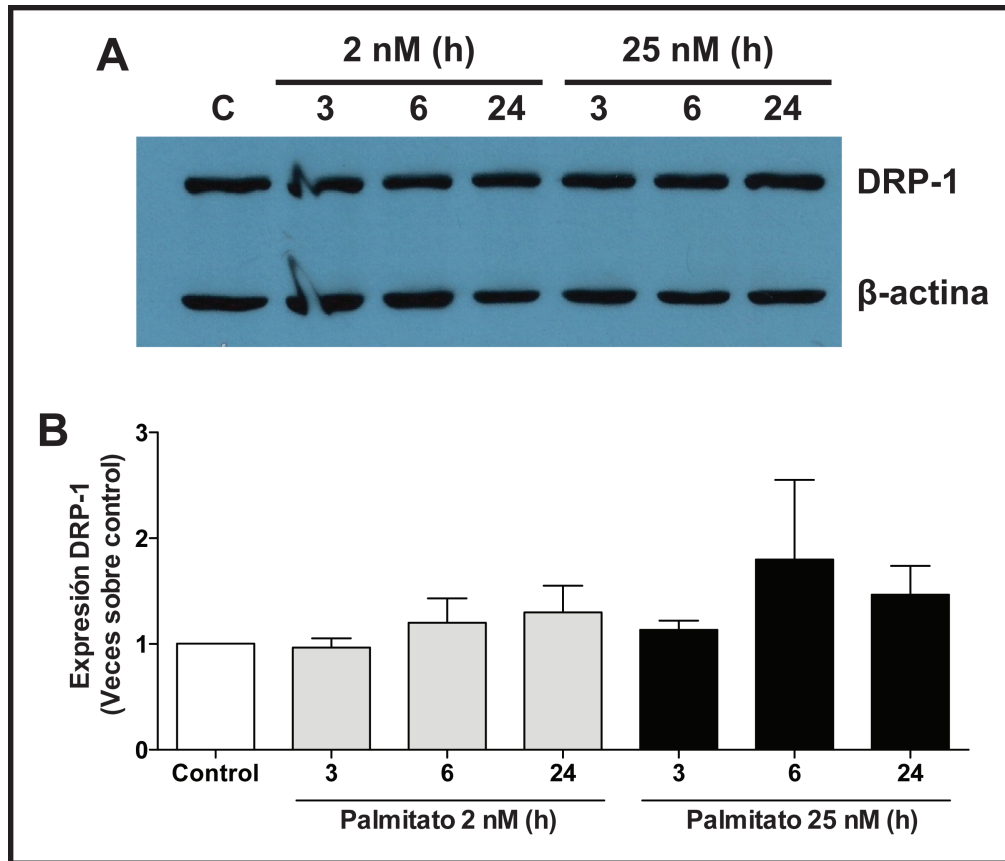


Figura 13. Palmitato no altera los niveles totales de DRP-1 en cardiomiocitos en cultivo. (A) Western blot representativo de DRP-1 de extractos totales de células incubadas con palmitato a los tiempos y concentración indicados. (B) Análisis densitométrico de la expresión de Drp-1 normalizada contra β -actina y expresado como veces sobre control. n = 3.

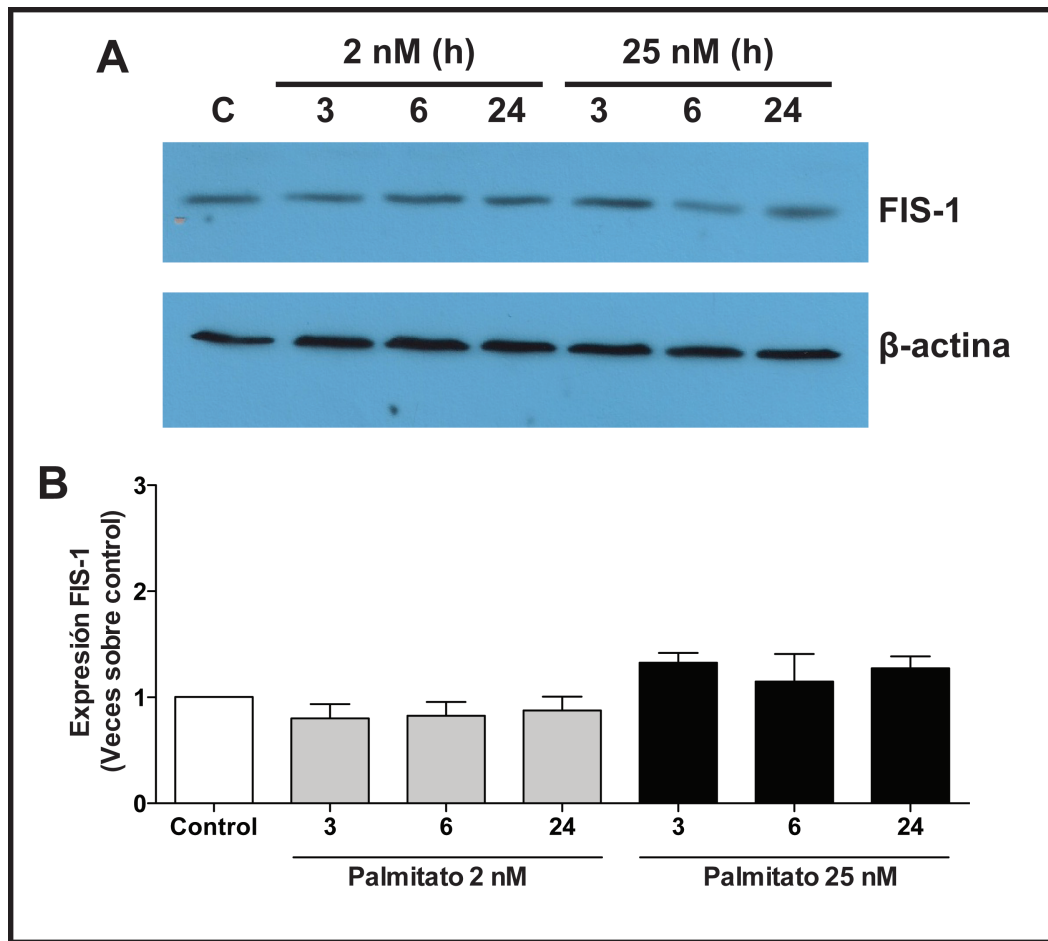


Figura 14. Palmitato no afecta los niveles totales de FIS-1 en cardiomiocitos en cultivo. (A) Western blot representativo de FIS-1 de extractos totales de cardiomiocitos tratados con palmitato por los tiempos y concentraciones indicados. **(B)** Análisis densitométrico de la expresión de Fis-1 normalizada contra β -actina y expresada como veces sobre control. n = 3

6.5. Efectos de palmitato sobre el metabolismo mitocondrial en los cardiomiocitos

Considerando los resultados hasta aquí expuestos y la relación que existe entre morfología y función mitocondrial (Kuzmicic et al., 2011), algunos parámetros metabólicos se determinaron a fin de caracterizar con mayor profundidad los efectos de palmitato en cardiomiocitos. Para este fin, se evaluaron tres marcadores metabólicos: Ψ_{mt} , contenido intracelular de ATP, y consumo celular de oxígeno, los que en conjunto dan cuenta del metabolismo y funcionalidad de la mitocondria en nuestro modelo.

El potencial mitocondrial de membrana se midió mediante citometría de flujo con la sonda tetrametil rodamina-éster (TMRE). En la **Figura 16**, se observa que palmitato 25 nM produjo una pérdida significativa del potencial mitocondrial a las 24 h. De manera consecuente con los resultados anteriores, palmitato 2 nM no tuvo efectos sobre el potencial mitocondrial **Figura 15**.

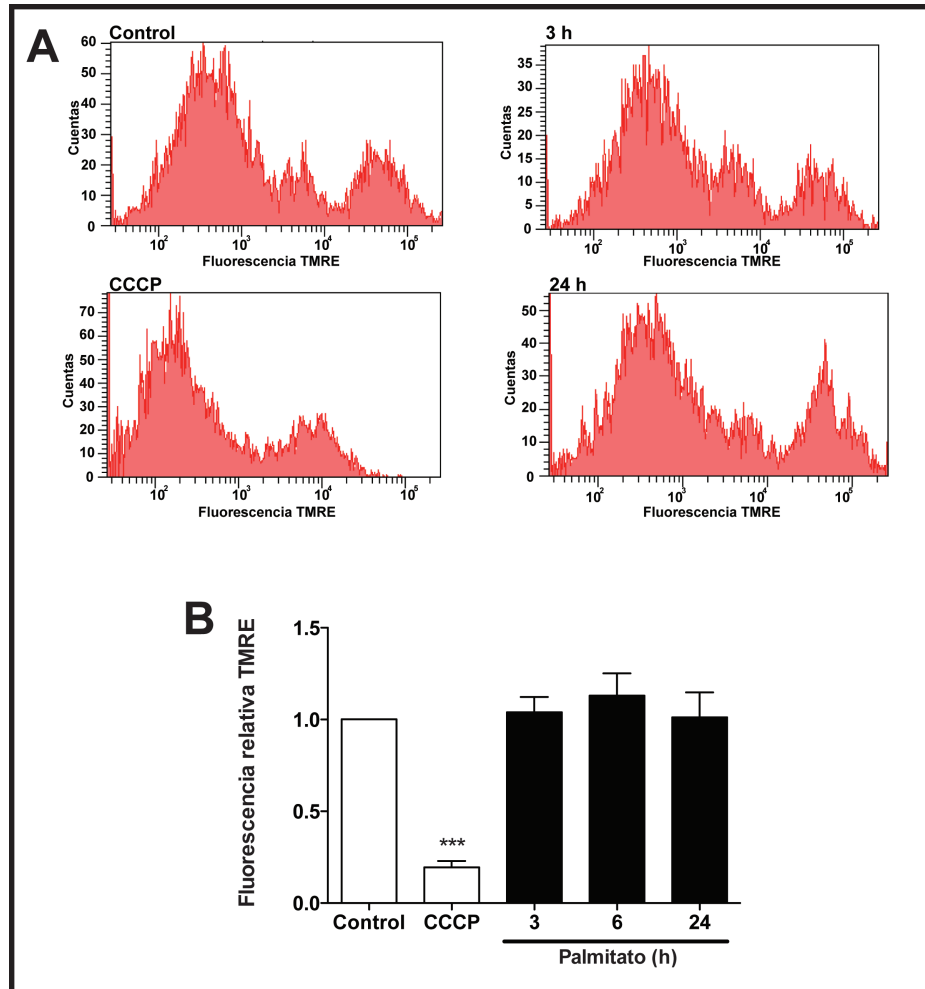


Figura 15. Palmitato 2 nM no altera el potencial mitocondrial en cardiomiocitos en cultivo. (A) Gráficos representativos de experimentos de citometría de fluorescencia de TMRE en las poblaciones de células vivas tratadas con palmitato 2 nM a los tiempos indicados. La fluorescencia media se determinó y normalizó a los controles. **(B)** Se muestra el efecto del desacoplante mitocondrial CCCP como control positivo de despolarización mitocondrial. n = 4.

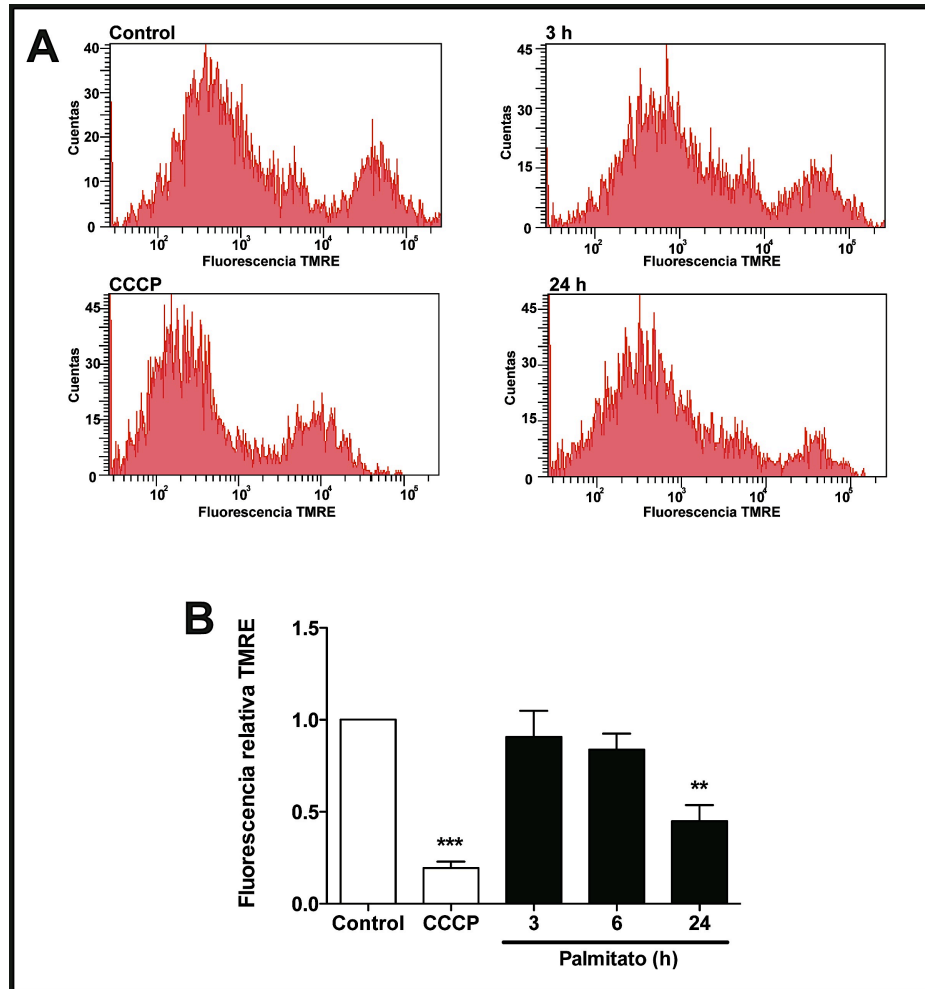


Figura 16. Palmitato induce pérdida del potencial mitocondrial a tiempos tardíos en cardiomiocitos en cultivo. (A) Gráficos representativos de experimentos de citometría de fluorescencia de TMRE en las poblaciones de células vivas tratadas con palmitato 25 nM a los tiempos indicados. La fluorescencia media se determinó y normalizó a los controles. **(B)** Se muestra el efecto del desacoplante mitocondrial CCCP como control positivo de despolarización mitocondrial. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 4$.

El potencial mitocondrial de membrana es la fuerza motriz para la síntesis de ATP por la ATP sintasa mitocondrial o complejo V. Si palmitato produce despolarización mitocondrial, es esperable observar una disminución de los niveles intracelulares de ATP. Para testear esta hipótesis, se realizaron experimentos de medición de usando un kit comercial basado en la reacción luciferina/luciferasa (Cell Titer-Glo) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La **Figura 17** muestra que el tratamiento por 3 h con palmitato 25 nM redujo significativamente los niveles intracelulares de ATP, a pesar de a que este tiempo el potencial no es distinto a los controles (**Figura 16**).

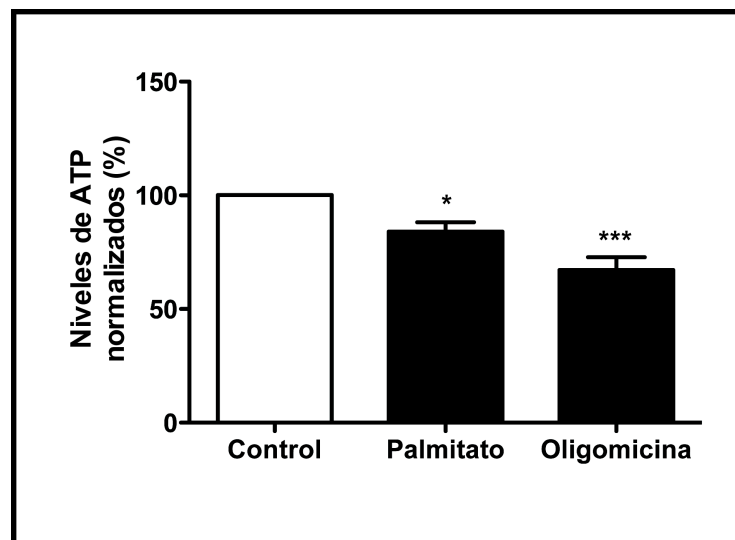


Figura 17. Palmitato reduce los niveles intracelulares de ATP en cardiomiocitos en cultivo. Los niveles intracelulares de ATP se midieron utilizando un kit basado en la reacción luciferina/luciferasa (CellTiter-Glo, Promega) y normalizados contra el Control. Las células se trataron con palmitato 25 nM (3 h) u oligomicina (1 h) como control positivo de disminución de ATP. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Control. Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 6$.

De forma paralela, se investigó la velocidad de respiración celular, ya que el consumo de oxígeno puede ser correlacionado con la actividad de la cadena transportadora de electrones y el metabolismo mitocondrial. Para este propósito se midió el consumo de oxígeno mediante oxigrafía de Clark. La **Figura 18** muestra que las velocidades de consumo de oxígeno basal y máxima (desacoplada), disminuyen significativamente en las células tratadas con palmitato 25 nM por 3 h.

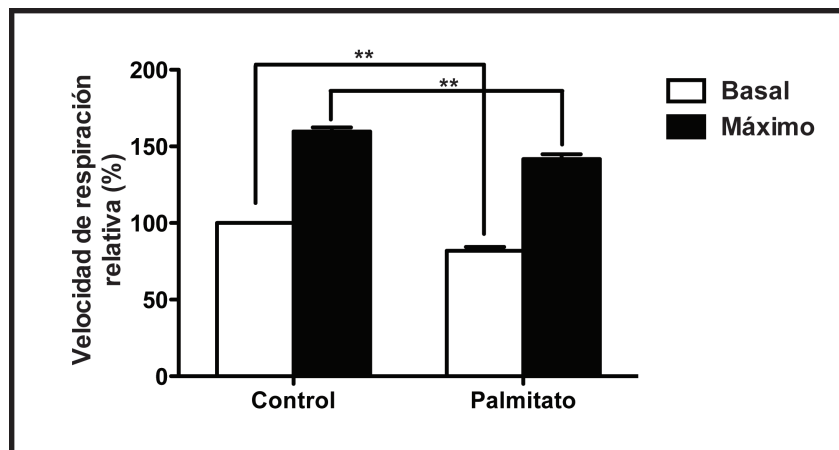


Figura 18. Palmitato reduce la velocidad de respiración basal y desacoplada en cardiomiocitos en cultivo. El consumo de oxígeno se determinó mediante un oxígrafo de Clark y normalizó a la respiración basal de los controles. Se muestra el efecto del tratamiento con palmitato 25 nM por 3 h. El consumo máximo se registró al agregar 200 nM del desacoplante CCCP en la cámara de incubación. $**p < 0,01$ vs. Control. Tuckey post ANOVA 1-vía, $n = 3$.

La actividad oxidativa mitocondrial a menudo se asocia con producción de EROs, especialmente en condiciones de muerte o toxicidad celular. Palmitato se ha relacionado con aumento de EROs en algunos modelos (Summers, 2006) por lo que se evaluó la producción de EROs en nuestras condiciones experimentales mediante la utilización de la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA) y citometría de flujo. La **Figura 19** muestra que palmitato 25 nM (3h) no aumentó las EROs en cardiomiocitos. Resultados similares han sido descritos previamente usando un modelo de cardiomiocitos neonatos en cultivo (Hickson-Bick et al., 2000).

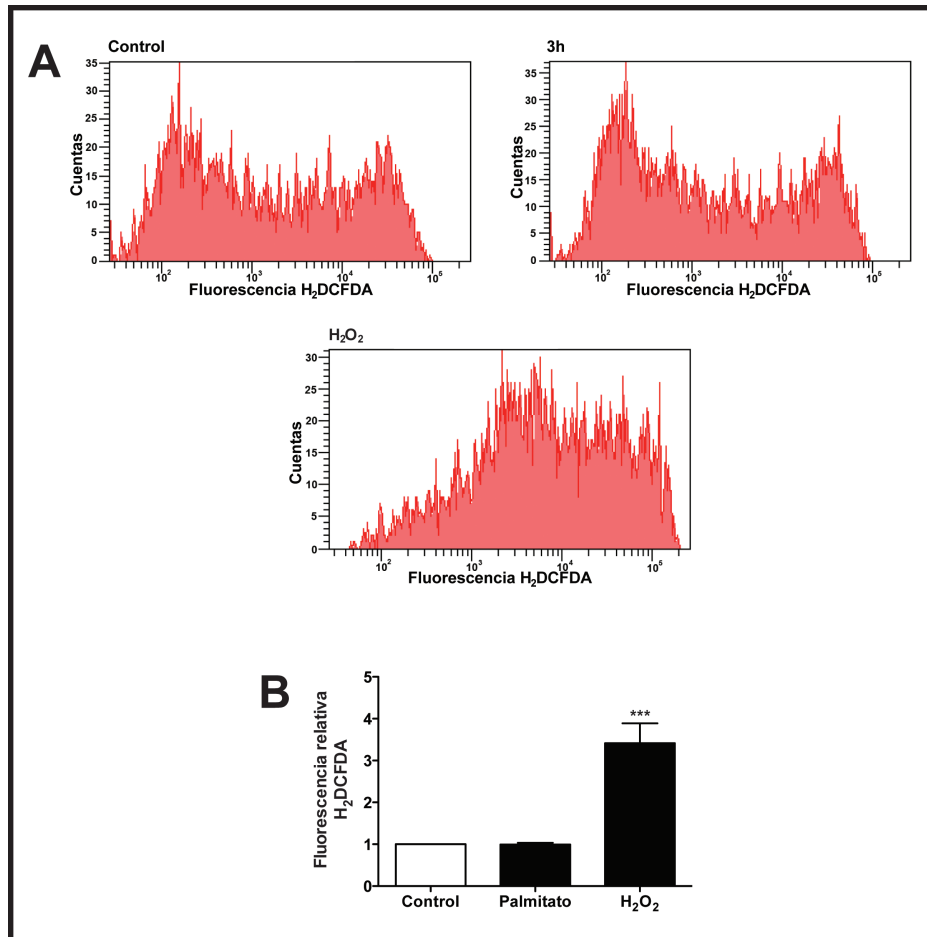


Figura 19. Palmitato no produce cambios en la cantidad de EROs en los cardiomiocitos en cultivo. (A) Gráficos representativos de experimentos de citometría de fluorescencia de H₂DCFDA en las poblaciones de células vivas tratadas con palmitato 25 nM por 3 h. La fluorescencia media se determinó y normalizó a los controles. **(B)** Se muestra el efecto de H₂O₂ como control positivo de EROs. *** $p < 0,001$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 5$.

6.6. Efectos de palmitato sobre la producción endógena de ceramidas

En literatura se ha descrito que el palmitato es un sustrato preferencial para la síntesis *de novo* de ceramida (Summers, 2006) lo que a su vez se ha correlacionado con fisión mitocondrial en cardiomiocitos (Parra et al., 2007). En nuestro modelo se evaluó la producción de diversos intermediarios de la vía de síntesis *de novo* de ceramida mediante espectrometría de masa en colaboración con el laboratorio del Dr. Michael Jensen de la Clínica Mayo. La **Figura 20** resume los hallazgos más relevantes. En nuestras condiciones de trabajo palmitato 25 nM aumentó significativamente los niveles del precursor de ceramidas esfinganina (**Figura 20A**), sustrato de la enzima ceramida sintasa (Summers, 2006), y los niveles de C16-ceramida (**Figura 20B**). Palmitato no cambió los niveles de esfingosina, intermediario de la vía de degradación de ceramidas (Summers, 2006) (**Figura 20C**). En la **Figura 20D** se muestra una tendencia al aumento de esfingosina 1-fosfato, sustrato de la vía de rescate de ceramidas (Summers, 2006), por el tratamiento con palmitato, pero no alcanzó significancia estadística. De forma consistente con los resultados previos, palmitato 2 nM no incrementó los niveles de ninguno de los intermediarios evaluados (**Figura 20**).

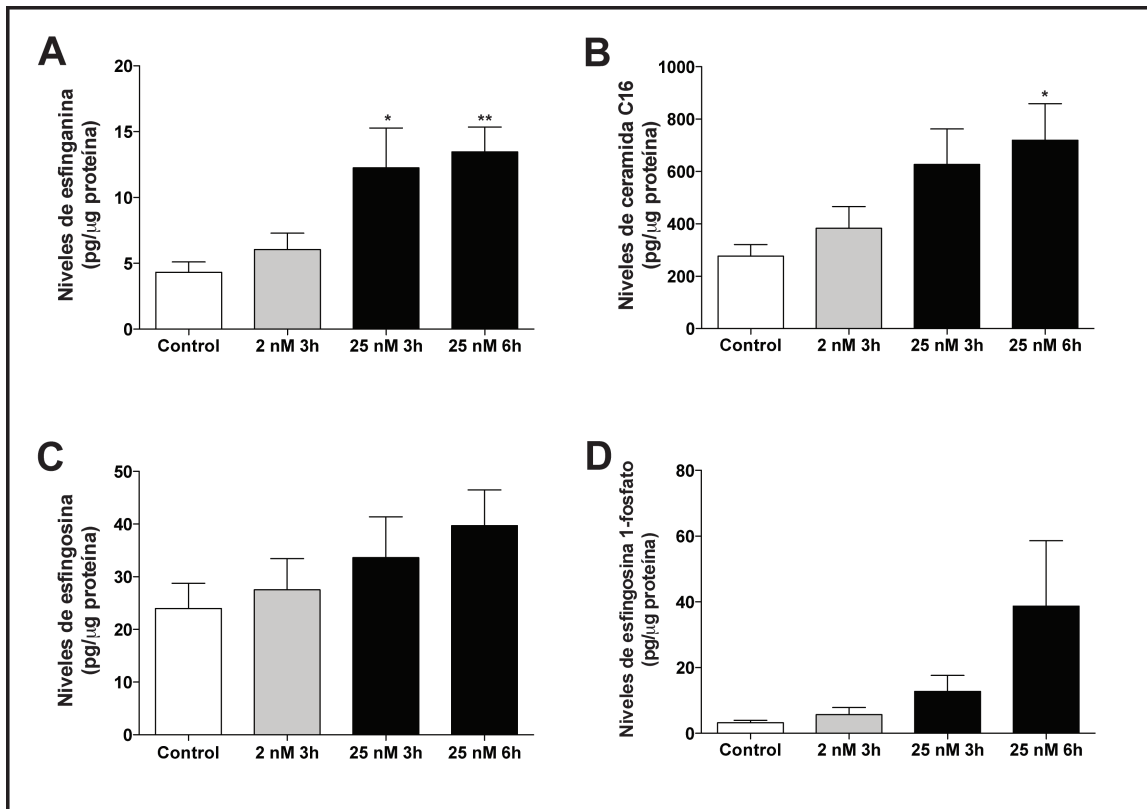


Figura 20. Palmitato aumenta los niveles intracelulares de ceramidas en cardiomiocitos en cultivo. Los niveles intracelulares de los intermediarios de la vía de síntesis y degradación de ceramidas esfinganina (**A**), ceramida C16 (**B**), esfingosina (**C**) y esfingosina 1-fosfato (**D**) se determinaron por espectroscopía de masa en cardiomiocitos tratados con palmitato 2 y 25 nM por los tiempos indicados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Control. Tuckey post ANOVA 1-vía, $n = 4$.

6.7. Efectos de palmitato en la sobrevivencia celular

Dado que la lipotoxicidad por ácidos grasos ha sido ampliamente asociada con procesos de muerte celular, y el hecho de que el kit de medición de ATP empleado puede ser utilizado también como un kit de viabilidad celular, resulta necesario evaluar muerte celular en nuestras condiciones de trabajo. Para esto se analizó la viabilidad celular mediante dos técnicas basadas en citometría de flujo: incorporación de ioduro de propidio (PI) en células intactas y tinción SubG1 con PI en células permeabilizadas. La **Figura 21** muestra los resultados para la incorporación de PI. En estas condiciones palmitato 25 nM causó muerte celular a tiempos de incubación largos (24 h), con valores similares al control positivo. De manera similar, la **Figura 22** muestra que palmitato 25 nM indujo apoptosis a tiempos tardíos. No se observó muerte celular significativa en el tratamiento con palmitato 2 nM (**Figuras 21-22**).

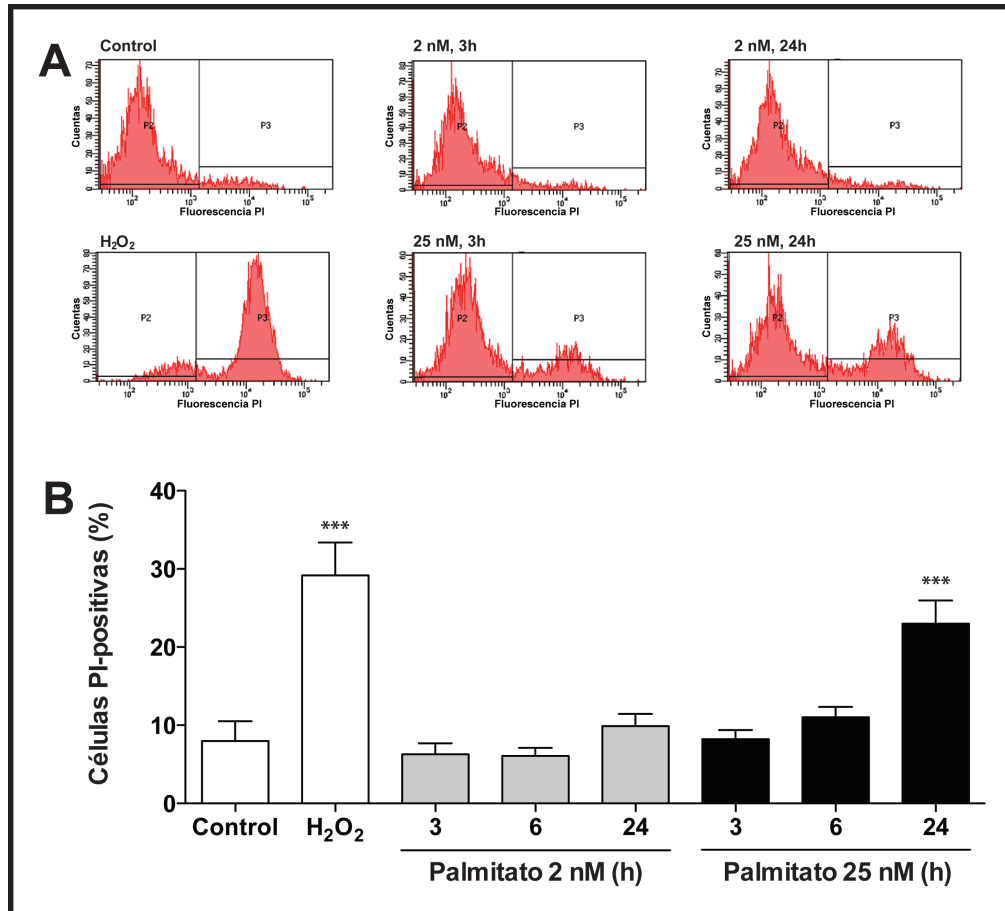


Figura 21. Palmitato reduce la viabilidad celular en cardiomiocitos en cultivo. (A) Gráficos representativos de citometría de incorporación de PI en células intactas en las concentraciones y tiempos indicados. La incorporación de PI se cuantificó en la población PI positiva (P3) en las células tratadas con palmitato 25 nM a los tiempos indicados **(B)**. H₂O₂ (175 mM, 30 min) se muestra como control positivo de muerte celular. *** $p < 0.001$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 4$.

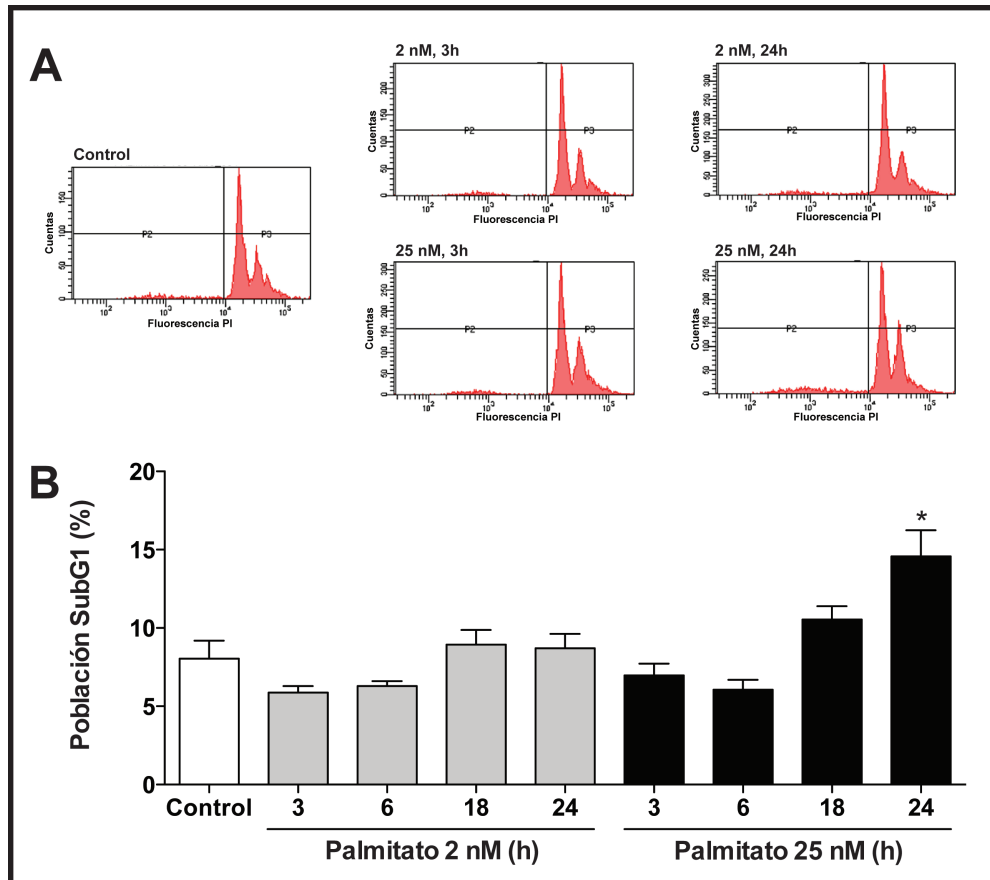


Figura 22. Palmitato induce apoptosis en cardiomiocitos en cultivo. (A) Gráficos representativos de citometría para la tinción con PI y análisis de población SubG1 en las concentraciones y tiempos indicados. **(B)** El porcentaje de células con fluorescencia menor al máximo de la población G1 (población SubG1, P2) se cuantificó en células tratadas con palmitato 25 nM a los tiempos indicados. $**p < 0,01$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 4$.

6.8. Efectos de TMZ sobre la morfología mitocondrial de los cardiomiocitos

Para continuar con el desarrollo del segundo objetivo planteado en esta tesis: “estudiar los efectos de TMZ sobre morfología, función mitocondrial y el cambio metabólico en cultivos primarios de cardiomiocitos” se procedió a realizar una batería de experimentos similar a la anterior, reemplazando los estímulos con palmitato por TMZ. Se realizó una curva de concentraciones crecientes de TMZ desde 0,1 a 100 μM , abarcando el rango de concentraciones descritas en la literatura para estudios *in vitro* (Tselepis et al., 2001; Tabbi-Anneni, 2002).

Para comenzar a estudiar los efectos de TMZ, primero se evaluó la morfología mitocondrial en cardiomiocitos tratados por 24 h con TMZ (0,1 - 100 μM). En la **Figura 23A** se observan los efectos de TMZ a diferentes concentraciones. Mientras que 1 μM de TMZ promovió la fusión mitocondrial, la concentración más elevada, 100 μM , sugiere inducir el efecto opuesto. En la **Figura 21B** se muestra la cuantificación del número de mitocondrias y el volumen mitocondrial promedio. TMZ 1 y 10 μM indujeron una marcada fusión mitocondrial, efecto que no se observó a mayores o menores concentraciones ni siguió un comportamiento dosis-respuesta.

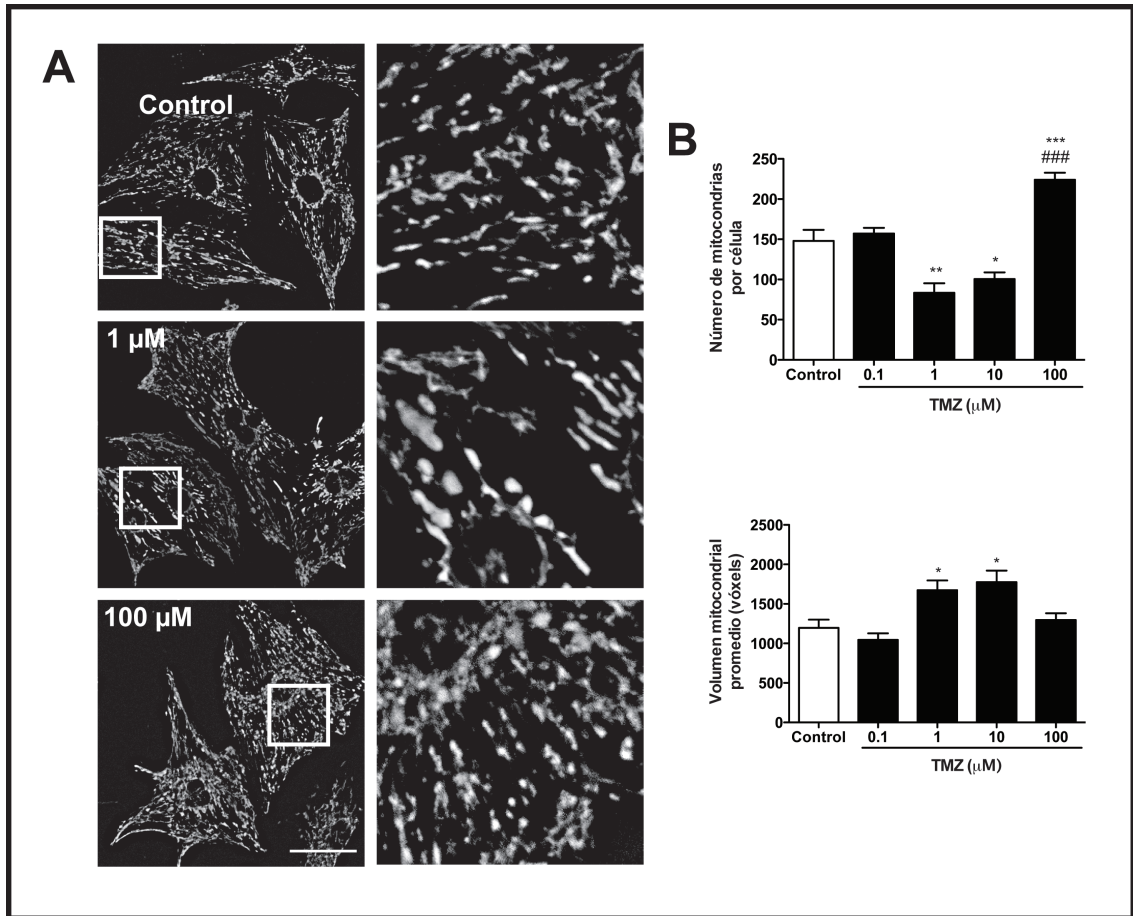


Figura 23. Efecto de trimetazidina sobre la morfología mitocondrial en cardiomiocitos en cultivo. (A) Se muestran reconstrucciones 3D de imágenes deconvolucionadas de cardiomiocitos incubados con TMZ por 24 h a las concentraciones indicadas y teñidos con Mitotracker Green. **(B)** El número de mitocondrias por célula (panel superior) y el volumen mitocondrial promedio (panel inferior) se calcularon en la forma señalada en la sección de Metodología. Escala: 20 μm . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Control, ### $p < 0,001$ vs 1 μM . Tuckey post ANOVA 1-vía, n = 5.

6.9. Efectos de TMZ sobre los niveles de las proteínas de dinámica y masa mitocondrial

Con el fin de caracterizar la participación de la maquinaria proteica de dinámica mitocondrial, se evaluó, mediante Western blot, los totales niveles de las proteínas de fisión y fusión en los cardiomiocitos tratados con TMZ. La **Figura 24** muestra la expresión de las proteínas DRP-1 y FIS-1 en extractos de proteínas totales. No se observaron cambios significativos con ninguna concentración. De manera similar, tampoco se observaron cambios en los niveles de expresión de las proteínas de fusión OPA-1 ni MFN-2 (**Figura 25**).

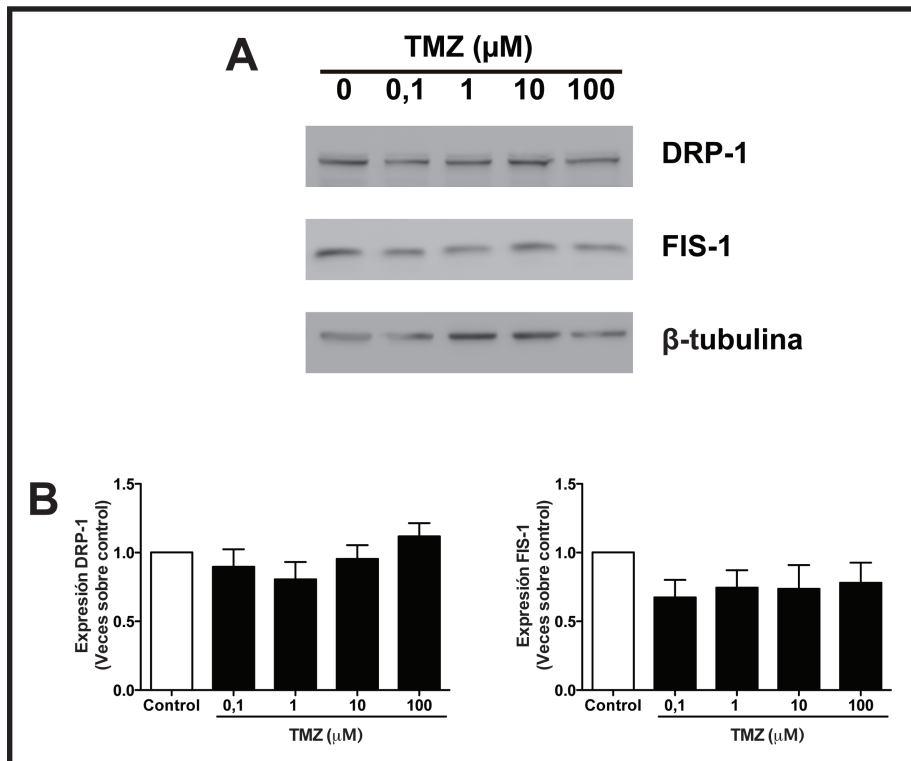


Figura 24. TMZ no altera los niveles totales de las proteínas de fisión mitocondrial en cardiomiocitos en cultivo. (A) Western blot representativo de DRP-1 y FIS-1 de extractos totales de células incubadas con TMZ a las concentraciones indicadas por 24 h. **(B)** Análisis densitométrico de la expresión de DRP-1 (izquierda) y FIS-1 (derecha) normalizada contra β -tubulina y expresado como veces sobre control. n = 3.

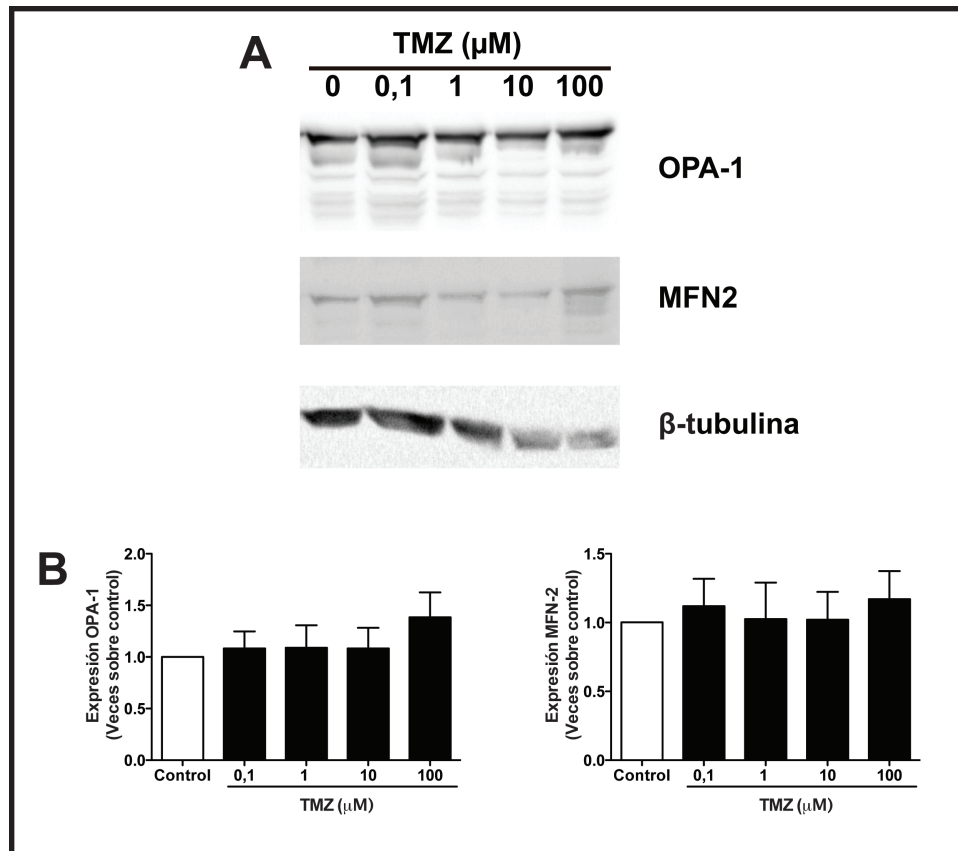


Figura 25. TMZ no altera los niveles totales de las proteínas de fusión mitocondrial en cardiomiocitos en cultivo. (A) Western blot representativo de OPA-1 y MFN-2 de extractos totales de células incubadas con TMZ a las concentraciones indicadas por 24 h. **(B)** Análisis densitométrico de la expresión de OPA-1 (izquierda) y MFN-2 (derecha) normalizada contra β -tubulina y expresado como veces sobre control. n = 3.

Como se mencionó anteriormente, el control de la morfología mitocondrial no solo depende de la actividad de las proteínas de dinámica, sino que también del equilibrio entre la síntesis y la degradación del organelo. Por lo tanto, para descartar cambios en la masa mitocondrial, que pudieran dar cuenta de los cambios morfológicos observados, se midieron los niveles de expresión de la proteína HSP70. Como muestra la **Figura 26**, tampoco se observaron cambios en los niveles de HSP70 por el tratamiento con TMZ. En conjunto, estos resultados sugieren que los efectos morfológicos observados se deben posiblemente a cambios en la actividad de las proteínas de dinámica mitocondria. Sin embargo, con la metodología empleada no fue posible determinar si el fenotipo mitocondrial observado se debe a una disminución de la tasa de fisión mitocondrial o a un aumento de la tasa de fusión.

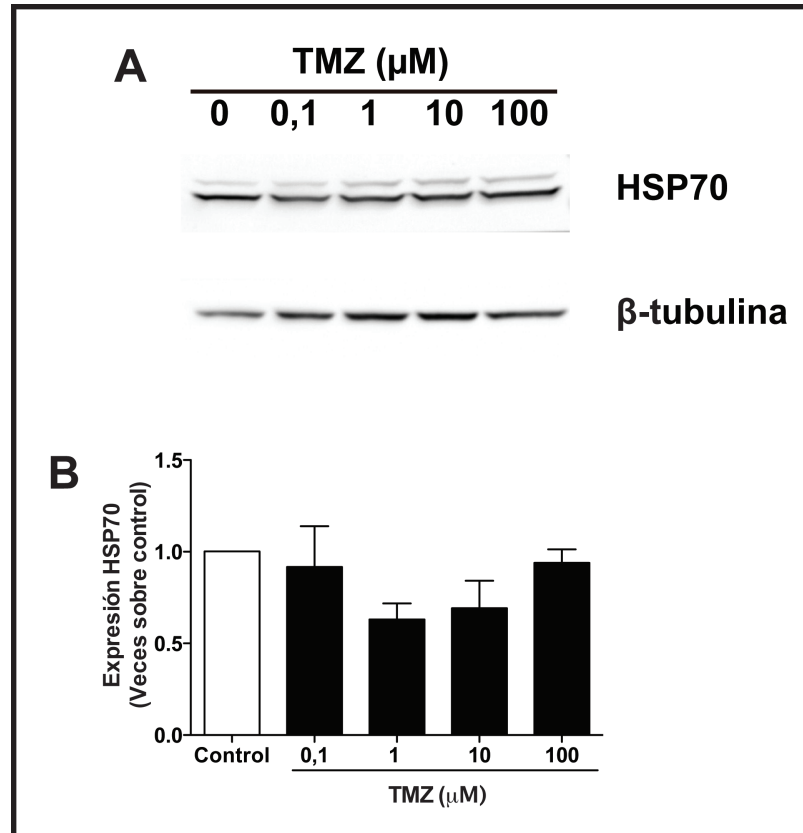


Figura 26. TMZ no afecta los niveles de expresión de HSP70 en cardiomiocitos en cultivo. (A) Western blot representativo para HSP70 de extractos de células tratadas con TMZ a las concentraciones indicadas por 24 h. **(B)** Análisis densitométrico de los niveles de expresión de HSP70 normalizado contra β -tubulina y expresado como veces sobre control. n = 3

6.10. Efectos de TMZ sobre el metabolismo mitocondrial de los cardiomiocitos

Dada la fusión mitocondrial inducidas por las concentraciones bajas de TMZ, se decidió explorar si los cambios morfológicos se correlacionan con un incremento en el metabolismo mitocondrial en cardiomiocitos. Al igual que en el caso de palmitato, se realizó un set de experimentos dirigidos a evaluar el estado metabólico mitocondrial, los que incluyeron Ψ_{mt} , contenido intracelular de ATP y consumo celular de oxígeno. La **Figura 27** muestra que TMZ 1 μM produjo un aumento significativo del potencial de membrana mitocondrial, lo que se acompañó de un aumento significativo en los niveles intracelulares de ATP (**Figura 28**) y del consumo basal y máximo de oxígeno (**Figura 29**). En conjunto, estos datos sugieren que TMZ a dosis bajas aumenta la fusión y metabolismo mitocondrial en cardiomiocitos.

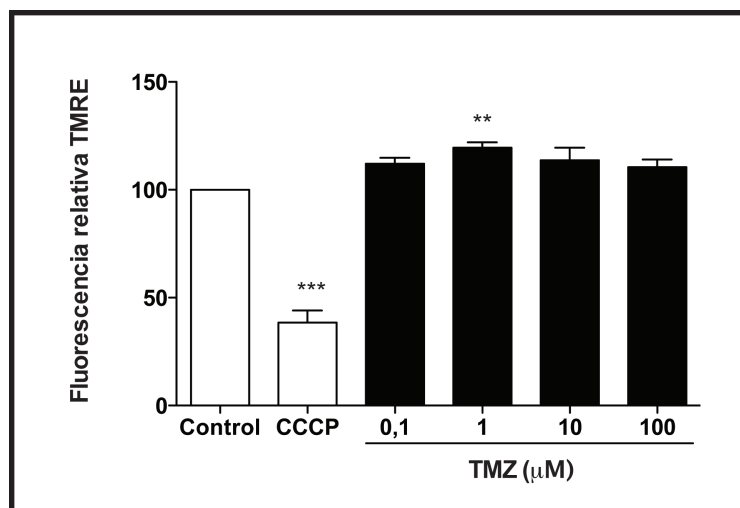


Figura 27. TMZ aumenta potencial mitocondrial a bajas concentraciones en cardiomiocitos en cultivo. Se trataron cardiomiocitos con TMZ a las concentraciones indicadas por 24 h. En la población de células vivas se midió la fluorescencia de TMRE y se normalizó a los controles. Se muestra el efecto del desacoplante mitocondrial CCCP como control positivo de despolarización mitocondrial. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. Control, Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 4$.

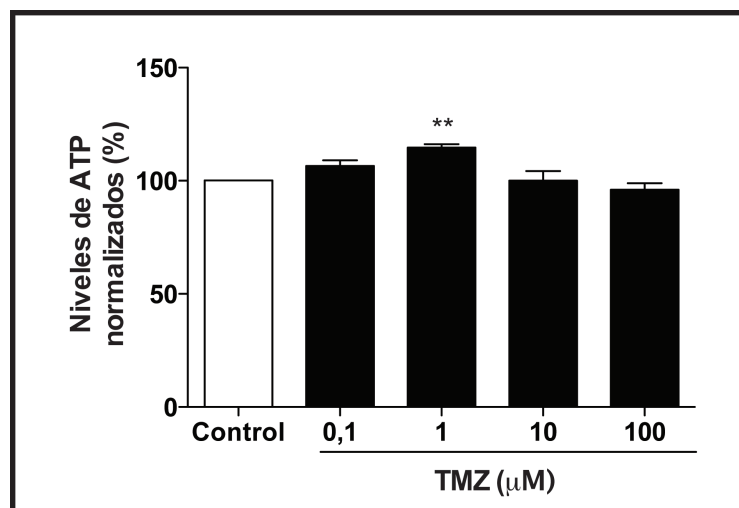


Figura 28. TMZ aumenta los niveles intracelulares de ATP a bajas concentraciones en cardiomiocitos en cultivo. Los niveles intracelulares de ATP se midieron utilizando un kit basado en la reacción luciferina/luciferasa (CellTiter-Glo, Promega) y normalizados contra el Control. Las células fueron tratadas con TMZ a las concentraciones indicadas por 24 h. **** $p < 0,01$** vs. Control. Dunnett post ANOVA 1-vía, $n = 6$.

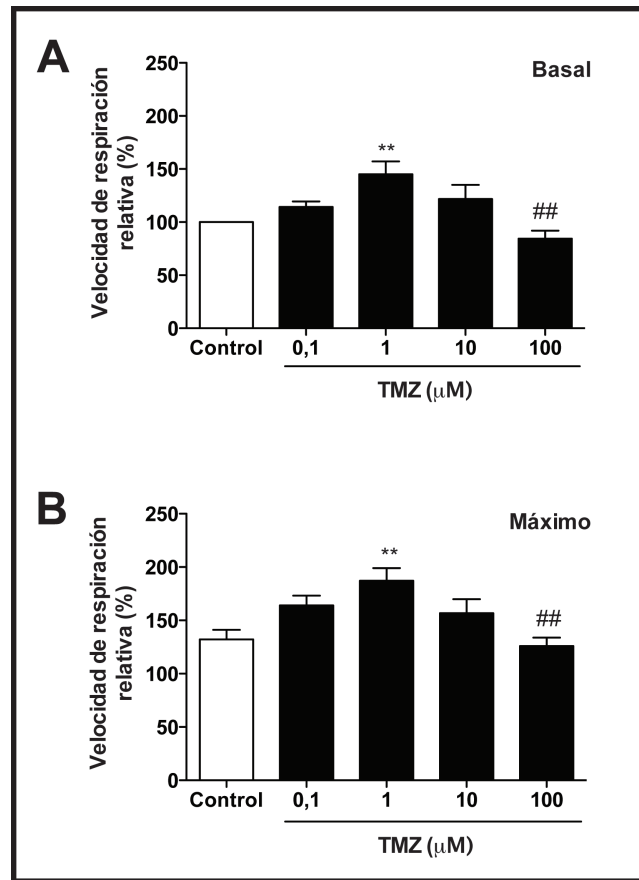


Figura 29. TMZ aumenta la velocidad de respiración basal y desacoplada a bajas concentraciones en cardiomiocitos en cultivo. El consumo de oxígeno se determinó mediante un oxígrafo de Clark y normalizó a la respiración basal de los controles. Se muestra el efecto del tratamiento con TMZ a las concentraciones indicadas por 24 h. El consumo máximo se registró al agregar 200 nM del desacoplante CCCP en la cámara de incubación. ** $p < 0,01$ vs. Control; ## $p < 0,01$ vs 1 μ M, Tuckey post ANOVA 1-vía, n = 3.

6.11. Acción protectora de TMZ frente a la fisión y disfunción mitocondrial inducida por palmitato

Considerando que palmitato 25 nM indujo fisión y disfunción mitocondrial a las 3 h de tratamiento, que TMZ 1 μ M genera los efectos opuestos, y para continuar con el desarrollo del tercer objetivo planteado en esta tesis: “evaluar el rol protector de TMZ frente a la lipotoxicidad inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo”, se estudió el posible efecto protector de TMZ sobre palmitato. Para este fin, los cardiomiocitos se pretrataron por 24 h con TMZ 1 μ M y luego se incubaron por 3 h con palmitato. A continuación se evaluó la morfología mitocondrial, los niveles intracelulares de ATP y el consumo celular de oxígeno, correspondiente a los parámetros con cambios más significativos observados en ambos casos.

Como se describió anteriormente (**Figura 6**), palmitato indujo una marcada fisión mitocondrial evidenciada por un aumento del número de mitocondrias por célula y una disminución del volumen mitocondrial promedio, mientras que TMZ tuvo el efecto contrario (**Figura 23**). Interesantemente, la preincubación con TMZ (24 h) previo al estímulo con palmitato protegió la morfología mitocondrial de la fisión dependiente de palmitato (**Figura 30A**), siendo el número de mitocondrias por célula no diferente de los controles y significativamente menor que las células tratadas con palmitato (**Figura 30B**). Lo opuesto se observó para el volumen mitocondrial promedio (**Figura 30B**).

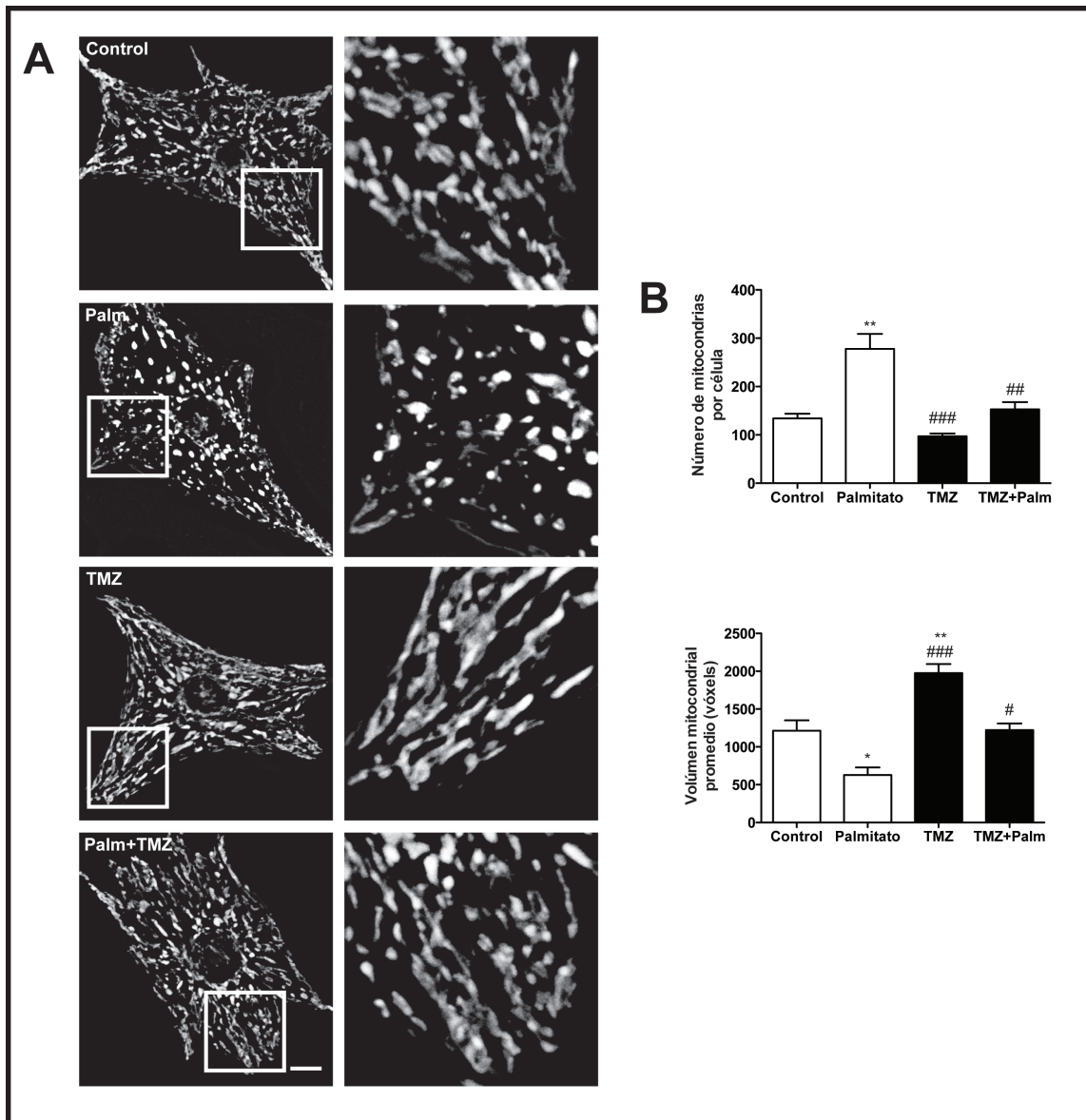


Figura 30. TMZ protege de la fisión mitocondrial inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo. Los cardiomiocitos se trataron por 24 h con 1 μ M TMZ y luego con palmitato 25 nM por 3 h. **(A)** Se muestran reconstrucciones 3D de imágenes deconvolucionadas de cardiomiocitos incubados en las condiciones indicadas en la figura y teñidos con Mitotracker Green. Escala: 10 μ m. **(B)** El número de mitocondrias por célula y el volumen mitocondrial promedio se determinaron como se indica en la sección de Metodología. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; vs. Control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,001$; vs Palmitato. Tuckey post ANOVA 1-vía, n = 3.

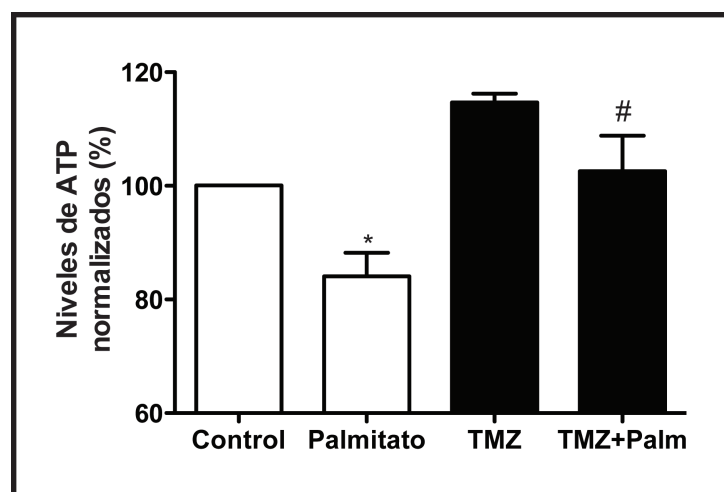


Figura 31. TMZ protege frente a la disminución de los niveles de ATP inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo. Los niveles intracelulares de ATP se midieron utilizando un kit basado en la reacción luciferina/luciferasa (CellTiter-Glo, Promega) y normalizados contra el Control. Las células fueron tratadas con palmitato (25 nM, 3 h), TMZ (1 μ M, 24 h) o preincubadas con TMZ y luego tratadas con palmitato. * $p < 0,05$ vs. Control; # $p < 0,05$ vs Palmitato, Tuckey post ANOVA 1-vía, n = 6

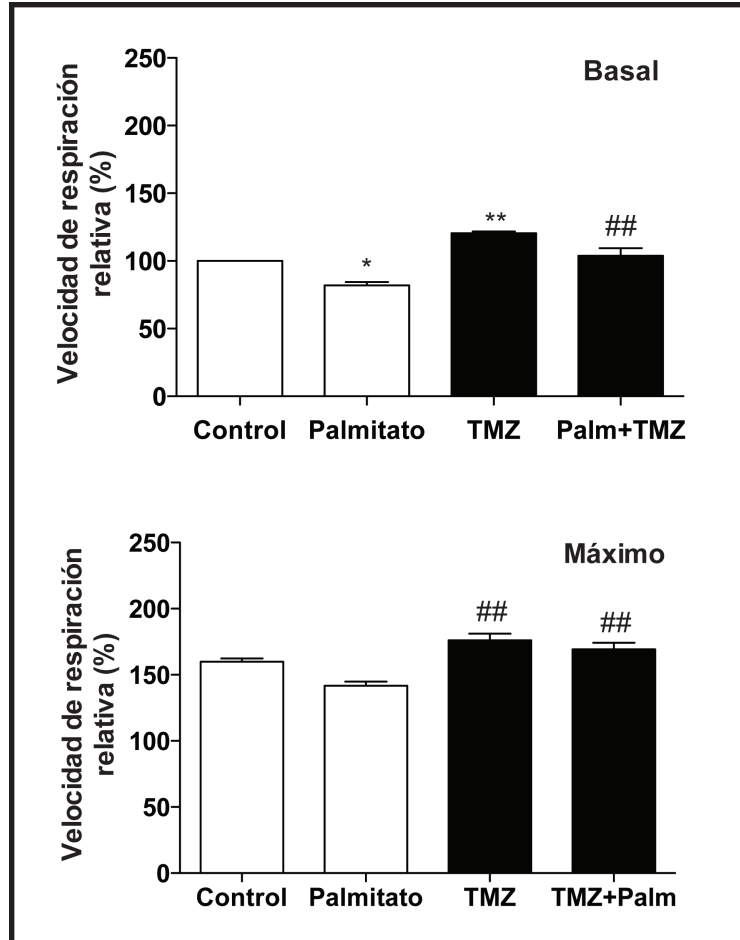


Figura 32. TMZ protege frente a la disminución del consumo celular de oxígeno inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo. El consumo de oxígeno se determinó mediante un oxígrafo de Clark y normalizó a la respiración basal de los controles. Se muestra el efecto del tratamiento con TMZ a las concentraciones indicadas por 24 h. El consumo máximo se registró al agregar 200 nM del desacoplante CCCP en la cámara de incubación. ** $p < 0,01$; vs. Control; ## $p < 0,01$ vs Palmitato, Tuckey post ANOVA 1-vía, $n = 3$, respectivamente.

6.12. Efectos de TMZ sobre el almacenamiento intracelular de lípidos y la producción de ceramidas

En conjunto, las **Figura 31-32** sugieren que TMZ actúa protegiendo a los cardiomiocitos de la sobrecarga de lípidos inducida por el tratamiento con palmitato. Sin embargo, el mecanismo de acción propuesto para TMZ es a través de la inhibición parcial de la 3-CAT mitocondrial (Kantor et al., 2000) y la disminución de la tasa de β ox de lípidos. Este efecto, a su vez, podría generar una sobrecarga intracelular de lípidos debido a la disminución en su oxidación, quedando disponibles para la acción de enzimas de vías alternativas como la síntesis de ceramidas o de diacilglicerol, tal como se muestra en la **Figura 20**. Por este motivo, se exploraron los posibles destinos intracelulares de palmitato bajo nuestras condiciones experimentales. La **Figura 33** muestra el efecto de TMZ sobre los depósitos de lípidos neutros (gotas de lípidos) al interior de los cardiomiocitos medidos con la sonda fluorescente LipidTOX en células fijadas. Como se observa en la cuantificación, TMZ aumentó el número y el área total de lípidos en comparación a los controles (**Figura 33B**). Mientras que el tratamiento de cardiomiocitos con palmitato, por sí solo, no tuvo mayores efectos en la acumulación de lípidos neutros, lo que está de acuerdo con su principal función como combustible celular (Listenberger et al., 2003).

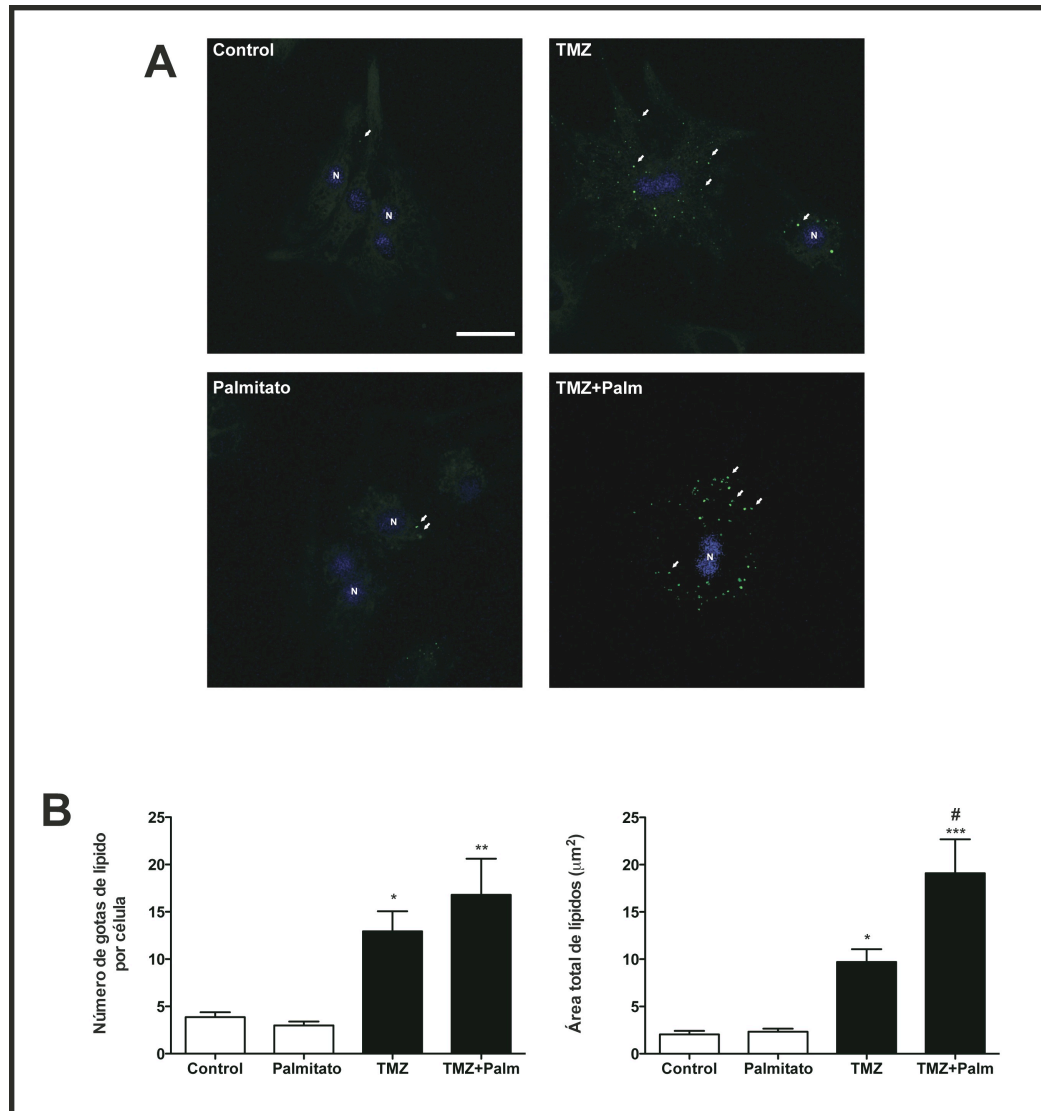


Figura 33. TMZ promueve la acumulación de palmitato en forma de gotas de lípidos neutros en cardiomiocitos en cultivo. Los cardiomiocitos se trataron con TMZ 1 μ M por 24 h y luego con palmitato 25 nM por 3 h. **(A)** Imágenes representativas de la tinción para lípidos neutros con la sonda LipidTOX en las condiciones indicadas. En azul (N) se muestran los núcleos teñidos con Hoechst y en verde (flechas) las gotas de lípido. **(B)** El número de gotas de lípido por célula (izquierda) y el área total de lípidos neutros (derecha) fueron calculados en aquellas células positivas para LipidTOX (al menos una gota). Escala: 20 μ m. * p <0,05; ** p <0,01 vs. Control; # p <0,05 vs TMZ, Tuckey post ANOVA 1-vía, n = 6.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con palmitato por si solo es capaz de aumentar la producción de intermediarios de la vía de síntesis de ceramidas y C16-ceramida, específicamente, evaluados por espectroscopía de masa (**Figura 20**). Los resultados de acumulación de palmitato en depósitos neutros, sugieren que TMZ podría promover la esterificación del exceso de lípidos, quedando inaccesible para la generación de otros intermediarios metabólicos más tóxicos a nivel celular. Para explorar esta posibilidad más detalladamente, se determinó la producción *in situ* de ceramidas mediante inmunofluorescencia indirecta. La **Figura 34** muestra que palmitato es capaz de inducir un aumento significativo de la fluorescencia intracelular, indicando un aumento de la síntesis de intermediarios de la vía de ceramidas, específicamente esfingosina, corroborando nuestros hallazgos anteriores (**Figura 20**). De manera más interesante, se muestra que el pretratamiento con TMZ es capaz de bloquear el aumento de la fluorescencia inducida por palmitato (**Figura 34**), sin alterar los niveles de ceramidas por si sola. Estos resultados, en conjunto con la **Figura 33**, sugieren que TMZ es capaz de redirigir el exceso de palmitato hacia la acumulación en depósitos intracelulares de lípidos neutros (TAG), disminuyendo su biodisponibilidad para la síntesis de metabolitos secundarios tóxicos como ceramidas.

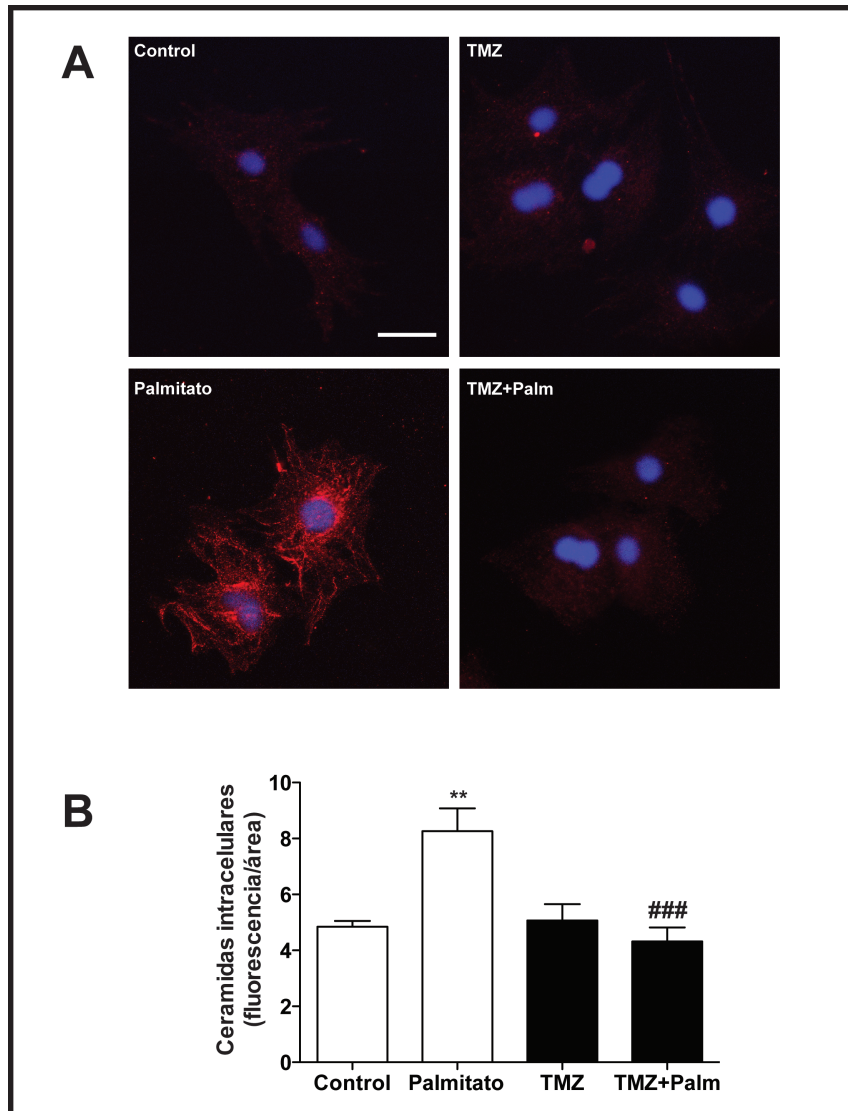


Figura 34. TMZ inhibe la producción de ceramidas inducida por palmitato en cardiomiocitos en cultivo. Los cardiomiocitos se trataron con TMZ 1 μ M por 24 h y luego con palmitato 25 nM por 3 h. **(A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencias para ceramidas (rojo) en las condiciones indicadas. En azul se muestran los núcleos teñidos con Hoechst. **(B)** Se muestra la cuantificación de la fluorescencia total por célula normalizada por el área celular. Escala: 20 μ m. ** p <0,01 vs. Control; ### p <0,001 vs TMZ, Tuckey post ANOVA 1-vía, n = 5.

7. DISCUSIÓN

Durante la IC, ocurren una serie de alteraciones metabólicas que afectan desde la utilización de sustrato metabólico, hasta la síntesis de ATP y el ciclo de la creatina (Neubauer, 2007). Dichas alteraciones se encuentran asociadas con los cambios en la capacidad funcional de los pacientes y la progresión de la enfermedad (Ingwall, 2008; Lopaschuk et al., 2010). El término “remodelado metabólico” se acuñó para describir los cambios que culminan en la depleción progresiva del ATP miocárdico (Neubauer, 2007), junto con un incremento asociado en las concentraciones de ADP, AMP y AGLs (Ingwall, 2007) mediante mecanismos no completamente esclarecidos. En esta tesis, mediante la simulación parcial de algunas de las características de este remodelado metabólico en la IC, evaluamos el potencial papel protector de TMZ en un modelo de sobrecarga por palmitato y glucolipototoxicidad. Nuestros resultados mostraron que palmitato indujo fisión y disfunción mitocondrial en cultivos primarios de cardiomiocitos en un rango de concentraciones concordante con los efectos tóxicos descritos en la literatura (Hickson-Bick et al., 2000; 2002). Además, nuestros hallazgos mostraron que la toxicidad por palmitato pudo ser, al menos, parcialmente prevenida mediante la preincubación con el inhibidor de la β ox TMZ. Interesantemente, los resultados aquí expuestos sugieren que TMZ indujo la acumulación intracelular de gotas de lípidos neutros, secuestrando así el exceso de palmitato en un reservorio metabólicamente menos activo. Estos resultados permiten expandir nuestro

conocimiento y comprensión sobre el mecanismo de acción de la TMZ, materia que aún es controversial.

7.1. Relación entre morfología mitocondrial y metabolismo

La adaptación celular a las necesidades fisiológicas requiere de un estrecho control de la demanda metabólica y los diferentes sustratos metabólicos utilizados para suplirla. El corazón es un tejido especialmente flexible, en términos metabólicos, y puede utilizar una gran variedad de sustratos como fuentes energéticas (Lopaschuk et al., 2010). A pesar de esta ventaja evolutiva, el balance energético cardíaco es muy delicado, por lo que alteraciones en este equilibrio pueden tener consecuencias patológicas como se observa en la IC (Ingwall, 2008). Durante los últimos años se ha acuñado el concepto de remodelado subcelular, el cual se refiere a los cambios bioquímicos y moleculares que ocurren durante el desarrollo y progresión de diversas enfermedades, incluyendo patologías cardiovasculares como la hipertrofia e IC (Dhalla et al., 2009). A modo de ejemplo, el remodelado del sarcolema se asocia a cambios en el manejo intracelular del Ca^{2+} , lo que altera su función como segundo mensajero, afectando a diversos canales y receptores. Paralelamente, el remodelado del retículo mitocondrial afecta directamente el estado metabólico y redox del cardiomiocito (Ishikawa et al., 2005; Weisser-Thomas et al., 2005; Tsutsui et al., 2006). En este contexto, la

morfología mitocondrial ha recibido creciente interés y ha pasado a ser considerada un potencial nuevo blanco terapéutico (Kuzmicic et al., 2011).

En tejidos con elevadas tasas metabólicas, el remodelado de la red mitocondrial altera directamente la función mitocondrial a través de cambios en la cadena transportadora de electrones, impactando profundamente el metabolismo energético (Benard et al., 2010). Según los requerimientos específicos de cada tipo celular, la red mitocondrial adquiere distintas configuraciones en términos de diferencias en la composición de la maquinaria molecular asociada a la fosforilación oxidativa, así como la organización de las mitocondrias mismas y su complejidad (Benard et al., 2010). El modelo actual considera que el control de la producción energética mitocondrial se encuentra regulado, al menos, en cinco niveles. De esta forma, la actividad de la cadena transportadora de electrones se puede modificar mediante la expresión diferencial de diversas isoformas de los complejos (Capaldi et al., 1988), por medio de modificaciones post-transduccionales de los mismos (Das et al., 1998; Carroll et al., 2005) o por modulación dependiente del Ψ_{mt} (Dalmonte et al., 2009). Por otra parte, la eficiencia de la fosforilación oxidativa depende de la conductancia basal o inducida de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Parker et al., 2009) o por el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones de la actividad de la ATP sintasa (Benard et al., 2010), entre otros. De manera complementaria, la capacidad energética de la mitocondria también puede ser modificada por el estado morfológico de la red

mitocondrial mediante cambios en las tasas de fisión o fusión (Benard et al., 2007) o por su ubicación subcelular (Choi et al., 2006; Furt & Moreau, 2009). Además, la eficiencia mitocondrial depende de la masa efectiva del organelo, lo que es controlado mediante el balance entre los procesos de biogénesis y degradación mitocondrial (mitofagia) y, evidentemente, de la disponibilidad celular de sustratos para oxidación (Benard et al., 2010). Es por estos antecedentes que cambios en la morfología del organelo o en la disponibilidad celular de nutrientes pueden alterar la función mitocondrial y comprometer la función del tejido cardíaco en diversos escenarios patológicos.

La evidencia disponible actualmente indica que los tejidos con alta demanda energética, como músculo esquelético y corazón, presentan una red mitocondrial con elementos fusionados, altamente interconectados y crestas mitocondriales empaquetadas, mientras que los tejidos con baja demanda metabólica muestran mitocondrias más pequeñas y aisladas (Duchen, 2004; Kodde et al., 2007). Estos hallazgos ponen en evidencia el rol que juega la dinámica mitocondrial en el control de la función del organelo, especialmente en un modelo como el utilizado durante el desarrollo de esta tesis. Paradójicamente, esta relación ha sido pobremente estudiada en tejido cardíaco, posiblemente debido a la percepción de que la dinámica mitocondrial no juega un papel demasiado importante dada la alta estructuración del cardiomiocito (Hom & Sheu, 2009; Parra et al., 2011). Sin embargo, el tejido cardíaco presenta altos niveles de expresión de las proteínas de dinámica

mitocondrial, en comparación con otros tejidos (Imoto et al., 1998; Bach et al., 2003; Stojanovski et al., 2004; Parra et al., 2011).

De manera interesante, en distintos modelos, se ha mostrado que la expresión de MFN-2 se asocia con una disminución en la capacidad de oxidación de sustratos, consumo de oxígeno y Ψ_{mt} (Pich et al., 2005). Resultados similares han sido observados en modelos de silenciamiento genético de OPA-1 (Chen et al., 2005) y DRP-1 (Benard et al., 2007). Estos hallazgos han sido parcialmente replicados en modelos animales y en muestras de miocardio de individuos con insuficiencia cardiaca (Chen & Chan, 2009), observándose una significativa disminución en las proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial. En conjunto, estas evidencias sugieren que las alteraciones en la dinámica mitocondrial afectan negativamente la función del organelo (Ong et al., 2010). A pesar de que la relación causal entre estas observaciones aún es materia de estudio, las evidencias concuerdan en que las alteraciones del equilibrio entre los procesos de fisión y fusión mitocondrial son una característica común de diversas enfermedades cardiacas que culminan en el síndrome de IC.

7.2. Palmitato y fisión mitocondrial

Debido a la elevada tasa metabólica del cardiomiocito, la posible relación entre la dinámica mitocondrial, el metabolismo cardiaco y la eficiencia mecánica ha cobrado reciente interés en la literatura. Nuestros resultados muestran que palmitato induce fragmentación mitocondrial a tiempos tempranos (3 h) y de manera sostenida, evidenciada por un aumento significativo en el porcentaje de células con patrón mitocondrial fragmentado, un aumento en el número de mitocondrias por célula y una disminución del volumen mitocondrial promedio (**Figura 6**). Los estudios de fisión mitocondrial inducida por palmitato en otros modelos son escasos. Sin embargo, Jheng y colaboradores (Jheng et al., 2011) describieron hallazgos similares en una línea celular de musculatura esquelética. En este estudio, la sobrecarga de palmitato generó fisión mitocondrial significativa, acompañada de una disminución a la sensibilidad a insulina (Jheng et al., 2011). Interesantemente, en este estudio, la lipotoxicidad por palmitato fue prevenida al impedir la fisión mitocondrial mediante la inhibición química y genética de DRP-1 (Jheng et al., 2011).

El proceso de fisión mitocondrial depende tanto de la translocación de DRP-1 hacia este organelo (Smirnova et al., 2001) como de su actividad GTPasa (Zhu et al., 2004). Los resultados obtenidos durante esta tesis sugieren que palmitato estimula la translocación de DRP-1 hacia la

mitocondria, evaluado como un aumento de la colocación de DRP-1 con FIS-1 (**Figura 8**), lo que explicaría el fenotipo de fragmentación mitocondrial observado. Tanto la translocación como la actividad GTPasa de DRP-1 (Chang & Blackstone, 2010) son regulados principalmente por modificaciones post-transduccionales. Probablemente este mecanismo involucra cambios en el estado de fosforilación de DRP-1. La principal fosforilación descrita para esta proteína ocurre en el residuo Ser637 y es mediada por PKA (Chang & Blackstone, 2007; Cribbs & Strack, 2007; Cereghetti et al., 2008). Esta fosforilación tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de DRP-1, ya que impide las interacciones intramoleculares entre los dominios GED y GTPasa de esta proteína, disminuyendo así su capacidad hidrolítica de GTP (Chang & Blackstone, 2007). Esta fosforilación es revertida por la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina, lo cual favorece el proceso de fisión mitocondrial (Cribbs & Strack, 2007; Cereghetti et al., 2008). De acuerdo a estas evidencias, la modulación de las actividades tanto de PKA como de calcineurina podrían afectar el estado de fosforilación de DRP-1 y, por ende, su actividad. De manera interesante, en una línea celular de células β -pancreáticas, el tratamiento con agentes quelantes de calcio y bloqueadores de los canales de calcio tipo L protegieron frente a la apoptosis inducida por palmitato (Choi et al., 2007). El mecanismo de esta protección parece estar relacionado específicamente con la actividad de calcineurina, ya que su inhibición química fue asociada con la protección frente a la lipotoxicidad por palmitato (Choi et

al., 2007). Esta evidencia sugiere que en nuestro modelo palmitato también podría mediar la activación de calcineurina, llevando a una disminución de la fosforilación de DRP-1, su consecuente activación y posterior inducción de fisión mitocondrial. Aportando un mecanismo para la activación de DRP-1 mediada por palmitato.

Por otra parte, se sabe que el control morfológico mitocondrial no sólo depende de la actividad de las proteínas de fisión y fusión, sino que también puede ser modulado por cambios en las tasas de biogénesis y mitofagia (Diaz & Moraes, 2008). En nuestras condiciones, palmitato no modificó la masa mitocondrial evaluada mediante la expresión de la proteína mitocondrial HSP70 (**Figura 11**). Lo que apoya la idea de que los cambios morfológicos observados dependen de la actividad de las proteínas de fisión mitocondrial.

7.3. Disfunción mitocondrial por palmitato

Los efectos palmitato sobre el metabolismo energético de los cardiomiocitos han sido previamente reportados (Hickson-Bick et al., 2000), así como sus efectos en la sobrevivencia celular (Kong & Rabkin, 2000; Hickson-Bick et al., 2002). El tratamiento con palmitato se ha asociado con muerte celular por apoptosis, la que es precedida por disfunción mitocondrial (Hickson-Bick et al., 2000; Sparagna et al., 2000). Para corroborar esta posibilidad, en esta tesis

se evaluó una serie de parámetros funcionales del metabolismo mitocondrial y la sobrevivencia celular en condiciones de sobrecarga por palmitato. En relación a los efectos de palmitato sobre la función mitocondrial, se encontró que la concentración elevada (25 nM) indujo pérdida del Ψ_{mt} (**Figura 16**), disminución de los niveles intracelulares de ATP (**Figura 17**) y disminución del consumo de oxígeno (**Figura 18**). Estos resultados sugieren un estado de disfunción mitocondrial y colapso metabólico, asociado a la fisión mitocondrial descrita (**Figura 6**). De manera similar a lo descrito previamente (Dyntar et al., 2001; Hickson-Bick et al., 2002), palmitato disminuyó la viabilidad celular evaluada por incorporación de PI (**Figura 21**), marcador de muerte por necrosis, y aumentó la muerte celular por apoptosis (**Figura 22**), evaluada como fragmentación del DNA. Estos resultados se observaron a tiempos largos (24 h) y concuerdan con los estudios previos (Dyntar et al., 2001; Hickson-Bick et al., 2002). De manera interesante, los cambios morfológicos y metabólicos, a excepción de la disminución en el Ψ_{mt} , se observaron a tiempos tempranos (3 h), sugiriendo que estas alteraciones podrían actuar predisponiendo a los cardiomiocitos para la muerte.

La disfunción mitocondrial se ha correlacionado con aumentos en la producción de EROs en diversos escenarios (Yu et al., 2006; Paradies et al., 2010), al igual que la toxicidad por palmitato (Nakamura et al., 2009; Yuzefovych et al., 2012), por lo que se evaluó la generación de EROs en nuestras condiciones experimentales. Al evaluar la producción de EROs

mediante citometría de flujo, no se detectaron cambios en las células tratadas con palmitato. Si bien esto podría parecer contra intuitivo, en el exhaustivo estudio de Hickson-Bick y colaboradores (Hickson-Bick et al., 2002) se describió, usando metodologías similares a la utilizada en esta tesis y un gran número de ensayos más específicos, que palmitato no genera aumentos de EROs en cardiomiocitos neonatales y que la apoptosis observada depende de mecanismos diferentes (Hickson-Bick et al., 2002).

En relación a la temporalidad de los efectos, en esta tesis describimos que la fisión y disfunción mitocondrial ocurren simultáneamente a tiempos tempranos. Sin embargo, entre las 0 y 3 h de tratamiento con palmitato no se evaluó cual evento ocurre primero ni tampoco cual fue el tiempo mínimo necesario para comprometer a las células en el fenotipo descrito. Palmitato tiene una serie de efectos celulares, algunos de ellos rápidos en la escala de minutos y otros más lentos como los aquí descritos. De manera interesante, en una línea celular de cáncer mamario humano se describió que estearato aumenta la localización de Anexina II en la fracción de membrana resistente a detergente en forma concentración- y tiempo-dependiente (Zhao & Hardy, 2004). Esta respuesta es reversible, alcanzando un máximo a los 30 min de tratamiento y volviendo a los niveles iniciales entre las 5 y las 10 h. Es posible que algunos efectos de palmitato en nuestras condiciones de trabajo puedan comportarse de manera similar, especialmente aquellos que dependan de la

generación de otros intermediarios como ceramidas. Esta posibilidad, sin embargo, requiere de futuros estudios para ser corroborada.

7.4. Palmitato, síntesis de ceramidas y fisión mitocondrial

Los mecanismos por los cuales palmitato podrían activar la maquinaria de fisión mitocondrial son actualmente desconocidos. Sin embargo, palmitato es sustrato preferencial para la síntesis *de novo* de ceramidas (Summers, 2006). En nuestras condiciones palmitato efectivamente aumentó la generación de intermediarios de la vía de síntesis de ceramidas (**Figura 20**), específicamente C16-ceramida y el precursor esfinganina determinados por espectroscopía de masa. Se ha descrito que las ceramidas inducen disfunción mitocondrial inhibiendo el complejo III de la cadena transportadora de electrones y aumentando la producción de EROs (Summers, 2006). Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que C2-ceramida induce fisión mitocondrial y translocación de DRP-1 hacia la mitocondria en cardiomiocitos de rata (Parra et al., 2007). De manera más reciente, nuestro grupo describió que C2-ceramida induce aumentos en los niveles de calcio intracelular en los cardiomiocitos, lo que se asocia con los cambios metabólicos y muerte celular (Parra et al, 2013a). De hecho, la utilización de agentes quelantes de Ca^{2+} protegió frente a la inducción de fisión mitocondrial, mantuvo los niveles intracelulares de ATP y retardó la muerte inducida por ceramidas (Parra et al,

2013a). Estas evidencias llevan a proponer que una de las vías por las cuales palmitato induciría la fisión mitocondrial, en nuestras condiciones experimentales podría incluir la generación de ceramidas, activación de calcineurina y desfosforilación y activación de DRP-1. En esta línea, en nuestro laboratorio exploró la participación de ceramidas en la resistencia a la insulina en cardiomiocitos (López-Crisosto, 2012) y la relación entre palmitato y la síntesis *de novo* de ceramidas. La inhibición de la ceramida sintasa por fumonisina B1 previno la fragmentación mitocondrial dependiente de palmitato (López-Crisosto, 2012). Estos resultados apoyan la idea de que el mecanismo de fisión mitocondrial por palmitato requiere, al menos parcialmente, de la generación de ceramidas.

7.5. TMZ y fusión mitocondrial

Hasta la fecha no existe información disponible acerca de los efectos que TMZ podría ejercer sobre la morfología mitocondrial en ningún modelo celular. En esta tesis se describió una marcada fusión mitocondrial inducida por dosis bajas de TMZ (1 μ M, 24 h) evidenciada por una disminución significativa en el número de mitocondrias por células, junto con un aumento del volumen mitocondrial promedio (**Figura 23**). Este efecto morfológico ocurrió en ausencia de modificaciones en los niveles de las proteínas de fisión mitocondrial (**Figura 24**), fusión mitocondrial (**Figura 25**) o marcadores de masa

mitocondrial (**Figura 26**). En la literatura se acepta actualmente que la regulación de la función de las proteínas de dinámica mitocondrial ocurre, en general, por cambios en su actividad mediante modificaciones post-transduccionales, más que por cambios en sus niveles de expresión (Kuzmicic et al., 2011; Parra et al., 2011). Como se mencionó anteriormente, DRP-1 ha focalizado la atención debido al alto número de modificaciones post-transduccionales que regulan su actividad de fisión mitocondrial (Chang & Blackstone, 2007; Chou et al., 2012). Recientemente, se describió un nuevo sitio de fosforilación de DRP-1 mediado por la glicógeno sintasa kinasa 3 β (GSK3 β) que inhibe la actividad GTPasa de DRP-1, bloqueando su función y promoviendo la elongación mitocondrial en líneas celulares humanas (Chou et al., 2012). La utilización de modelos renales de isquemia han mostrado que TMZ promueve la fosforilación de GSK3 β , lo que se relaciona con protección renal frente a la isquemia al prevenir el daño mitocondrial (Mahfoudh-Boussaid et al., 2012). Esta conexión podría proveer un posible mecanismo mediante el cual explicar la fusión mitocondrial observada con TMZ en nuestras condiciones. Sin embargo, el análisis de la activación de GSK3 β en nuestro modelo no se evaluó y futuras investigaciones deberían investigar esta posibilidad.

La fusión mitocondrial observada no siguió un comportamiento dosis-dependiente en las condiciones evaluadas. El mecanismo específico de fusión mitocondrial por TMZ no ha sido descrito en la literatura ni fue dilucidado en

este trabajo, por lo que la relación entre TMZ y el control morfológico mitocondrial podría incluir varios eventos de señalización intracelular, disipando el efecto dosis-dependiente sobre la fusión. De acuerdo al blanco farmacológico propuesto para la TMZ (Kantor et al., 2000), y lo descrito actualmente en la literatura sobre regulación de la maquinaria de fusión y fisión mitocondrial (Kuzmicic et al., 2011), es poco probable que la inhibición de la 3-CAT modifique directamente a las proteínas de morfología mitocondrial. Sin embargo, estos efectos no han sido descritos. Los resultados de fusión mitocondrial por TMZ descansan exclusivamente sobre hallazgos morfológicos mediante técnicas de microscopía de fluorescencia (**Figura 23**), a diferencia de lo descrito para palmitato mediante morfología (**Figura 6**) y traslocación de DRP-1 (**Figura 8**). A pesar de no contar con metodologías complementarias para apoyar los resultados de fusión mitocondrial, la experiencia de nuestro laboratorio sugiere que existe una fuerte correlación entre los datos obtenidos mediante microscopía confocal y microscopía electrónica (Parra et al., 2013b, Zepeda, 2012), lo que apoya indirectamente la metodología utilizada.

7.6. Potenciación metabólica por TMZ

Los efectos metabólicos de TMZ han sido extensamente estudiados en diferentes modelos celulares y animales de hipoxia (Guarnieri & Muscari, 1988; Morillas Blasco et al., 2005). TMZ disminuye la actividad del complejo I de la

cadena transportadora de electrones (Veitch et al., 1995), disminuyendo el consumo de oxígeno (Guarnieri & Muscari, 1990b), la producción de EROs (Guarnieri & Muscari, 1988), lo que incrementa la integridad mitocondrial (Morillas Blasco et al., 2005) probablemente debido a una disminución en la apertura del poro de transición mitocondrial (Argaud et al., 2005) y la consecuente apoptosis (Argaud et al., 2005). Sin embargo, nuestros hallazgos apuntan en la dirección opuesta. En esta tesis se describe que TMZ potencia el metabolismo mitocondrial. De manera concordante con los hallazgos morfológicos con TMZ (**Figura 23**), la misma concentración que indujo fusión mitocondrial también aumentó el Ψ_{mt} (**Figura 27**), los niveles intracelulares de ATP (**Figura 28**) y en el consumo de oxígeno basal y máximo (**Figura 29**). El movimiento de electrones a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial se asocia con el bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana (Brand & Nicholls, 2011). La acumulación de protones en este espacio establece una fuerza protón-motriz, la que es utilizada por la ATP sintasa mitocondrial para fosforilar ADP (Cheng et al., 2010; Brand & Nicholls, 2011). El potencial redox máximo disponible para catalizar esta serie de reacciones corresponde a unos 1.100 mV, mientras que el máximo Ψ_{mt} corresponde a unos 180-220 mV en condiciones normales (Brand & Nicholls, 2011). Se ha registrado que los cambios en Ψ_{mt} durante transiciones en el metabolismo mitocondrial oscila entre un 10 a un 20% en ambos sentidos (Nicholls, 1974) y los mecanismos de control de la función

mitocondrial operan ajustando el flujo de electrones de la cadena y la reentrada de protones a la matriz, para mantener la fuerza protón-motriz constante (Brand & Nicholls, 2011). Por lo tanto, el aumento de Ψ_{mt} discreto observado con TMZ (**Figura 27**), obedece a la naturaleza de la función mitocondrial y está en el rango de magnitudes descritas en la literatura. Además, considerando que el aumento de Ψ_{mt} se vio acompañado de un incremento similar en los demás parámetros de función mitocondrial medidos (consumo de oxígeno y ATP), estos resultados se apoyan entre sí para sugerir un aumento en la función mitocondrial dependiente del tratamiento con TMZ.

Estos resultados parecen contra intuitivos para una droga que se caracteriza por inhibir la β ox (Kantor et al., 2000) en un modelo celular altamente dependiente de la oxidación de lípidos para su metabolismo (Lopaschuk et al., 2010). No obstante, TMZ se asocia con aumentos intramitocondriales de Ca^{2+} (Guarnieri et al., 1997), lo que se sabe favorece la actividad de algunas deshidrogenasas pertenecientes al ciclo de Krebs y potencia la síntesis de ATP (Cárdenas et al., 2010) al aumentar el flujo de carbono en el ciclo, entregando mayor cantidad de equivalentes reductores a la cadena transportadora. De hecho, en modelos animales se ha mostrado que la administración de TMZ aumenta la afinidad mitocondrial por ADP y también la actividad de la creatina kinasa (Kantor et al., 2000).

La actividad de TMZ se asocia con un cambio de preferencias en el sustrato metabólico hacia la glucosa. La mayoría de los estudios que han mostrado este efecto se realizaron en condiciones de IC o isquemia (Fragasso et al., 2003; Di Napoli et al., 2005; Zhang et al., 2012), por lo que la perfusión o el suministro de nutrientes corresponden a factores limitantes. Sin embargo, en nuestras condiciones de cultivo, el oxígeno y la glucosa se encuentran presentes en abundancia para la célula, por lo que un cambio de preferencia de sustrato hacia un metabolismo más dependiente de la glicólisis, podría verse acompañado de aumentos en la producción de ATP y en el consumo de oxígeno si la glucosa es oxidada por la vía mitocondrial. A pesar de que la acción de TMZ sobre la β ox es controversial, ya que el grupo de (MacInnes et al., 2003) describió que TMZ no bloquea la 3-CAT, la evidencia experimental aún soporta la tesis del cambio metabólico inducido por TMZ (Kantor et al., 2000; Nowak et al., 2006; Bucci et al., 2012). En estudios animales, TMZ estimula la captación de glucosa en cerebros de rata (Nowak et al., 2006). Además, en el estudio reciente de Bucci (Bucci et al., 2012) demostraron elegantemente que TMZ disminuye la β ox cardiaca, aumenta la oxidación de glucosa y mejora la eficiencia mecánica en pacientes obesos (Bucci et al., 2012), apoyando la tesis del cambio de sustrato metabólico.

7.7. Efecto protector de TMZ sobre la lipotoxicidad por palmitato

Tal como se mencionó anteriormente, palmitato indujo fisión y disfunción mitocondrial, mientras que TMZ generó los efectos opuestos (fusión y potenciación metabólica). Considerando estos resultados, se evaluó la posible protección frente a la lipotoxicidad por palmitato al preincubar los cardiomiocitos con TMZ. Respecto a los efectos morfológicos, TMZ preservó la morfología mitocondrial frente a la fisión inducida por palmitato (**Figura 30**). Este efecto también se reflejó en los cambios metabólicos, ya que el pretratamiento con TMZ evitó la disminución de los niveles intracelulares de ATP (**Figura 31**) y del consumo de oxígeno (**Figura 32**) dependientes de palmitato. Estos hallazgos nuevamente sugieren una estrecha relación entre el control de la morfología y de la función de las mitocondrias. Estos resultados son similares a los descritos por Molina y colaboradores (Molina et al., 2009), donde muestran una protección celular frente a los daños causados por exceso de nutrientes al conservar la morfología mitocondrial y evitar la fisión (Molina et al., 2009). Similarmente, en células musculares esqueléticas, la protección frente a la fisión mitocondrial inducida por palmitato, mediante herramientas químicas y genéticas, permite conservar la función del organelo y la sensibilidad celular a insulina (Jheng et al., 2011).

7.8. Relación entre TMZ y la acumulación de lípidos neutros

En el corazón adulto, aproximadamente el 70% del total de ATP generado proviene de la β ox (Neely & Morgan, 1974). Los cardiomiocitos tienen una baja capacidad de almacenamiento de lípidos, por lo que dependen del transporte de AGLs hacia la célula para suplir sus demandas energéticas (Lopaschuk et al., 2010). Al analizar la acumulación intracelular de lípidos, mediante la sonda LipidTOX, no se encontraron mayores depósitos de lípidos neutros en los cardiomiocitos en condiciones basales (**Figura 33**). Sin embargo, TMZ cambió este patrón de forma significativa. Incluso en ausencia de palmitato, el número y área de gotas de lípidos aumentaron dramáticamente en respuesta a TMZ (**Figura 33**). En la literatura hay evidencias de que TMZ podría actuar a través de la inhibición de la CPT-1 (Hamdan et al., 2001), lo que impediría la incorporación de AGLs a la mitocondria en el paso limitante de la β ox, posiblemente promoviendo el almacenamiento de lípidos. En un estudio clínico reciente se determinó que TMZ promueve la oxidación de glucosa al disminuir la tasa de esterificación de lípidos en pacientes obesos (Bucci et al., 2011). De manera similar, en otro estudio clínico TMZ redujo la β ox cardiaca al disminuir la contribución derivada de lípidos intracelulares a la tasa de β ox total, sin alterar la contribución de lípidos extracelulares (Bucci et al., 2012). Estos hallazgos apoyan nuestros resultados de aumento de la acumulación intracelular de lípidos. En esta misma línea, se ha mostrado en hepatocitos que el tratamiento con palmitoleato tiene un efecto protector sobre la apoptosis

inducida por palmitato al aumentar la esterificación del exceso de lípidos en depósitos metabólicamente neutros (Akazawa et al., 2010), similar a los efectos de TMZ en cardiomiocitos. A fin de evaluar con mayor profundidad el papel protector del aumento de la esterificación de lípidos inducida por TMZ, se decidió reevaluar los resultados de producción de ceramidas inducida por palmitato, pero en presencia de TMZ. De manera interesante, el rol protector de TMZ se asoció a una disminución en la producción intracelular de esfingosina evaluada mediante inmunofluorescencia indirecta (**Figura 34**). En conjunto, estos resultados sugieren que la cardioprotección observada con TMZ podría estar asociada con la menor disponibilidad de palmitato para la síntesis de intermediarios celulares tóxicos como las ceramidas.

7.9. Lipotoxicidad

Patologías como el síndrome metabólico y la obesidad están caracterizadas por un desbalance en la ingesta y el gasto de energía, lo que se asocia con deposición ectópica de lípidos en tejidos como el páncreas, riñones, vasos sanguíneos y musculatura esquelética y cardíaca (Wende & Abel, 2010). Se ha propuesto que los tejidos pueden acumular inicialmente este exceso de energía en forma de TAG, pero eventualmente los lípidos son derivados hacia vías no oxidativas, generando especies tóxicas y alterando la señalización celular (Yang & Barouch, 2007), promoviendo disfunción mitocondrial (Bugger

& Abel, 2008) y muerte (Unger & Orci, 2002). Sin embargo, el orden de progresión de estos procesos no está claramente dilucidado y varía dependiendo de la composición lipídica y los modelos utilizados (Wende & Abel, 2010). En corazón, se ha propuesto que el estrés de retículo (Borradaile et al., 2006) y la disfunción mitocondrial (Buchanan et al., 2005) participan en la lipotoxicidad, a través de la generación de diversos mediadores como EROs (Listenberger et al., 2001; Wende & Abel, 2010), NO (Shimabukuro et al., 1997), ceramidas (Summers, 2006), la fosfoinositol 3-kinasa (Wende & Abel, 2010) y algunas adipokinas (Wende & Abel, 2010). Sin embargo, el rol de estos mediadores en la progresión de la lipotoxicidad es materia de debate ya que en la participación o el orden de aparición varía con los modelos y las condiciones experimentales (ver Wende & Abel, 2010). Si bien la relación entre la generación de ceramidas y la muerte celular ha sido ampliamente establecida (Parra et al., 2007; Wende & Abel, 2010; Parra, et al., 2013b) su relación con la disfunción mitocondrial no es tan sencilla. En cardiomiocitos neonatales se ha sugerido que la acumulación de ceramidas ocurre posterior a la disfunción mitocondrial, liberación de citocromo c y de la muerte celular (Sparagna et al., 2000). Por otro lado, la inducción de disfunción mitocondrial por reducción de la actividad de CTP-1 incrementa la producción de ceramidas vía palmitoil-CoA (Paumen et al., 1997), sugiriendo una relación inversa entre estos procesos. En nuestras condiciones de trabajo, la producción de ceramidas fue observada en paralelo con la disfunción mitocondrial. Sin embargo, la aparición de ceramidas

a tiempos mas tempranos (entre 0 y 3 h) no fue evaluada, por lo que el orden específico de aparición de ambos fenómenos quedó indeterminado.

7.10. Modelo propuesto y proyecciones

En las últimas décadas se ha relacionado los cambios en la morfología mitocondrial con la enfermedad cardiaca. Las observaciones iniciales mostraron que un gran número de mutaciones en proteínas mitocondriales eran consistentemente descritas en diversas formas de cardiomiopatías dilatadas familiares (Kuzmicic et al., 2011). Recientemente estudios en cardiomiopatía dilatada, corazón hibernado, isquemia, hipertrofia cardiaca e IC convergen en un fenotipo de mitocondrias pequeñas y desorganizadas (Kuzmicic et al., 2011). A pesar de esta evidencia, aún no contamos con un modelo integrado en el cual la dinámica mitocondrial haya sido incorporada en la fisiología cardiaca normal. Sin embargo, se estima que las mitocondrias juegan un papel esencial en la flexibilidad metabólica, y existe consenso de que las alteraciones en la dinámica mitocondrial participan en la progresión de la enfermedad cardiaca (Kuzmicic et al., 2011). El desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas dirigidas a la manipulación de la dinámica mitocondrial podrían resultar en una contribución relevante y complementaria a la terapia actual para la IC, junto con otras enfermedades cardiacas.

Este estudio corresponde al primer estudio tanto de los efectos de palmitato como los de TMZ sobre la morfología de la red mitocondrial del cardiomiocito. Los datos presentados en este trabajo indican que palmitato produce fisión y disfunción mitocondrial, que preceden a la muerte celular, mediante la activación de la maquinaria de fisión mitocondrial. Paralelamente, en esta tesis describimos que TMZ tiene los efectos opuestos sobre la mitocondria, es decir promueve la fusión mitocondrial y el potencia el metabolismo. De manera interesante, describimos que el pretratamiento de los cardiomiocitos con TMZ protege de los efectos tempranos de palmitato, al conservar la morfología mitocondrial y prevenir el colapso metabólico mediante la redirección del exceso de palmitato hacia depósitos intracelulares de lípidos neutros (ver modelo propuesto en **Figura 35**).

Si bien la mayoría de los resultados aquí obtenidos son de carácter descriptivo, tienen el mérito de extender los mecanismos de acción tanto de palmitato como de TMZ. Estos hallazgos permitirán comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a escenarios de glucolipototoxicidad, como lo observado en diabetes o IC. Además, aportarán nuevas luces al mecanismo de acción de un fármaco actualmente utilizado en clínica, con evidentes efectos beneficiosos en el tratamiento de la IC y cuyo mecanismo sigue siendo materia de discusión en la literatura actual.

Es evidente que la investigación cardiológica actual requiere del desarrollo de nuevas terapias y del descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos, por lo que el trabajo aquí desarrollado requiere de futuros investigadores que contribuyan a extender los hallazgos aquí descritos. Los resultados expuestos sugieren una nueva vía de acción para la TMZ, pero los mecanismos específicos que relacionen a la TMZ con el control morfológico mitocondrial requieren ser estudiados en profundidad.

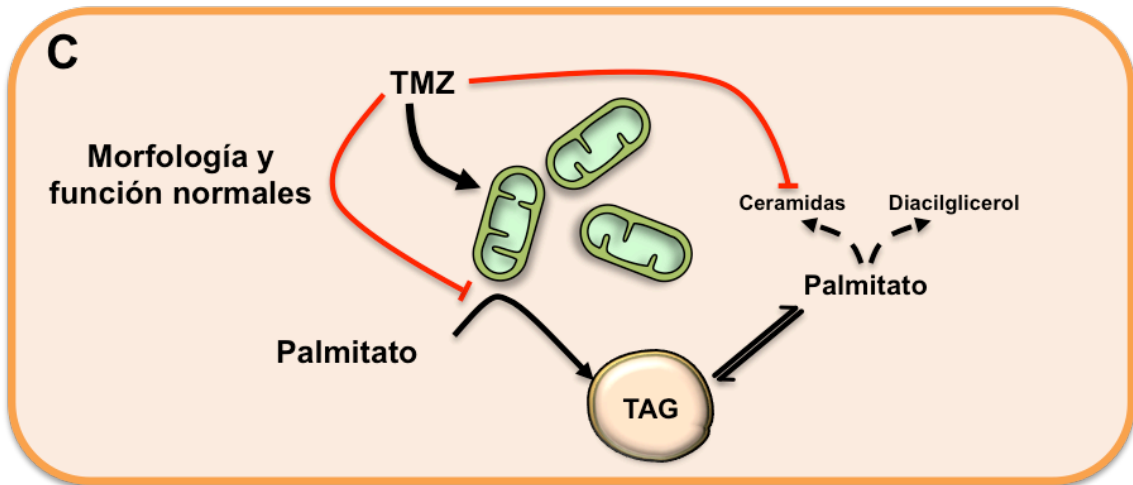
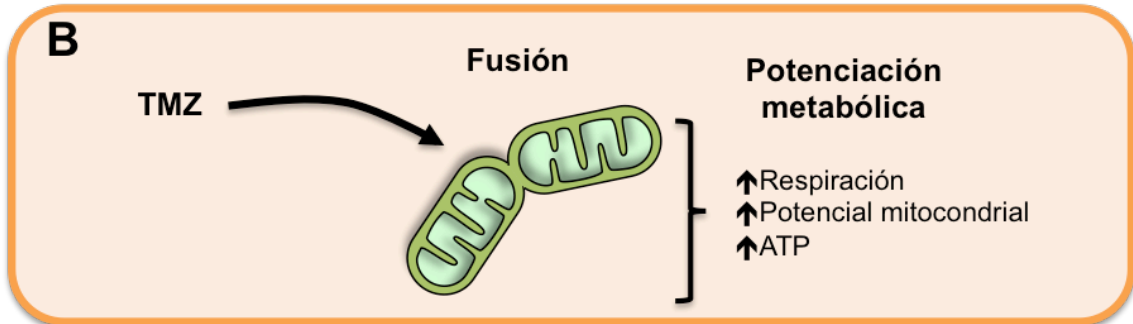
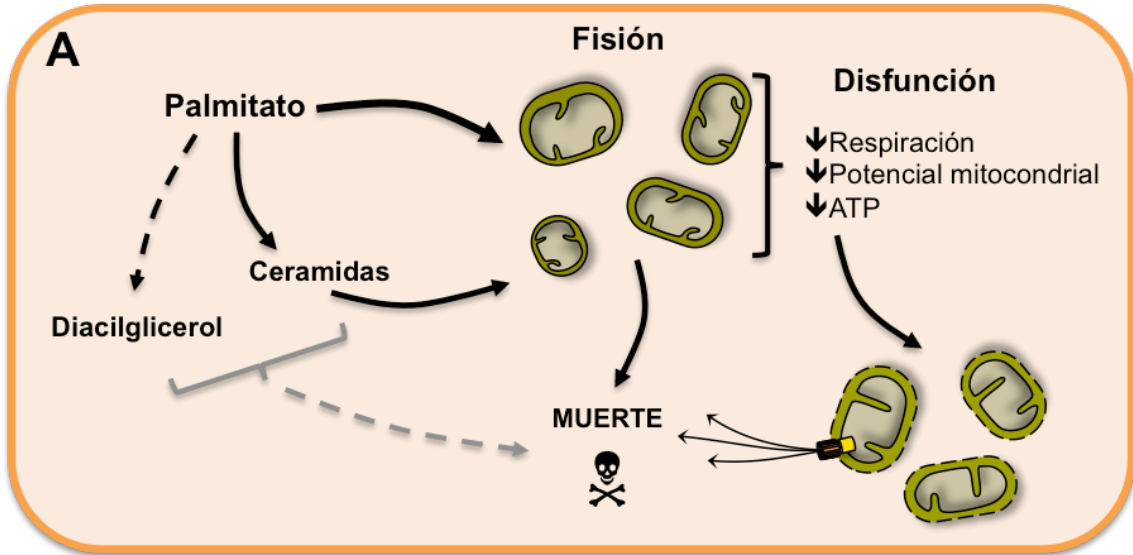


Figura 35. Modelo propuesto: Regulación de la morfología y función mitocondrial en respuesta a palmitato, TMZ y efecto protector de TMZ frente a palmitato. (A) La sobrecarga celular con palmitato gatilla fisión y disfunción mitocondrial por mecanismos no completamente dilucidados, pero con la posible contribución de la generación de intermediarios secundarios como ceramidas y diacilglicerol. La fisión mitocondrial predispondría las mitocondrias hacia un fenotipo menos funcional, evidenciado por una disminución de los parámetros de respiración celular, generación de ATP y potencial mitocondrial. Estos efectos llevarían a aumentar la permeabilidad mitocondrial, lo que liberaría factores proapoptóticos, los que contribuiría a la muerte celular observada a tiempos tardíos. **(B)**, TMZ ejerce efectos opuestos a los observados con palmitato, induciendo fusión mitocondrial lo que se correlaciona con un estado más activo de las mitocondrias y una potenciación metabólica evidenciada por un aumento de los parámetros de respiración celular, producción de ATP y potencial mitocondrial. Los mecanismos subyacentes a estos efectos son desconocidos. **(C)** Modelo de integración de ambos estímulos. La presencia de TMZ antes de la aparición de palmitato predispondría a las mitocondrias hacia un estado fusionado y más activo, lo que finalmente preserva la morfología mitocondrial en presencia de palmitato y protege del colapso metabólico. La acción de TMZ además permitiría redirigir el exceso de palmitato desde la mitocondria hacia depósitos de lípidos neutros, secuestrando el palmitato en un depósito menos activo, lo que disminuiría la capacidad de generar intermediarios tóxicos como ceramidas o diacilglicerol.

8. CONCLUSIONES

1. Palmitato indujo fisión y disfunción mitocondrial a tiempos cortos, junto con aumentar la producción de ceramidas e intermediarios de la vía de síntesis *de novo* de ceramidas.
2. La fisión mitocondrial inducida por palmitato es dependiente de la activación y translocación de DRP-1 hacia la mitocondria, lo cual ocurre sin cambios en los niveles de expresión de ninguna de las proteínas de dinámica mitocondrial o masa mitocondrial evaluadas.
3. Palmitato estimuló muerte celular por necrosis y apoptosis a tiempos tardíos. Sin embargo, la fisión y disfunción mitocondrial observadas ocurrieron previo a la detección de muerte con significancia estadística.
4. TMZ indujo fusión mitocondrial y potenció el metabolismo mitocondrial a las 24 h y concentración baja (1 μ M).
5. Los efectos morfológicos de TMZ ocurrieron sin cambios en los niveles de expresión de las proteínas de dinámica mitocondrial o masa mitocondrial evaluadas, a través de un mecanismo de acción no dilucidado.

6. Los efectos positivos de TMZ sobre la morfología y función mitocondrial protegieron a los cardiomiocitos frente al daño lipotóxico por palmitato al conservar la morfología mitocondrial intacta y evitar la pérdida de ATP y la caída en el consumo de oxígeno inducidas por palmitato.

7. La protección observada por TMZ ocurrió asociada a un incremento en la acumulación de lípidos neutros en depósitos intracelulares, posiblemente impidiendo la utilización de palmitato para la generación de intermediarios secundarios tóxicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abozguia, K., Clarke, K., Lee, L., Frenneaux, M., 2006. Modification of myocardial substrate use as a therapy for heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3, 490–498.
- Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J.L., Elmi, N., Bronk, S.F., Kohno, S., Charlton, M.R., Gores, G.J., 2010. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J. Hepatol.* 52, 586–593.
- Alaoui-Talibi, El, Z., Guendouz, A., Moravec, M., Moravec, J., 1997. Control of oxidative metabolism in volume-overloaded rat hearts: effect of propionyl-L-carnitine. *Am J Physiol* 272, H1615–H1624.
- Allibardi, S., Chierchia, S.L., Margonato, V., Merati, G., Neri, G., Dell'Antonio, G., Samaja, M., 1998. Effects of trimetazidine on metabolic and functional recovery of posts ischemic rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 12, 543–549.
- Araya-Maturana, R., Cardona, W., Cassels, B.K., Delgado-Castro, T., Ferreira, J., Miranda, D., Pavani, M., Pessoa-Mahana, H., Soto-Delgado, J., Weiss-López, B., 2006. Effects of 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 4664–4669.
- Araya-Maturana, R., Delgado-Castro, T., Gárate, M., Ferreira, J., Pavani, M., Pessoa-Mahana, H., Cassels, B.K., 2002. Effects of 4,4-Dimethyl-5,8-dihydroxynaphtalene-1-one and 4,4-Dimethyl-5,8-dihydroxytetralone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 3057–3060.
- Argaud, L., Gomez, L., Gateau-Roesch, O., Couture-Lepetit, E., Loufouat, J., Robert, D., Ovize, M., 2005. Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia–reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39, 893–899.
- Ashrafian, H., Frenneaux, M.P., Opie, L.H., 2007. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation* 116, 434–448.
- Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H., Manco, M., Calvani, M., Castagneto, M., Palacín, M., Mingrone, G., Zierath, J.R., Vidal, H., Zorzano, A., 2005. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54, 2685–2693.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., Zorzano, A., 2003. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and

- mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190–17197.
- Beltrami, C.A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G.A., Puricelli, C., Cigola, E., Sonnenblick, E.H., Olivetti, G., Anversa, P., 1995. The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol* 27, 291–305.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., Rossignol, R., 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of Cell Science* 120, 838–848.
- Benard, G., Bellance, N., Jose, C., Melser, S., Nouette-Gaulain, K., Rossignol, R., 2010. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 698–709.
- Blachnio-Zabielska, A., Koutsari, C., Tchkonina, T., Jensen, M., 2012a. Sphingolipid content of human adipose tissue: relationship to adiponectin and insulin resistance. *Obesity* 20, 2341–2347.
- Blachnio-Zabielska, A.U., Persson, X.-M.T., Koutsari, C., Zabielski, P., Jensen, M.D., 2012b. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for measuring the in vivo incorporation of plasma free fatty acids into intramyocellular ceramides in humans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26, 1134–1140.
- Borradaile, N.M., Han, X., Harp, J.D., Gale, S.E., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2006. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *The Journal of Lipid Research* 47, 2726–2737.
- Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M.J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R., Lipton, S.A., 2003. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 15, 706–716.
- Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 297–312.
- Bravo, R., Vicencio, J.M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J.P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, A.E., Verdejo, H.E., Ferreira, J., Iglewski, M., Chiong, M., Simmen, T., Zorzano, A., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Szabadkai, G., Lavandero, S., 2011. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *Journal of Cell Science* 124, 2143–2152.
- Brottier, L., Barat, J.L., Combe, C., Boussens, B., Bonnet, J., Bricaud, H., 1990. Therapeutic value of a cardioprotective agent in patients with severe ischaemic cardiomyopathy. *European Heart Journal* 11, 207–212.
- Bucci, M., Borra, R., Någren, K., Maggio, R., Tuunanen, H., Oikonen, V., Del Ry, S., Viljanen, T., Taittonen, M., Rigazio, S., Giannessi, D., Parkkola, R., Knuuti, J.,

- Nuutila, P., Iozzo, P., 2011. Human obesity is characterized by defective fat storage and enhanced muscle fatty acid oxidation, and trimetazidine gradually counteracts these abnormalities. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 301, E105–12.
- Bucci, M., Borra, R., Nägren, K., Pärkkä, J.P., Del Ry, S., Maggio, R., Tuunanen, H., Viljanen, T., Cabiati, M., Rigazio, S., Taittonen, M., Pagotto, U., Parkkola, R., Opie, L.H., Nuutila, P., Knuuti, J., Iozzo, P., 2012. Trimetazidine reduces endogenous free fatty acid oxidation and improves myocardial efficiency in obese humans. *cardiovasc ther* 30, 333–341.
- Buchanan, J., Mazumder, P.K., Hu, P., Chakrabarti, G., Roberts, M.W., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Litwin, S.E., Abel, E.D., 2005. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 146, 5341–5349.
- Bugger, H., Dale Abel, E., 2008. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clinical Science* 114, 195.
- Capaldi, R., Halphen, D., Zhang, Y., Yanamura, W., 1988. Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain. *J Bioenerg Biomembr* 20, 291–311.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Runswick, M.J., Shannon, R.J., Hirst, J., Walker, J.E., 2005. The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol. Cell Proteomics* 4, 693–699.
- Cárdenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K.-H., Yang, J., Parker, I., Thompson, C.B., Birnbaum, M.J., Hallows, K.R., Foskett, J.K., 2010. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell* 142, 270–283.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., Scorrano, L., 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 15803–15808.
- Chang, C.-R., Blackstone, C., 2007. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* 282, 21583–21587.
- Chang, C.-R., Blackstone, C., 2010. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Chang & Blackstone 1201, 34–39.
- Chen, H., Chan, D.C., 2009. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Human Molecular Genetics* 18, R169–

R176.

- Chen, H., Chomyn, A., Chan, D.C., 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* 280, 26185–26192.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., Chan, D.C., 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189–200.
- Cheng, Z., Tseng, Y., White, M.F., 2010. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 589–598.
- Chien, K.R., Knowlton, K.U., Zhu, H., Chien, S., 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *The FASEB Journal* 5, 3037–3046.
- Choi, S.-E., Kim, H.-E., Shin, H.-C., Jang, H.-J., Lee, K.-W., Kim, Y., Kang, S.S., Chun, J., Kang, Y., 2007. Involvement of Ca²⁺-mediated apoptotic signals in palmitate-induced MIN6N8a beta cell death. *Molecular and Cellular Endocrinology* 272, 50–62.
- Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., Frohman, M.A., 2006. A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 8, 1255–1262.
- Chou, C.-H., Lin, C.-C., Yang, M.-C., Wei, C.-C., Liao, H.-D., Lin, R.-C., Tu, W.-Y., Kao, T.-C., Hsu, C.-M., Cheng, J.-T., Chou, A.-K., Lee, C.-I., Loh, J.-K., Howng, S.-L., Hong, Y.-R., 2012. GSK3beta-mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLoS ONE* 7, e49112.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L., De Strooper, B., 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163–175.
- Cribbs, J.T., Strack, S., 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO reports* 8, 939–944.
- D'hahan, N., Taouil, K., Dassouli, A., Morel, J.E., 1997. Long-term therapy with trimetazidine in cardiomyopathic Syrian hamster BIO 14:6. *European Journal of Pharmacology* 328, 163–174.
- D'hahan, N., Taouil, K., Janmot, C., Morel, J.E., 1998. Effect of trimetazidine and verapamil on the cardiomyopathic hamster myosin phenotype. *Br. J. Pharmacol.* 123, 611–616.

- Dalmonte, M.E., Forte, E., Genova, M.L., Giuffrè, A., Sarti, P., Lenaz, G., 2009. Control of respiration by cytochrome c oxidase in intact cells: role of the membrane potential. *Journal of Biological Chemistry* 284, 32331–32335.
- Das, T.K., Pecoraro, C., Tomson, F.L., Gennis, R.B., Rousseau, D.L., 1998. The post-translational modification in cytochrome c oxidase is required to establish a functional environment of the catalytic site. *Biochemistry* 37, 14471–14476.
- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E., Votruba, M., 2007. Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Human Molecular Genetics* 16, 1307–1318.
- de Leiris, J., Boucher, F., 1993. Rationale for trimetazidine administration in myocardial ischaemia–reperfusion syndrome. *European Heart Journal* 14, 34–40.
- De Vries, J.E., Vork, M.M., Roemen, T.H., de Jong, Y.F., Cleutjens, J.P., van der Vusse, G.J., van Bilsen, M., 1997. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Lipid Research* 38, 1384–13841394.
- Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., Hamel, C.P., 2001. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum. Genet.* 109, 584–591.
- Dhalla, N.S., Saini-Chohan, H.K., Rodriguez-Leyva, D., Elimban, V., Dent, M.R., Tappia, P.S., 2009. Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Cardiovascular Research* 81, 429–438.
- Di Napoli, P., Taccardi, A.A., Barsotti, A., 2005. Long term cardioprotective action of trimetazidine and potential effect on the inflammatory process in patients with ischaemic dilated cardiomyopathy. *Heart* 91, 161–165.
- Diaz, F., Moraes, C.T., 2008. Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* 44, 24–35.
- Duchen, M.R., 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular aspects of medicine* 25, 365–451.
- Dyntar, D., Eppenberger-Eberhardt, M., Maedler, K., Pruschy, M., Eppenberger, H.M., Spinass, G.A., Donath, M.Y., 2001. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes* 50, 2105–2113.
- Ehse, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J.C., Westermann, B., Rugarli, E.I., Langer, T., 2009. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoforms and

- OMA1. *The Journal of Cell Biology* 187, 1023–1036.
- Essop, M.F., Opie, L.H., 2004. Metabolic therapy for heart failure. *European Heart Journal* 25, 1765–1768.
- Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T., Mihara, K., 2006. Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *Journal of Cell Science* 119, 4913–4925.
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., Mihara, K., 2003. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *Journal of Biochemistry* 134, 333–344.
- Fantini, E., Athias, P., Demiason, L., Grynberg, A., 1997. Protective effects of trimetazidine on hypoxic cardiac myocytes from the rat 11, 427–439.
- Foncea, R., Andersson, M., Ketterman, A., Blakesley, V., Sapag-Hagar, M., Sugden, P.H., LeRoith, D., Lavandro, S., 1997. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 19115–19124.
- Fragasso, G., Piatti Md, P.M., Monti, L., Palloshi, A., Setola, E., Puccetti, P., Calori, G., Lopaschuk, G.D., Margonato, A., 2003. Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy. *American Heart Journal* 146, E18.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E., Leitner, W.W., Robert, E., Catez, F., Smith, C., Youle, R., 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1, 515–525.
- Furt, F., Moreau, P., 2009. Importance of lipid metabolism for intracellular and mitochondrial membrane fusion/fission processes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1828–1836.
- Goldberg, I.J., Eckel, R.H., Abumrad, N.A., 2009. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *The Journal of Lipid Research* 50 Suppl, S86–90.
- Griffin, E.E., Graumann, J., Chan, D.C., 2005. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* 170, 237–248.
- Grill, V., Björklund, A., 2000. Dysfunctional insulin secretion in type 2 diabetes: role of metabolic abnormalities. *Cell Mol Life Sci* 57, 429–440.
- Guarnieri, C., Finelli, C., Zini, M., Muscari, C., 1997. Effects of trimetazidine on the calcium transport and oxidative phosphorylation of isolated rat heart mitochondria. *Basic Res Cardiol* 2, 90–95.

- Guarnieri, C., Muscari, C., 1988. Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle of monocrotaline-treated rats. *Biochemical Pharmacology* 37, 4685–4688.
- Guarnieri, C., Muscari, C., 1990a. Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle. *Cardiovasc Drugs Ther* 4 Suppl 4, 814–815.
- Guarnieri, C., Muscari, C., 1990b. Effect of trimetazidine on mitochondrial function and oxidative damage during reperfusion of ischemic hypertrophied rat myocardium. *Pharmacology* 46, 324–331.
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombès, A., Belenguer, P., Arnoult, D., Rojo, M., 2008. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol. Cell* 100, 315–325.
- Hamdan, M., Urien, S., Le Louet, H., Tillement, J.P., Morin, D., 2001. Inhibition of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-1 by a trimetazidine derivative, S-15176. *Pharmacol. Res.* 44, 99–104.
- Harder, Z., Zunino, R., McBride, H., 2004. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr. Biol.* 14, 340–345.
- Hardy, S., Langelier, Y., Prentki, M., 2000. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res.* 60, 6353–6358.
- Harsdorf, von, R., Li, P.F., Dietz, R., 1999. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99, 2934–2941.
- Hájek, P., Chomyn, A., Attardi, G., 2007. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J. Biol. Chem.* 282, 5670–5681.
- Herrmann, G., Decherd, G., 1939. The chemical nature of heart failure. *Annals of Internal Medicine* 1233–1244.
- Hickson-Bick, D.L., Buja, L.M., McMillin, J.B., 2000. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32, 511–519.
- Hickson-Bick, D.L.M., Sparagna, G.C., Buja, L.M., McMillin, J.B., 2002. Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, H656–64.
- Hirokawa, N., Takemura, R., 2005. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6, 201–214.

- Hom, J., Sheu, S.-S., 2009. Morphological dynamics of mitochondria — A special emphasis on cardiac muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46, 811–820.
- Ikizler, M., Erkasap, N., Dernek, S., Batmaz, B., Kural, T., Kaygisiz, Z., 2006. Trimetazidine-Induced Enhancement of Myocardial Recovery during Reperfusion: A Comparative Study in Diabetic and Non-diabetic Rat Hearts. *Archives of Medical Research* 37, 700–708.
- Imoto, M., Tachibana, I., Urrutia, R., 1998. Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *Journal of Cell Science* 111 (Pt 10), 1341–1349.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., Nunnari, J., 2005. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170, 1021–1027.
- Ingwall, J.S., 2007. On substrate selection for ATP synthesis in the failing human myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H3225–6.
- Ingwall, J.S., 2008. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovascular Research* 81, 412–419.
- Ishihara, N., Eura, Y., Mihara, K., 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of Cell Science* 117, 6535–6546.
- Ishikawa, K., Kimura, S., Kobayashi, A., Sato, T., Matsumoto, H., Ujiie, Y., Nakazato, K., Mitsugi, M., Maruyama, Y., 2005. Increased reactive oxygen species and anti-oxidative response in mitochondrial cardiomyopathy. *Circ J* 69, 617–620.
- Jheng, H.F., Tsai, P.J., Guo, S.M., Kuo, L.H., Chang, C.S., Su, I.J., Chang, C.R., Tsai, Y.S., 2011. Mitochondrial Fission Contributes to Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Molecular and Cellular Biology* 32, 309–319.
- Kantor, P.F., Lucien, A., Kozak, R., Lopaschuk, G.D., 2000. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circulation Research* 86, 580–588.
- Kodde, I.F., van der Stok, J., Smolenski, R.T., de Jong, J.W., 2007. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146, 26–39.
- Kong, J., 2003. Mitochondrial effects with ceramide-induced cardiac apoptosis are different from those of palmitate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412,

196–206.

- Kong, J.Y., Rabkin, S.W., 2000. Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A. *Biochim. Biophys. Acta* 1485, 45–55.
- Korvald, C., Elvenes, O.P., Myrnes, T., 2000. Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1345–51.
- Kuang, M., Febbraio, M., Wagg, C., Lopaschuk, G.D., Dyck, J.R.B., 2004. Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation* 109, 1550–1557.
- Kurien, V., Oliver, M., 1971. Free fatty acids during acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 13, 361–373.
- Kuzmich, J., del Campo, A., López-Crisosto, C., Morales, P.E., Pennanen, C., Bravo-Sagua, R., Hechenleitner, J., Zepeda, R., Castro, P.F., Verdejo, H.E., Parra, V., Chiong, M., Lavandero, S., 2011. Mitochondrial Dynamics: a Potential New Therapeutic Target for Heart Failure. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 64, 916–923.
- Lee, Y., Naseem, R.H., Duplomb, L., Park, B.-H., Garry, D.J., Richardson, J.A., Schaffer, J.E., Unger, R.H., 2004. Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13624–13629.
- Lee, Y.-J., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C.L., Youle, R.J., 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15, 5001–5011.
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3077–3082.
- Listenberger, L.L., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2001. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 14890–14895.
- Longo, N., di San Filippo, C., Pasquali, M., 2006. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet* 142C, 77–85.
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D.L., Jaswal, J.S., Stanley, W.C., 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological Reviews* 90, 207–258.
- López-Crisosto, C., 2012. Regulación de la respuesta a insulina por ceramidas en el

cardiomiocito a nivel de la dinámica mitocondrial. Universidad de Chile.

- Lu, C., Dabrowski, P., Fragasso, G., Chierchia, S.L., 1998. Effects of trimetazidine on ischemic left ventricular dysfunction in patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 82, 898–901.
- Luiken, J.J.F.P., Coort, S.L.M., Koonen, D.P.Y., van der Horst, D.J., Bonen, A., Zorzano, A., Glatz, J.F.C., 2004. Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 448, 1–15.
- MacInnes, A., Fairman, D.A., Binding, P., Rhodes, J.A., Wyatt, M.J., Phelan, A., Haddock, P.S., Karran, E.H., 2003. The antianginal agent trimetazidine does not exert its functional benefit via inhibition of mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circulation Research* 93, e26–32.
- Maedler, K., Spinas, G.A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., Donath, M.Y., 2001. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 50, 69–76.
- Mahfoudh-Boussaid, A., Zaouali, M.A., Hauet, T., Hadj-Ayed, K., Miled, A.-H., Ghoul-Mazgar, S., Saidane-Mosbahi, D., Rosello-Catafau, J., Ben Abdennebi, H., 2012. Attenuation of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in kidney with ischemic postconditioning application and trimetazidine treatment. *J. Biomed. Sci.* 19, 71.
- Malhotra, A., Sanghi, V., 1997. Regulation of contractile proteins in diabetic heart. *Cardiovascular Research* 34, 34–40.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombès, A., Rojo, M., 2005. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO reports* 6, 853–859.
- Mann, D.L., 1999. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation* 100, 999–1008.
- Mann, D.L., Urabe, Y., Kent, R.L., Vinciguerra, S., Cooper, G., 1991. Cellular versus myocardial basis for the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Circulation Research* 68, 402–415.
- Martinou, J.C., Youle, R.J., 2006. Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* 13, 1291–1295.
- Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Márquez, J., 2008. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch. Toxicol.* 82, 273–299.
- Miller, T.A., LeBrasseur, N.K., Cote, G.M., Trucillo, M.P., Pimentel, D.R., Ido, Y.,

- Ruderman, N.B., Sawyer, D.B., 2005. Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336, 309–315.
- Misra, M.K., Sarwat, M., Bhakuni, P., Tuteja, R., Tuteja, N., 2009. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 15, RA209–219.
- Molina, A.J.A., Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., Shirihai, O.S., 2009. Mitochondrial Networking Protects -Cells From Nutrient-Induced Apoptosis. *Diabetes* 58, 2303–2315.
- Monteiro, P., Duarte, A.I., Gonçalves, L.M., Moreno, A., Providência, L.A., 2004. Protective effect of trimetazidine on myocardial mitochondrial function in an ex-vivo model of global myocardial ischemia. *European Journal of Pharmacology* 503, 123–128.
- Morillas Blasco, P.J., Hernández Martínez, A., Azorín Villena, I., Portolés Sanz, M., Pallarés Carratala, V., Martínez, V.B., Capdevilla Carbonell, C., Aguilar Llopis, A., Cosín Aguilar, J., 2005. Mitochondrial changes induced by trimetazidine in the myocardium. *Med Sci Monit* 11, BR162–167.
- Morin, D., Elimadi, A., Sapena, R., Crevat, A., Carrupt, P.A., Testa, B., Tillement, J.P., 1998. Evidence for the existence of [3H]-trimetazidine binding sites involved in the regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Br. J. Pharmacol.* 123, 1385–1394.
- Morrow, D.A., Givertz, M.M., 2005. Modulation of myocardial energetics: emerging evidence for a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circulation* 112, 3218–3221.
- Myrmel, T., Forsdahl, K., TS, L., 1992. Triacylglycerol metabolism in hypoxic, glucose-deprived rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 24, 855–868.
- Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K.I., Kaneko, S., 2009. Palmitate Induces Insulin Resistance in H4IIEC3 Hepatocytes through Reactive Oxygen Species Produced by Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 284, 14809–14818.
- Naylor, K., Ingerman, E., Okreglak, V., Marino, M., Hinshaw, J.E., Nunnari, J., 2006. Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *J. Biol. Chem.* 281, 2177–2183.
- Neely, J.R., Morgan, H.E., 1974. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 36, 413–459.
- Neubauer, S., 2007. The failing heart—an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* 356,

1140–1151.

- Neubauer, S., Horn, M., Naumann, A., Tian, R., Hu, K., Laser, M., Friedrich, J., Gaudron, P., Schnackerz, K., Ingwall, J.S., 1995. Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 95, 1092–1100.
- Nicholls, D.G., 1974. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur. J. Biochem.* 50, 305–315.
- Nowak, P., Zagził, T., Konecki, J., Szczerbak, G., Szkilnik, R., Niwiński, J., Gorzałek, J., Kostrzewa, R.M., Brus, R., 2006. Trimetazidine increases [3H]glucose uptake in rat brain. *Pharmacol Rep* 58, 559–561.
- Okere, I.C., Chandler, M.P., McElfresh, T.A., Rennison, J.H., Sharov, V., Sabbah, H.N., Tserng, K.-Y., Hoit, B.D., Ernsberger, P., Young, M.E., Stanley, W.C., 2006. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H38–44.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., Lenaers, G., 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743–7746.
- Olichon, A., Emorine, L., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C., Ducommun, B., Lenaers, G., Belenguer, P., 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 523, 171–176.
- Onay-Besikci, A., 2006. Regulation of Cardiac Energy Metabolism in Newborn. *Mol Cell Biochem* 287, 1–11.
- Ong, S.-B., Subrayan, S., Lim, S.Y., Yellon, D.M., Davidson, S.M., Hausenloy, D.J., 2010. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 121, 2012–2022.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., Mihara, K., 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* 191, 1141–1158.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., Ruggiero, F.M., 2010. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 1286–1295.
- Parker, N., Crichton, P.G., Vidal-Puig, A.J., Brand, M.D., 2009. Uncoupling protein-1

- (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 41, 335–342.
- Parra, V., Eisner, V., Chiong, M., Criollo, A., Moraga, F., Garcia, A., Hartel, S., Jaimovich, E., Zorzano, A., Hidalgo, C., Lavandero, S., 2007. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovascular Research* 77, 387–397.
- Parra, V., Moraga, F., Kuzmicic, J., López-Crisosto, C., Troncoso, R., Torrealba, N., Criollo, A., Díaz-Elizondo, J., Rothermel, B.A., Quest, A.F.G., Lavandero, S., 2013a. Calcium and mitochondrial metabolism in ceramide-induced cardiomyocyte death. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 1334–44.
- Parra, V., Verdejo, H., Campo, A., Pennanen, C., Kuzmicic, J., Iglewski, M., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Lavandero, S., 2011. The complex interplay between mitochondrial dynamics and cardiac metabolism. *J Bioenerg Biomembr* 43, 47–51.
- Parra, V., Verdejo, H.E., Iglewski, M., del Campo, A., Troncoso, R., Jones, D., Zhu, Y., Kuzmicic, J., Pennanen, C., López-Crisosto, C., Jaña, F., Ferreira, J., Noguera, E., Chiong, M., Bernlohr, D.A., Klip, A., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Abel, E.D., Zorzano, A., Lavandero, S., 2013b. Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFκB-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes*, ePub ahead of print.
- Paumen, M.B., Ishida, Y., Muramatsu, M., Yamamoto, M., Honjo, T., 1997. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 3324–3329.
- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A., 2005. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Human Molecular Genetics* 14, 1405–1415.
- Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Prinetti, A., Tettamanti, G., 1997. The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res* 36, 153–195.
- Richieri, G.V., Anel, A., Kleinfeld, A.M., 1993. Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 32, 7574–7580.
- Sack, M.N., Harrington, L.S., Jonassen, A.K., Mjøs, O.D., Yellon, D.M., 2000. Coordinate regulation of metabolic enzyme encoding genes during cardiac development and following carvedilol therapy in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 14, 31–39.
- Saxton, W.M., Hollenbeck, P.J., 2012. The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science* 125, 2095–2104.

- Scalettar, B.A., Abney, J.R., Hackenbrock, C.R., 1991. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8057–8061.
- Scheffler, I., 2001. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1, 3–31.
- Sentex, E., Sergiel, J.P., Lucien, A., Grynberg, A., 1997. Trimetazidine increases phospholipid turnover in ventricular myocyte. *Mol Cell Biochem* 175, 153–162.
- Shimabukuro, M., Ohneda, M., Lee, Y., Unger, R.H., 1997. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *J. Clin. Invest.* 100, 290–295.
- Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M., Unger, R.H., 1998. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2498–2502.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D., van der Bliek, A., 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 2245–2256.
- Soubannier, V., McBride, H.M., 2009. Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *BBA - Molecular Cell Research* 1793, 154–170.
- Sparagna, G.C., Hickson-Bick, D.L., Buja, L.M., McMillin, J.B., 2000. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H2124–32.
- Sparagna, G.C., Hickson-Bick, D.L., Buja, L.M., McMillin, J.B., 2001. Fatty acid-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes: redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 71–79.
- Stanley, W.C., 2005. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews* 85, 1093–1129.
- Stanley, W.C., Marzilli, M., 2003. Metabolic therapy in the treatment of ischaemic heart disease: the pharmacology of trimetazidine. *Fundam Clin Pharmacol* 17, 133–145.
- Stojanovski, D., Koutsopoulos, O.S., Okamoto, K., Ryan, M.T., 2004. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *Journal of Cell Science* 117, 1201–1210.
- Stratmann, B., Gawlowski, T., Tschoepe, D., 2010. Diabetic cardiomyopathy--to take a long story serious. *Herz* 35, 161–168.
- Summers, S., 2006. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in Lipid Research* 45, 42–72.

- Tabbi-Anneni, I., 2002. Prevention of Heart Failure in Rats by Trimetazidine Treatment: A Consequence of Accelerated Phospholipid Turnover? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304, 1003–1009.
- Tabbi-Anneni, I., Lucien, A., Grynberg, A., 2003. Trimetazidine effect on phospholipid synthesis in ventricular myocytes: consequences in alpha-adrenergic signaling. *Fundam Clin Pharmacol* 17, 51–59.
- Taegtmeyer, H., 1994. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Current problems in cardiology* 19, 59–113.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., Mihara, K., 2007. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 282, 11521–11529.
- Taylor, M., Wallhaus, T.R., Degrado, T.R., Russell, D.C., Stanko, P., Nickles, R.J., Stone, C.K., 2001. An evaluation of myocardial fatty acid and glucose uptake using PET with [¹⁸F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid and [¹⁸F]FDG in Patients with Congestive Heart Failure. *J. Nucl. Med.* 42, 55–62.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K., Nunnari, J., 2002. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* 158, 445–452.
- Tominaga, H., Katoh, H., Odagiri, K., Takeuchi, Y., Kawashima, H., Saotome, M., Urushida, T., Satoh, H., Hayashi, H., 2008. Different effects of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl-CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 295, H105–H112.
- Tsang, M.Y.C., Cowie, S.E., Rabkin, S.W., 2004. Palmitate increases nitric oxide synthase activity that is involved in palmitate-induced cell death in cardiomyocytes. *Nitric Oxide* 10, 11–19.
- Tselepis, A., Doulias, P., Lourida, E., Glantzounis, G., Tsimoyiannis, E., Galaris, D., 2001. Trimetazidine protects low-density lipoproteins from oxidation and cultured cells exposed to H₂O₂ from DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1357–1364.
- Tsutsui, H., Ide, T., Kinugawa, S., 2006. Mitochondrial Oxidative Stress, DNA Damage, and Heart Failure. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1737–1744.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B., Yuan, J., Deeney, J., Corkey, B., Shirihai, O., 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27, 433–446.
- Unger, R., 1995. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44, 863–870.

- Unger, R.H., Orci, L., 2002. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 202–212.
- van der Vusse, G.J., van Bilsen, M., Glatz, J.F., 2000. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovascular Research* 45, 279–293.
- Veitch, K., Maisin, L., Hue, L., 1995. Trimetazidine effects on the damage to mitochondrial functions caused by ischemia and reperfusion. *Am. J. Cardiol.* 76, 25B–30B.
- Wallhaus, T.R., Taylor, M., Degrado, T.R., Russell, D.C., Stanko, P., Nickles, R.J., Stone, C.K., 2001. Myocardial free fatty acid and glucose use after carvedilol treatment in patients with congestive heart failure. *Circulation* 103, 2441–2446.
- Wasiak, S., Zunino, R., McBride, H.M., 2007. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 177, 439–450.
- Weber, K., Brilla, C., Cleland, J., Cohn, J., Hansson, L., Heagerty, A., Laragh, J., Laurent, S., Ollivier, J., Pauletto, P., 1993. Cardioreparation and the concept of modulating cardiovascular structure and function. *Blood Press* 2, 6–21.
- Weisser-Thomas, J., Kubo, H., Hefner, C., Gaughan, J., McGowan, B., Ross, R., Meyer, M., Dillmann, W., Houser, S., 2005. The Na⁺/Ca²⁺ Exchanger/SR Ca²⁺ ATPase Transport Capacity Regulates the Contractility of Normal and Hypertrophied Feline Ventricular Myocytes. *J Card Fail* 11, 380-7.
- Wende, A.R., Abel, E.D., 2010. Lipotoxicity in the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 311–319.
- Westermann, B., 2002. Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO reports* 3, 527–531.
- Yang, R., Barouch, L.A., 2007. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circulation Research* 101, 545–559.
- Yoon, Y., Pitts, K., McNiven, M., 2001. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* 12, 2894–2905.
- Yu, T., Robotham, J.L., Yoon, Y., 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2653–2658.
- Yuzefovych, L.V., Solodushko, V.A., Wilson, G.L., Rachek, L.I., 2012. Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology* 153, 92–100.

- Zepeda, R., 2012. Efecto de la fusion mitocondrial sobre el daño inducido por la isquemia reperfusion miocardica. Universidad de Chile.
- Zhang, D., Lu, C., Whiteman, M., Chance, B., Armstrong, J.S., 2008. The mitochondrial permeability transition regulates cytochrome c release for apoptosis during endoplasmic reticulum stress by remodeling the cristae junction. *J. Biol. Chem.* 283, 3476–3486.
- Zhang, L., Lu, Y., Jiang, H., Zhang, L., Sun, A., Zou, Y., Ge, J., 2012. Additional use of trimetazidine in patients with chronic heart failure: a meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 59, 913–922.
- Zhang, L., Seitz, L.C., Abramczyk, A.M., Chan, C., 2010. Synergistic effect of cAMP and palmitate in promoting altered mitochondrial function and cell death in HepG2 cells. *Experimental Cell Research* 316, 716–727.
- Zhao, H., Hardy, R.W., 2004. Long-chain saturated fatty acids induce annexin II translocation to detergent-resistant membranes. *Biochem. J.* 381, 463–469.
- Zhu, P.-P., Patterson, A., Stadler, J., Seeburg, D.P., Sheng, M., Blackstone, C., 2004. Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J. Biol. Chem.* 279, 35967–35974.
- Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M., McBride, H.M., 2007. The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *Journal of Cell Science* 120, 1178–1188.