

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“Estudio de la vía
Insulina/NF-κB/VCAM-1 en la
protección del cardiomiocito
isquémico”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar
al grado de Doctor en Bioquímica por:**

Ariel Eduardo Díaz Montecinos

Director de Tesis

Dra. Lorena García Nanning

SANTIAGO - CHILE

2016

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:

Ariel Eduardo Díaz Montecinos

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día _____ de _____ de 2016.

Director de Tesis:

Dra. Lorena García Nanning

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Jenny Fiedler Temer (Presidente)

Dr. Martín Montecino Leonard

Dra. Lisette Leyton Campos

Dr. Vicente Torres Gómez

**Dedicado a los/as valientes,
aquellos que se han atrevido a viajar
por el camino hacia el conocimiento**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis, Dra. Lorena García, por su respaldo y guía durante estos cinco años de trabajo. También agradezco la significativa contribución de la Comisión, Dra. Jenny Fiedler, Dr. Martín Montecino, Dra. Lisette Leyton y Dr. Vicente Torres, por sus comentarios, críticas y buena disposición a ayudar a mejorar este trabajo, así como también permitirme aprender de ellos. Además agradezco al Dr. Sergio Lavandero por su guía durante la realización de este trabajo, y ayuda en la realización de la pasantía doctoral. Agradezco al Dr. Anwarul Ferdous, por su ayuda y consejos durante mi estadía UTSW Medical Center, Dallas. Así como también al Dr. Joseph Hill por su respaldo durante la pasantía en su laboratorio. Agradezco a la Dra. Valentina Parra y su esposo Carlos Aguilar, al Dr. Francisco Almirano y la Dra. Cyndi Morales, por su amistad y apoyo durante la realización de la pasantía en Estados Unidos. Agradezco al Sr. Diego Humeres, por su apoyo experimental durante el inicio de esta Tesis. Agradezco al Sr. Fidel Albornoz y Sra. Gindra Latorre, por su excelente apoyo técnico y amistad. A mis compañeros de laboratorio, por todas esas alegrías, consejos y ayudas técnicas. Agradezco a mi familia, a mis amigos y amigas, que han sido un soporte fundamental durante esta tesis. Finalmente, agradezco a cada una de las personas que han influido en el crecimiento de mi trabajo y han hecho de mí una mejor persona, a las que se han ido y a las que han llegado.

TABLA DE CONTENIDOS

1	GLOSARIO	2
2	RESUMEN	5
3	INTRODUCCIÓN	7
3.1	Generalidades.....	7
3.2	Isquemia/Reperusión (I/R)	7
3.3	Cardioprotección de insulina	11
3.4	Señalización de insulina en corazón	12
3.5	NF-κB: potencial efector en la protección de insulina.....	13
3.6	VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular-1)/CD106/INCAM-110	14
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
4.1	HIPÓTESIS	16
4.2	OBJETIVO GENERAL:.....	16
4.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
5	METODOLOGÍA.....	17
5.1	Animales.....	17
5.2	Cultivo de cardiomiocitos neonatos.....	17
5.3	Isquemia simulada (IS).....	17
5.4	PCR en tiempo real.....	18
5.5	Extractos celulares y cuantificación de proteínas.....	18
5.6	Determinación de VCAM-1 soluble.....	19
5.7	Electroforesis de proteínas y electrotransferencia	19
5.8	Western blot.....	20
5.9	Transfección de cardiomiocitos.....	21
5.10	Evaluación de la muerte celular.....	21
5.11	Inmunofluorescencia.....	22
5.12	Análisis de imágenes.....	22
5.13	Expresión de resultados y análisis estadístico.....	22
6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
6.1	demostrar que insulina protege de la muerte en el modelo de IS en cardiomiocitos de rata neonata.....	23
6.2	Evaluar el rol de VCAM-1 en la protección por insulina en el modelo de IS.....	23

6.3	Estudiar el efecto de la disminución de VCAM-1 en la señalización de insulina durante IS.	24
7	RESULTADOS	25
7.1	Objetivo 1: Demostrar que insulina protege de la muerte en el modelo de IS de cardiomiocitos de rata neonata.	25
7.1.1	Insulina protege frente a isquemia.....	25
7.1.2	Insulina activa a la quinasa AKT en isquemia	30
7.1.3	Insulina activa a NF-κB en isquemia	36
7.2	Objetivo 2: evaluar el efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la protección por insulina durante IS.....	41
7.2.1	Insulina no altera los niveles de VCAM-1 en cardiomiocitos.....	41
7.2.2	VCAM-1 participa en los efectos protectores de insulina frente a isquemia.	44
7.3	Objetivo 3: Estudiar el efecto de la disminución de VCAM-1 en la señalización de insulina durante IS.....	51
7.3.1	Localización de VCAM-1 en cardiomiocitos	51
7.3.2	VCAM-1 y activación de AKT.	57
8	DISCUSIÓN.....	62
8.1	Insulina protege frente a isquemia.....	62
8.2	Mecanismos de muerte celular en IS	63
8.3	Insulina activa AKT en isquemia	64
8.4	Insulina activa NF-κB en isquemia	65
8.5	VCAM-1 en isquemia y los efectos protectores de insulina.....	67
8.6	Localización de VCAM-1 en cardiomiocitos.....	69
8.7	VCAM-1 y la regulación de AKT.	70
9	CONCLUSIONES	73
10	PROYECCIONES.....	74
11	REFERENCIAS.....	75
12	FIGURAS ANEXAS.....	86

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Representación de los mecanismos moleculares que generan daño durante la isquemia. Página 9
- Figura 2. Mecanismos moleculares que generan daño durante la reperfusión. Página 10
- Figura 3. Efecto protector de insulina en isquemia reperfusión simulada. Página 25
- Figura 4. Efecto de la isquemia simulada sobre la viabilidad de los cardiomiocitos. Página 27
- Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de insulina en la viabilidad de cardiomiocitos sometidos a isquemia simulada. Página 27
- Figura 6. Efecto de insulina sobre la liberación de lactato deshidrogenasa en el medio en cardiomiocitos sometidos a isquemia simulada. Página 28
- Figura 7. Efecto de insulina sobre el porcentaje de población apoptótica subG1 en cardiomiocitos sometidos a isquemia simulada. Página 28
- Figura 8. Efecto de insulina sobre el porcentaje de células apoptóticas en cardiomiocitos sometidos a isquemia simulada. Página 29
- Figura 9. Efecto de insulina sobre niveles de caspasa 3 durante isquemia simulada. Página 30
- Figura 10. Efecto de insulina sobre niveles de PARP durante isquemia simulada. Página 31
- Figura 11. Efecto de insulina sobre la activación de AKT en isquemia simulada. Página 32
- Figura 12. Efecto de insulina sobre la fosforilación de BAD durante isquemia simulada. Página 33
- Figura 13. Estandarización del inhibidor AKTi VIII en isquemia simulada. Página 34
- Figura 14. Efecto de la inhibición de AKT y NF- κ B en la función protectora de insulina en isquemia simulada. Página 35
- Figura 15. Efecto de la inhibición de AKT y NF- κ B en la función anti-necrótica de insulina durante isquemia simulada. Página 35
- Figura 16. Efecto de insulina sobre niveles de I κ B α durante isquemia simulada. Página 37
- Figura 17. Efecto de insulina sobre traslocación nuclear de p65 durante isquemia simulada. Página 38 y 49
- Figura 18. Estandarización de inhibidor BAY 11-7082 en isquemia simulada. Página 40
- Figura 19. Efecto de insulina sobre los niveles de mRNA de VCAM-1 en cardiomiocito en condiciones de normoxia. Página 42

Figura 20. Efecto de insulina sobre los niveles de proteicos de VCAM-1 en cardiomiocito en condiciones de normoxia.	Página 42
Figura 21. Efecto de insulina sobre los niveles de VCAM-1 durante isquemia simulada.	Página 43
Figura 22. Efecto de insulina sobre los niveles de VCAM-1 soluble en isquemia simulada.	Página 44
Figura 23. Efecto de siVCAM-1 en los niveles del mRNA de VCAM-1 relativos a <i>GAPDH</i> .	Página 45
Figura 24. Efecto de siVCAM-1 en los niveles del mRNA de VCAM-1 relativos a <i>18S</i> .	Página 46
Figura 25. Efecto de siVCAM-1 en los niveles proteicos de VCAM-1.	Página 47
Figura 26. VCAM-1 participa en los efectos protectores de insulina en IS.	Página 48
Figura 27. VCAM-1 participa en la función anti-apoptótica de insulina en isquemia simulada.	Página 49 y 50
Figura 28. Localización de VCAM-1 mediante Inmunofluorescencia en cardiomiocitos neonatos en condiciones permeabilizadas.	Página 52
Figura 29. Localización de VCAM-1 mediante Inmunofluorescencia en cardiomiocitos neonatos en condiciones no permeabilizadas.	Página 53
Figura 30. VCAM-1 está enriquecido en precipitado nuclear.	Página 54
Figura 31. Putativa secuencia de localización nuclear de VCAM-1.	Página 55
Figura 32. Modelamiento de la putativa secuencia de localización nuclear de VCAM-1.	Página 56
Figura 33. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en isquemia simulada sobre la fosforilación de AKT en presencia de insulina.	Página 58
Figura 34. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en isquemia simulada sobre fosforilación en los residuos de serinas 21/9 de GSK3 en presencia de insulina.	Página 59
Figura 35. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en isquemia simulada sobre fosforilación en residuos de T202 y Y204 de ERK1/2 en presencia de insulina.	Página 60
Figura 36. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la activación de AKT por presencia de insulina durante en isquemia simulada por 1 hora.	Página 61
Figura 37. Modelo de protección de insulina en isquemia simulada.	Página 67
Figura 38. Modelo de participación de VCAM-1 protección de insulina en isquemia simulada.	Página 72
Figura Anexa A1. Comparación de Isquemias y protección de insulina entre Chile y USA.	Página 86
Figura Anexa A2. Estandarización de partidores para VCAM-1.	Página 87

Figura Anexa A3. Estandarización de siRNA VCAM-1.	Página 88
Figura Anexa A4. Isoformas de VCAM-1 en cardiomiocito.	Página 89
Figura Anexa A5. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la activación de AKT.	Página 90
Tabla 1. Secuencia partidores utilizados para la detección de mRNA específicos.	Página 18
Tabla 2. Anticuerpos utilizados.	Página 20
Tabla 3. siRNA utilizado en experimentos de transfección.	Página 21

FINANCIAMIENTO

Beca CONICYT Doctorado 21110381 (Ariel Díaz)

Proyecto FONDECYT 1110346 (Lorena García, investigadora responsable)

Proyecto Anillo NEMESIS 1111 (Lorena García, investigadora asociada)

Centro FONDAP 15130011 ACCDiS (Lorena García, investigadora asociada)

PRODUCTIVIDAD Y DIFUSIÓN DURANTE EL DOCTORADO

Publicaciones

Ariel Díaz, Claudio Humeres, Verónica González, María Teresa Gomez, Natalia Montt, Gina Sánchez, Mario Chiong, Lorena García (2015). Insulin/NF-kB signaling pathway protects against ischemia-induced necrotic cardiomyocyte death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015, 13;467:451-7.

Sergio Hernández, Daniella Figueroa, Simón Correa, Ariel Díaz, Daniel Aguayo, Rodrigo A Villanueva. Phosphorylation at the N-terminal finger subdomain of a viral RNA-dependent RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015, 9;466:21-7

Paredes, A. H., Salvetti, N. R., Díaz, A. E., Dallard, B. E., Ortega, H. H., & Lara, H. E. Sympathetic nerve activity in normal and cystic follicles from isolated bovine ovary: local effect of beta-adrenergic stimulation on steroid secretion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011, 16;9:66.

Congresos

García L, Díaz A, Humeres C, Gómez M, González V, Lavandero S. Protective role of insulin/AKT/p65NFkB signaling pathway in ischemic cardiomyocytes. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 30 septiembre - 4 de octubre, 2014. Puerto Varas, Chile

Díaz A, Humeres C, González V, Lavandero S, García L. Insulin/NFkB/VCAM-1 signaling pathway in the protection to cardiac ischemia. XII PABMB Congress. Puerto Varas, Chile. 9-14 noviembre, 2013.

González V, Díaz A, Gómez M, Vivar R, García L. Role of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cardioprotective actions of insulin. XII PABMB Congress. Puerto Varas, Chile. 9-14 noviembre, 2013.

Humeres C, Díaz A, Cordero G, González V, Corbalán R, García L. Insulin and VCAM-1 protect cardiomyocytes from ischemia death. XX Meeting ISHR Latin American Section. 25-26 Octubre, 2012. Santiago, Chile.

Pasantías

Laboratorio de Dr. Joseph Hill, Cardiology Department, Internal Medicine, UT Southwestern Medical Center. Dallas, Texas. USA. Septiembre 2014 - Marzo 2015.

Difusión Científica

Charla "Quiero ser científico" durante la semana de la ciencia año 2011 - 2013 (Explora Conicyt). Monitor los laboratorios móviles del Profesor Dr. Jorge Allende año 2013 (Universidad de Chile y Fundación Allende Connelly).

1 GLOSARIO

2-DG: 2 deoxiglucosa, inhibidor competitivo de la hexoquinasa.

AKTi VIII: inhibidor competitivo del dominio de homología a pleckstrina de AKT.

ANOVA: Análisis de varianza, análisis estadístico que compara las varianzas entre dos o más poblaciones.

BAD: *Bcl-2-associated death promoter*, Proteína proapoptótica perteneciente a la familia BCL-2.

ATP: nucleótido adenosina trifosfato.

BAY 11-7082: inhibidor NF- κ B, inhibe irreversiblemente la fosforilación de I κ B α por el complejo IKK.

Bcl-2: B-cell lymphoma 2, proteína antiapoptótica perteneciente a la familia BCL-2.

Bcl-xl: B-cell lymphoma-extra large, proteína antiapoptótica perteneciente a la familia BCL-2.

cDNA: DNA complementario obtenido de la reacción de transcripción reversa.

CREATE-ECLA: The Clinical Trial of Metabolic Modulation in Acute Myocardial Infarction Treatment Evaluation-Estudios Cardiológicos Latinoamérica.

cKO: delección de gen específica en cardiomiocitos.

C3: capasa 3, cisteinil aspartato proteasa ejecutora.

CD106: cluster de diferenciación 106, VCAM-1, INCAM-110.

CAMs: moléculas de adhesión celular.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

ECV: grupo de enfermedades cardiovasculares.

ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinases, quinasas reguladas por señales extracelulares.

GIK: medio de infusión cardioprotector que contiene Glucosa, Insulina y Potasio.

GSK3: glicogeno sintasa quinasa 3, esta quinasa inhibe a la enzima glicógeno sintasa.

HEPES: Buffer Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano sulfónico.

IGF-1: factor de crecimiento tipo insulina 1.

IKK: quinasa de I κ B α , complejo formado por unidades IKK α , IKK β y NEMO.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1.

Igs: proteínas inmunoglobulinas.

IR: receptor de insulina, tetrámero formado por 2 subunidades alfas y dos subunidades betas, tiene dos Isoformas A y B.

IκB: inhibidor de kappa (κ) B, proteína que oculta la señal de localización nuclear del factor transcripcional NF-κB.

I/R: Isquemia reperfusión, proceso por el cual disminuyen o desaparecen los nutrientes extracelulares de las células, que luego de un tiempo son restaurados.

Insulina: Ins, hormona producida por el páncreas.

IRS: Sustrato del receptor de insulina, proteína de andamiaje que participa en la señalización intracelular de insulina.

MTP: poro de transición mitocondrial, complejo multiproteico que regula la permeabilidad de las mitocondrias y mecanismos de muerte celular como apoptosis y necrosis.

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos. Señalización activada por factores de crecimiento que culmina con, entre otros, la activación de ERK.

M199: medio de cultivo 199.

NF-κB: factor nuclear kappa (κ) B, factor transcripcional.

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa, enzima involucrada en la reparación del ADN y muerte celular, entre otras funciones.

PBS: Tampón fosfato salino. Utilizado para el lavado de células, medio base para preparar otras soluciones y vehículo control de experimentos.

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa. Quinasa de fosfolípidos que participa en la señalización de insulina.

PIP3: fosfatidilinositol 3, 4, 5 trisfosfato.

PVDF (Membrana): membrana polifluoruro de vinilideno, se utiliza en el *western blot* para adsorber las proteínas separadas en la electroforesis.

ROS: especies reactivas de oxígeno, compuestos químicos que provienen del oxígeno y que contienen un electrón desapareado.

RIPA: tampón utilizado para lisar células y tejidos.

SEM: Error estándar medio. Desviación estándar de la población dividida por la raíz cuadrada del tamaño de la muestra.

si/R: Isquemia reperfusión simulada, proceso que simula las condiciones que ocurren durante la isquemia y la reperfusión.

siControl: siRNA con secuencia generada al azar, se utiliza como control de transfección en experimentos de silenciamiento.

siRNA: RNA interferente pequeño, oligonucleótido pequeño dirigido contra un mRNA específico, su hibridación con el mRNA induce degradación de este, por lo cual hay reducción de los niveles de la proteína de interés de estudio.

siVCAM-1: siRNA con secuencia dirigida para el mRNA de VCAM-1.

SBF: Suero Bovino Fetal.

TBS-Tween: Tampón tris salino con tween. Solución que es utilizada para los lavados en la técnica de *western blot*.

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*. Técnica molecular para detectar degradación del DNA en la célula, lo cual incrementa durante la muerte celular por apoptosis y necrosis.

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1, CD106, INCAM-110.

VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje, proteína que forma parte del poro de transición mitocondrial.

2 RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares corresponden a la principal causa de muerte. En un corazón normal, insulina promueve incorporación de glucosa y su utilización estimulando la glicolisis, y estimulando la síntesis de proteínas. Por otro lado, durante isquemia/reperfusión, insulina promueve cardioprotección. Sin embargo, todos los estudios se han enfocado en estudiar el rol de insulina durante la reperfusión; por lo tanto, los efectos de esta hormona son desconocidos durante la isquemia. Además, antecedentes sugieren que el factor transcripcional NF- κ B podría ser protector durante isquemia. NF- κ B, controla una variedad de procesos antiapoptóticos, inflamatorios y de adhesión celular, entre otros. Una proteína controlada tanto por insulina como por NF- κ B, en células endoteliales, es VCAM-1. Esta proteína es importante para el desarrollo del corazón y la diferenciación muscular. Por lo tanto, se estudiaron el rol de NF- κ B y VCAM-1 y su regulación por insulina en el cardiomiocito isquémico. Para probar esto, cardiomiocitos neonatos fueron sometidos a isquemia simulada (IS) por 8 horas en ausencia o presencia de insulina 10 nM en combinación de diferentes tratamientos (inhibición de AKT mediante AKTi VIII, inhibición de NF- κ B por BAY 11-7082 y reducción de VCAM-1 por siRNA). Los efectos protectores de insulina fueron evaluados mediante conteo celular, actividad LDH presente en el medio, fragmentación del DNA. Insulina protegió frente a isquemia, disminuyendo la necrosis y apoptosis durante IS. La presencia de los inhibidores AKTi VIII y BAY 11-7082 redujeron los efectos protectores de insulina. El silenciamiento de VCAM-1 también inhibió los efectos protectores de insulina en IS. Además, el silenciamiento de VCAM-1 resultó en aumento en la activación de AKT durante IS y menos respuesta frente la presencia de insulina. Estos resultados sugieren que insulina reduce la necrosis de los cardiomiocitos a través de la activación de AKT y NF- κ B. Más aún, VCAM-1 estaría regulando este rol protector de insulina durante IS a través de la regulación de AKT. Estos hallazgos aportan a clarificar el rol protector de insulina durante isquemia, y su posible utilización durante cirugías y trasplante de corazón. Finalmente, estos resultados dejan a la luz un nuevo rol de VCAM-1 en la señalización de insulina y apoyan la idea que activación de AKT no siempre es sinónimo de cardioprotección.

ABSTRACT: Role of Insulin/AKT/NF- κ B/VCAM-1 axis in the protection of cardiomyocyte during ischemia.

In Chile and worldwide cardiovascular diseases are the major causes of death. In the normal heart, insulin promotes glucose uptake and its utilization via glycolysis, regulates long-chain fatty acid uptake and protein synthesis. On the other hand, during ischemia/reperfusion, insulin promotes cardioprotection. Nevertheless, all studies have focused on insulin effects during reperfusion. Moreover, the transcription factor NF- κ B seems to be protective against ischemia. VCAM-1 is a protein regulated by both insulin and NF- κ B. Therefore, we explored the cardioprotective action of insulin and the role of AKT, NF- κ B and VCAM-1 on the protective role of this hormone during ischemia. To test this, cultured neonatal rat cardiomyocytes were exposed to simulated ischemia by 8 hours in the absence or presence of insulin in combination with different treatments (AKT inhibition by AKTi VIII, NF- κ B inhibition by BAY 11-7082 and VCAM-1 reduction by siRNA transfection). Cytoprotective effects of insulin were measured by cell count, LDH release and DNA. We found that insulin protected against simulated ischemia. Moreover, insulin protected cardiomyocytes from simulated ischemia by reducing necrotic cell death. Protective effects of insulin were dependent of AKT and NF κ B. Additionally, silence of VCAM-1 inhibited insulin protection against simulated ischemia. We found that VCAM-1 silencing resulted in an AKT overactivation and less insulin response. These results show that insulin reduces ischemia-induced cardiomyocyte necrosis through an AKT and NF- κ B dependent mechanism. Moreover, VCAM-1 regulates this protective role of insulin during ischemia. These novel findings clarify the role of insulin during ischemia and propose a new function of VCAM-1 as an insulin signaling regulator.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Generalidades

El corazón es un órgano vital que actúa como una “bomba”, el cual es responsable de que la sangre llegue a los distintos tejidos y células del organismo. Está constituido principalmente, por células endoteliales, musculares lisas, fibroblastos y cardiomiocitos¹. Estos últimos tienen capacidad contráctil y son los que otorgan la función contráctil. Los cardiomiocitos son células altamente diferenciadas² y aunque se ha descrito proliferación, ésta es extremadamente baja, menos del 0,1%³. Por lo tanto, su capacidad de regeneración es casi nula. Además, el corazón está constantemente sometido a eventos estresores que pueden inducir diferentes formas de muerte celular⁴, lo cual podría traducirse en una menor función contráctil y menos expectativas de vida⁵. De hecho, la principal causa de muerte, en Chile (<http://www.deis.cl>) y el mundo (<http://www.who.int>), corresponde a enfermedades cardiovasculares (ECV). En el año 2008 se estimaron 17,3 millones de personas fallecidas por ECV en el mundo, y para el 2030 se estima que un total de 23,6 millones de personas fallecerán. Dentro de las ECV se encuentran: hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca reumática, arritmias, aterosclerosis (y en esta, la enfermedad coronaria cardíaca), enfermedad cardíaca congénita y cardiomiopatías. Todas estas enfermedades, pero principalmente hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca y enfermedad coronaria cardíaca pueden producir isquemia, es decir, privación de nutrientes y oxígeno a las células del corazón, lo que podría reflejarse en un infarto y finalmente la muerte del paciente. Por lo tanto, es urgente desarrollar terapias para el tratamiento de las ECV, en especial la isquemia o infarto cardíaco.

3.2 Isquemia/Reperusión (I/R)

Isquemia cardíaca corresponde a una disminución parcial o total del flujo sanguíneo de alguna arteria, no obstante, también puede producirse por aumento de la demanda energética del tejido o durante intervenciones quirúrgicas para corregir el problema, por ejemplo, un trasplante de corazón⁶. Durante la isquemia, debido a falta de nutrientes y oxígeno, se incrementa la glicólisis y la producción

de ácido láctico, lo cual lleva a una disminución del pH en los cardiomiocitos. Este incremento en la concentración de protones intracelulares estimula a los intercambiadores Na^+/H^+ ⁷. Luego, producto de la disminución del ATP se reduce el funcionamiento de los diferentes mecanismos de transporte activo, aumentando la concentración intracelular de Na^+ , lo que estimula a los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, elevándose la concentración de Ca^{2+} intracelular^{8,9}. Además, todo este movimiento de iones y acumulación de metabolitos, como el lactato, llevan a un incremento de la osmolaridad intracelular, y por lo tanto movimiento de agua hacia el medio intracelular generando hinchamiento de las células¹⁰, y finalmente una posible ruptura de los compartimentos membranosos como mitocondrias y lisosomas (**Figura 1**). Por otro lado, el bajo pH puede disminuir la activación del poro de transición mitocondrial (MTP), un factor importante en la muerte celular. Si el episodio de isquemia no es muy prolongado, posiblemente los cardiomiocitos serán capaces de compensarla. Por ejemplo: la isquemia puede ser compensada mediante autofagia, mecanismo por el cual se reciclan diferentes componentes y sustratos celulares⁴. Además, si la reducción en los niveles de ATP no es tan drástica, distintas bombas transportadoras (Na^+/K^+ ATPasa, H^+ y SERCA) pueden amortiguar los cambios de osmolaridad. También, se ha descrito que los cardiomiocitos poseen transportadores de lactato, que funcionan en simporte con protones, presentando una alta capacidad para el transporte de este metabolito, esto es relevante ya que durante la isquemia el lactato debe ser rápidamente sacado de la célula para evitar cambios de pH y osmolaridad¹¹. En resumen, mientras mayor sea el tiempo de isquemia mayor será el daño causado por esta condición.

Isquemia/Reperfusión

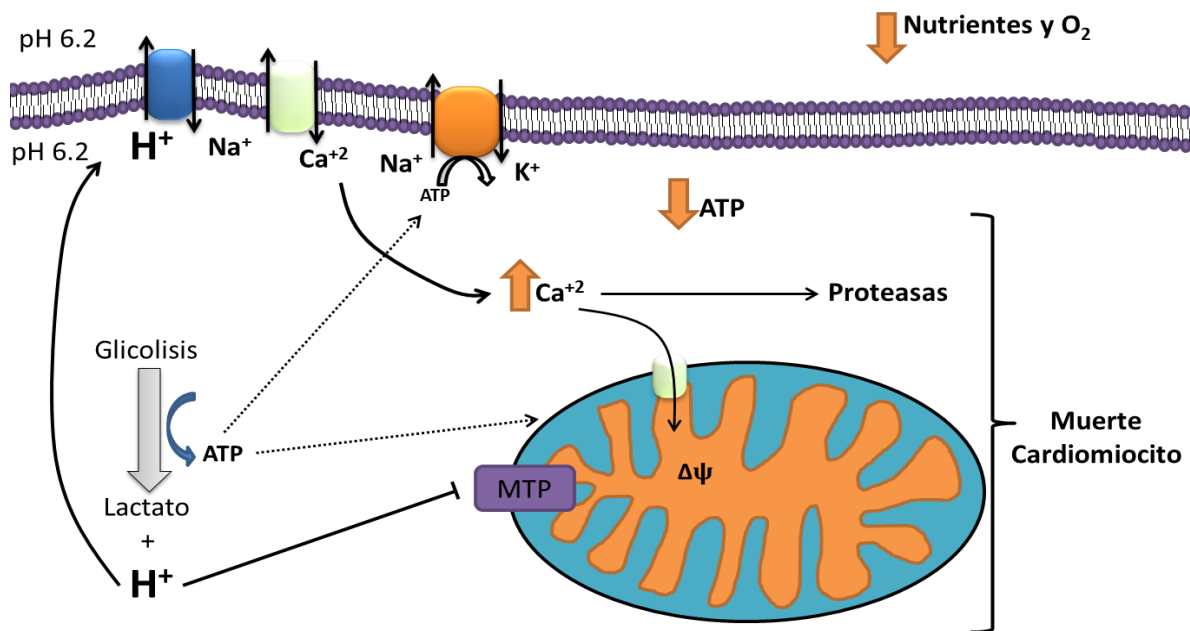


Figura 1. Representación de los mecanismos moleculares que generan daño durante la isquemia. Debido a la disminución de los nutrientes se induce la formación de ácido láctico, lo cual disminuye el pH al interior del cardiomiocito. Producto del aumento de la concentración de protones, los intercambiadores Na^+/H^+ comienzan a trabajar en modo reverso, sacando protones e ingresando sodio. Luego, los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sacan sodio e ingresan calcio. Este desbalance de iones, ingreso de calcio y falta de ATP, puede significar alteraciones en la permeabilidad de la membrana, activación de proteasas y finalmente la inducción de muerte celular¹².

Una vez que se restaura el flujo sanguíneo, en la reperfusión, las células nuevamente están en presencia de un ambiente rico en nutrientes y oxígeno, sin embargo, el pH en el medio extracelular ya no es tan ácido como en la situación de isquemia, por lo tanto la gradiente que estimula a los intercambiadores Na^+/H^+ se incrementa, y el desbalance de iones se hace aún mayor, generándose una entrada excesiva de Ca^{2+} . Este incremento sostenido de las concentraciones de Ca^{2+} puede llevar a la activación de proteasas como caspasas y calpains^{13,14}, las cuales podrían degradar proteínas funcionales y estructurales del cardiomiocito¹⁵. De hecho, se ha reportado que el uso de inhibidores de intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, disminuye el daño cardíaco^{7,8,16}. Además, en la mitocondria se produce incremento del ingreso de Ca^{2+} , y con la recuperación del metabolismo aeróbico,

se generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Todo esto favorece la apertura del MTP¹⁷, luego disminuye el ATP y se genera una pérdida de la homeostasis de iones. Finalmente, se gatillan distintos mecanismos de muerte en el cardiomiocito⁴ (Figura 2).

Debido a que en un infarto al miocardio, en una intervención quirúrgica o en un trasplante, ocurre primero isquemia y luego reperfusión, gran parte de los estudios se han enfocado en estudiar lo que sucede en la reperfusión, y aunque los mecanismos moleculares de la isquemia y la reperfusión son diferentes, es claro que en ambos procesos hay daño y muerte celular. Por ende, es importante determinar los mecanismos celulares que reduzcan la muerte de los cardiomiocitos tanto en isquemia como en reperfusión.

Isquemia/Reperfusión

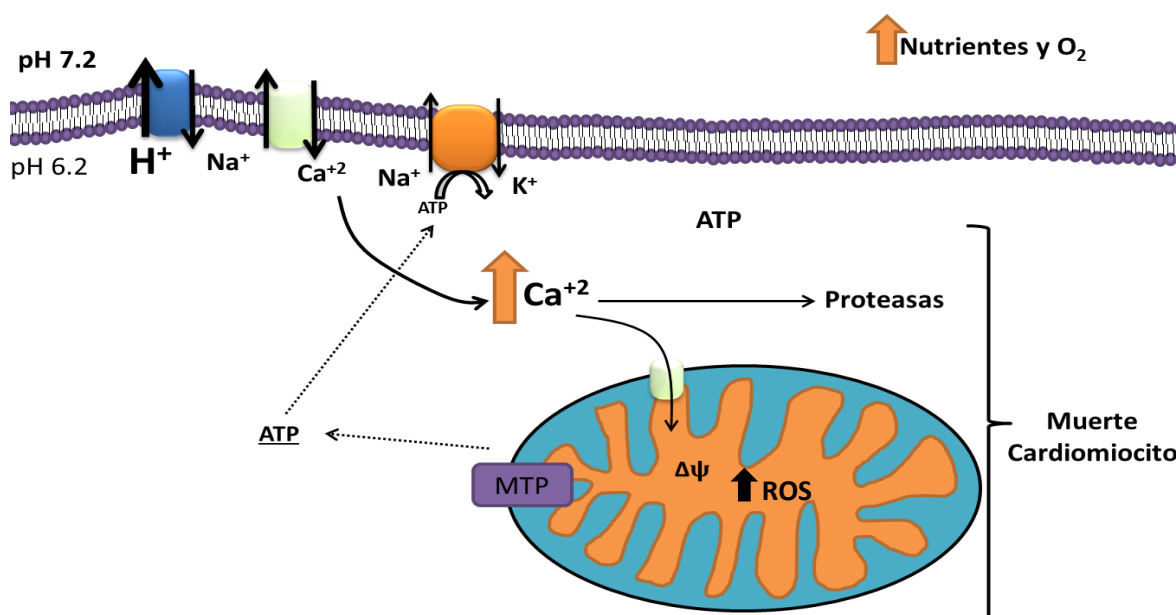


Figura 2. Mecanismos moleculares que generan daño durante la reperfusión. Luego de la isquemia cuando los nutrientes son restablecidos junto con el pH, en el interior del cardiomiocito los protones aún continúan elevados, esta gradiente favorece mucho más el juego de intercambiadores, gatillándose una excesiva entrada de calcio y desbalance de iones. Por otro lado, la restauración de los nutrientes induce un exceso en la producción de ROS mitocondriales. Todo esto se traduce en daño y muerte celular¹².

3.3 Cardioprotección de insulina

En 1962 Sodi-Pallares *et al* realizaron infusiones intravenosas de **G**lucosa, **I**nsulina y **P**otasio (GIK) a pacientes luego de un infarto agudo al miocardio, observando mejor recuperación¹⁸. Esta observación marcó el inicio de la descripción de los mecanismos por los cuales insulina sería un agente cardioprotector. En el corazón, la insulina regula diversos procesos: el metabolismo de la glucosa y los lípidos, el tamaño celular y la función contráctil, entre muchos otros¹⁹. En efecto, corazones de ratones mutantes carentes del receptor de insulina (RI) presentan una disminución en los siguientes parámetros: el tamaño, la incorporación de glucosa, las reservas de glicógeno, y la función cardíaca¹⁹. También se ha descrito que esta hormona incrementa la función contráctil en presencia de menor presión parcial de oxígeno, en un modelo de isquemia por baja perfusión del corazón en caninos^{20,21}. En modelo de isquemia regional en perfusión por Langendorff se ha descrito que la presencia de la hormona insulina disminuye el tamaño del infarto²². Por otro lado, en el modelo de cultivo primario de cardiomiocitos neonatos se ha observado que insulina produce los siguientes efectos: a) su ausencia incrementan ROS, produce daño del DNA mitocondrial y aumenta la apoptosis²³; b) inhibe la apoptosis inducida por isquemia/reoxigenación²⁴; c) inhibe el daño inducido por la estimulación β -adrenérgica durante I/R²⁵. En clínica, esta hormona se ha utilizado en intervenciones quirúrgicas de *bypass* coronario optativas, observándose disminución del daño cardíaco⁶. Por el contrario, en un meta análisis de ensayo clínico denominado CREATE-ECLA (*The Clinical Trial of Metabolic Modulation in Acute Myocardial Infarction Treatment Evaluation-Estudios Cardiológicos Latinoamérica*) no encontraron resultados positivos en la utilización de GIK²⁶. Esta incongruencia en los efectos protectores de insulina, en el uso clínico frente a la isquemia cardíaca, se han atribuido a la temporalidad en la cual se ha administrado insulina, por lo cual se ha propuesto que utilizar insulina en etapas tempranas de la isquemia sería más efectivo²⁷.

3.4 Señalización de insulina en corazón

Insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos formada por dos péptidos, A y B, de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, unidos por dos puentes disulfuro²⁸. Esta hormona participa en la regulación de la homeostasis de la glucosa, a través de la estimulación del ingreso de glucosa a la célula, principalmente células musculares y adiposas. El RI corresponde a un tetrámero formado por dos subunidades α extracelulares y dos β transmembrana expuestas hacia el citosol, las cuales se unen por puentes disulfuro. Este receptor presenta actividad tirosina quinasa intrínseca en las subunidades β , las cuales son inhibidas alostéricamente por las subunidades α . El RI, en presencia de insulina, sufre un cambio conformacional en las subunidades α , que dejan de inhibir, activando a las tirosinas quinasa intrínseca de las subunidades β ²⁹. Luego, el RI activado fosforila a IRS 1/2 (*insulin receptor substrate protein 1/2*)^{30,31}, entre muchos otros, lo cual desencadena principalmente dos cascadas río abajo: a) Vía PI3K/AKT, que regula: glicogénesis³², síntesis de proteínas, autofagia, sobrevivencia celular³³, ingreso de glucosa a la célula³⁴ y transcripción de genes³⁵. b) Vía MAPK ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*), que inhibe la apoptosis³⁶, estimula la síntesis de proteínas³⁷ y regula la transcripción de genes^{38,39}. Estas dos vías son claves en los efectos protectores de insulina. De hecho, el preconditionamiento de cultivos primarios de cardiomiocitos, con pequeños ciclos de hipoxia/reoxigenación, protege del daño que produce una hipoxia/reoxigenación más prolongada⁴⁰. Esto debido a que el preconditionamiento activa a AKT, lo cual inhibe la apoptosis por fosforilación de BAD (*Bcl-2-associated death promoter*); menor liberación mitocondrial del citocromo c; y prevención de la activación de caspasas⁴⁰. De manera similar, la inhibición de ERK 1/2 durante isquemia/reoxigenación en modelo de cultivo primario de cardiomiocitos neonatos y Langendorff incrementa la apoptosis y disminuye funcionalidad cardíaca⁴¹.

Existen evidencias que insulina puede activar y modular al factor transcripcional NF- κ B (*nuclear factor kappa B*)⁴²⁻⁴⁵. Por ejemplo, Iwasaki *et al* observaron que

insulina, en línea celular de hepatocito, incrementó la actividad transcripcional de NF- κ B determinada mediante gen reportero luciferasa⁴³. Mackesy *et al* mostraron que insulina incrementa translocación nuclear de NF- κ B⁴⁴. Además, previamente nuestro grupo describió, en cardiomiocitos, que la proteína mitocondrial OPA-1 q participa en la fusión mitocondrial, es regulada por la vía insulina/AKT/NF- κ B⁴⁶. También está descrito que señales río abajo de insulina, como PI3K/AKT y/o ERK1/2, también pueden activar NF- κ B^{42,47-50}. Sin embargo, se desconoce si insulina puede inducir la activación de NF- κ B en isquemia.

3.5 NF- κ B: potencial efector en la protección de insulina

En condiciones basales, sin estímulos como factores de crecimiento e interleuquinas, el dímero NF- κ B se encuentra inactivo y secuestrado en el citoplasma por la proteína I κ B α (inhibidor de kappa B alfa). En presencia de estímulo, se activa el complejo IKK (*quinasa de I κ B*), que fosforila a I κ B α , induciendo su ubiquitinación y degradación. Este evento libera al dímero NF- κ B, exponiendo su señal de localización nuclear, lo cual permite su transporte al núcleo, donde se une a secuencias de DNA específicas (5'-GGGACTTTC-3') para regular la expresión genes. Finalmente, esto se traduce en efectos celulares que influyen en la supervivencia, proliferación, inflamación y apoptosis, entre muchos otros⁵¹.

Respecto al rol de NF- κ B durante I/R, se ha observado *in vivo* que ratones mutantes que expresan un súper-represor de NF- κ B, presentan incremento en el tamaño de infarto y de células apoptóticas luego de ligación coronaria⁵². Así mismo, *ex vivo* en modelo Langendorff, el preconditionamiento con pequeños ciclos de I/R estaría protegiendo de isquemia prolongada mediante la activación de NF- κ B^{53,54}. Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que NF- κ B cumple un papel importante en la protección frente a I/R. No obstante, la regulación de NF- κ B por insulina durante la isquemia y la función de esta señalización son desconocidos. NF- κ B es un factor transcripcional que regula muchas funciones en la célula, entre ellas la adhesión celular a través de la transcripción de genes como ICAM-1 y VCAM-1.

3.6 VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular-1)/CD106/INCAM-110

Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular cumplen importantes funciones como supervivencia y proliferación celular, mantención de la integridad de un tejido, organogénesis y respuesta inflamatoria, entre muchas otras⁵⁵. Dentro de las proteínas que participan en estas interacciones, se encuentran las integrinas, cadherinas, selectinas y las moléculas de adhesión celular (CAMs)⁵⁵. Estas últimas, que principalmente participan en interacciones célula-célula, pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs), las cuales se caracterizan por tener una región extracelular con repeticiones de dominios tipo Igs, una zona transmembrana y un carboxilo terminal bastante conservado⁵⁶. Dentro de las CAMs se encuentran proteínas como PECAM, NCAM, ICAM-1/2/3 y VCAM-1, entre otras.

VCAM-1 se expresa en varios tejidos⁵⁷, pero su función se ha estudiado principalmente en endotelio vascular. A rasgos generales, durante la inflamación se liberan citoquinas y otros factores que incrementan los niveles e inducen la exposición de VCAM-1 a la superficie de celular. Esto permite el reclutamiento y adhesión de células, principalmente leucocitos, por medio de la interacción con su ligando integrina $\alpha_4\beta_1$, que se encuentra presente en la superficie de los leucocitos. Finalmente, VCAM-1 junto a otras moléculas de adhesión inducen el rearrreglo del citoesqueleto y la disociación de las interacciones entre las células endoteliales, permitiendo la trans migración y extravasación de los leucocitos hacia la zona del daño^{58,59}.

La síntesis de VCAM-1 puede ser inducido por varios factores, por ejemplo: agentes microbianos como lipopolisacárido (LPS)⁶⁰ y citoquinas proinflamatorias como TNF α inducen su expresión en células endoteliales⁵⁷; hipoxia incrementa los niveles de VCAM-1 en la línea celular de cardiomiocitos HL-1⁶¹; altos niveles de glucosa y lípidos inducen su expresión en vasos sanguíneos de retina de ratón⁶². Siendo la vía clásica de inducción de VCAM-1 a través de la activación de NF- κ B^{57,63-66}.

VCAM-1 cumple un rol en el sistema cardiovascular, pues ratones que carecen del gen que codifica para VCAM-1 no son viables ya que no desarrollan correctamente el corazón y la placenta⁶⁷. Además, la delección de su ligando, integrina α_4 , genera un fenotipo similar⁶⁸. VCAM-1 participa en el desarrollo muscular, permitiendo la organización y fusión de los mioblastos⁶⁹. Asimismo, esta proteína promueve la fusión de células hematopoyéticas y línea celular HL-1 en respuesta a hipoxia⁶¹. También, la interacción VCAM-1/integrina $\alpha_4\beta_1$, en modelo de rata, participa en la inervación simpática del corazón⁷⁰. Interesantemente, dos trabajos propusieron a esta proteína como marcador de diferenciación de cardiomiocitos obtenidos a partir de células troncales y embrionarias inducidas^{71,72}. VCAM-1, induce activación de PI3K y ERK1/2. En modelo de células musculares lisas humanas induce activación de ERK1/2⁷³. En modelo de cáncer activa la rama de señalización PI3K/AKT, estimulando la supervivencia de células de cáncer de mama que hacen metástasis hacia los pulmones⁷⁴. También, nuestro grupo detectó altos niveles de VCAM-1 en cardiomiocitos presentes en biopsias de corazón humano⁷⁵. Esta proteína, en células endoteliales presenta niveles muy bajos. Por el contrario, en células musculares y otros tipos celulares su expresión es constitutiva^{57,75,76}. Todos estos antecedentes sugieren que VCAM-1 podría tener una función clave en el corazón y los cardiomiocitos. Finalmente, se ha descrito que insulina incrementa los niveles de VCAM-1 en modelo de células endoteliales^{44,45,77}. Por lo tanto, los efectos cardioprotectores de insulina podrían estar regulados por NF- κ B y/o VCAM-1.

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los efectos cardioprotectores de insulina frente a I/R aún son controversiales. Insulina activa NF- κ B⁴⁶, en condiciones de normoxia, sin embargo, la activación y el rol de esta vía durante isquemia son desconocidos. En células endoteliales, la insulina incrementa los niveles de VCAM-1^{45,77}. A esta proteína se le han atribuido otras funciones no relacionadas con inflamación, entre estas: es esencial para el desarrollo del corazón^{67,78}; participa en la diferenciación muscular⁶⁹; fue propuesta como marcador de diferenciación de cardiomiocitos a partir de células troncales inducidas^{71,72}; en ratas, participa en la inervación simpática del corazón⁷⁰; en células de cáncer transmite señales de supervivencia⁷⁴; sus niveles se encuentran elevados en cardiomiocitos de biopsias auriculares humanas⁷⁵. Por lo tanto, VCAM-1 podría regular alguna función importante en el cardiomiocito y/o participar en la función protectora de insulina frente a isquemia. En base a los antecedentes se propone que insulina podría proteger de la isquemia a través de la activación de NF- κ B, y además esta cardioprotección sería afectada por la disminución de VCAM-1.

4.1 HIPÓTESIS

“VCAM-1 es necesario para la función protectora de insulina en un modelo de isquemia simulada en cardiomiocitos de rata neonata”

4.2 OBJETIVO GENERAL:

Demostrar que VCAM-1 participa en la función cardioprotectora de insulina en un modelo de isquemia simulada en cardiomiocitos de rata neonata.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Demostrar que insulina protege de la muerte en el modelo de isquemia simulada en cardiomiocitos de rata neonata.
2. Evaluar el efecto de la disminución de VCAM-1 en la protección por insulina en isquemia simulada.
3. Estudiar el efecto de la disminución de VCAM-1 en la señalización de insulina durante isquemia simulada.

5 METODOLOGÍA.

5.1 Animales.

Ratas Sprague-Dawley se obtubieron del bioterio de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los estudios se revisaron y aprobaron por el Comité de Bioética de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas de la U. de Chile, en acuerdo con “*National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”.

5.2 Cultivo de cardiomiocitos neonatos.

Los cardiomiocitos se aislaron de corazones de ratas de 1 a 3 días de edad de acuerdo a un protocolo previamente descrito⁷⁹. Brevemente, los corazones aislados se disgregaron mecánicamente mediante bisturí y se sometieron a sucesivas digestiones enzimáticas con colagenasa tipo II (0.2 mg/mL) y pancreatina (0.6 mg/mL). Luego, las células se preplaquearon para enriquecer el cultivo en cardiomiocitos y descartar otros tipos celulares. La fracción de cardiomiocitos se sembró a una densidad de $1 \times 10^6 / \text{mm}^2$ sobre placas de 35 mm precubiertas con gelatina y mantenidas con medio cultivo para cardiomiocitos, DMEM:M199 (4:1) suplementado con 10% SBF (Suero Bovino Fetal) y antibióticos por 24 horas en un incubador a 37 °C, 5% CO₂ y 95% aire.

5.3 Isquemia simulada (IS).

1×10^6 cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm, luego de 48 horas se sometieron a isquemia simulada [en mM]: HEPES [5], 2-deoxi-glucosa [10], NaCl [139], KCl [12], MgCl₂ [0.5], CaCl₂ [1.3], ácido láctico [20], pH 6.2. Luego, las células se colocaron al interior de una cámara sellada, a la cual se le desplazo el O₂ mediante 100% N₂ (O₂ <1%) inyectado durante 30 minutos. Finalmente, la cámara se dejó incubando a 37°C por 8 horas –excepto figura 37, donde la isquemia fue efectuada durante 1 hora– en presencia o ausencia de insulina. La falta de glucosa y otros nutrientes, el bajo pH, las altas concentraciones de potasio y lactato simulan lo ocurrido durante isquemia cardiaca *in vivo*. Protocolo adaptado de Pedrozo *et al*¹⁵. Debido a disponibilidad técnica, para los objetivos 2 y 3, las IS se realizaron con una composición de gases 95% N₂ y 5% CO₂ (O₂ <1%), los

porcentajes de muerte y protección fueron comparados mediante liberación de LDH al medio, se observaron niveles de muerte celular similares (**Figura Anexa A1**).

5.4 PCR en tiempo real.

El RNA total se extrajo mediante mini columnas de EZNA, luego se cuantificó por absorbancia a 260/280 nm mediante nanodrop. Después, a partir de 1 µg de RNA se realizó transcripción inversa para generar el cDNA. El programa de PCR en tiempo real (LightCycler® 480 Instrument, Roche) que se utilizó, fue el siguiente: 1 ciclo (95°C por 10 minutos), 40 ciclos (95°C por 10 segundos, 60°C por 15 segundos, y 72°C por 15 segundos), y 1 ciclo (95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, y 95°C por 30 segundos). Se utilizaron partidores específicos para rata (**Tabla 1**). Los partidores para *Vcam-1* (número de acceso NM_012889.1) se diseñaron mediante la utilización de los softwares PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) y Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Brevemente, el cDNA obtenido de células controles se diluyó en seriadamente en 1:5, 1:50, 1:500, 1:5000 y 1:50000. Luego, se realizó la reacción de PCR en las condiciones descritas arriba. Se determinó eficiencia y curvas de disociación de los productos de PCR (**Figuras Anexas A2**). Como controles endógenos se utilizaron *Gapdh* y *18S*^{46,80}.

Tabla 1. Secuencia partidores utilizados para la detección de mRNA específicos.

Partidor	Secuencia
<i>Vcam-1</i> sentido	5'-ACACCGGGAAAGCTCTTGTT-3'
<i>Vcam-1</i> antisentido	5'-TTGAGCAGGTCAGGTTACA-3'
<i>Gapdh</i> , sentido	5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'
<i>Gapdh</i> , antisentido	5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'
<i>18S rRNA</i> , sentido	5'- GGATCCATTGGAGGGCAAGT-3',
<i>18S rRNA</i> , antisentido	5'-ACGAGCTTTTAACTGCAGCAA-3'

5.5 Extractos celulares y cuantificación de proteínas.

Las células obtenidas de las distintas condiciones experimentales se lisaron con amortiguador RIPA (Tris-HCl pH 7,5 50 mM; NP-40 1%; deoxicolato de sodio 2,5 mM, dodecil sulfato de sodio 0,1%; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; NaF 50 mM; suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa), luego se sonicaron por 4

minutos y centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C, los sobrenadantes se recuperaron y guardaron a -80°C hasta su uso.

Para la obtención de los extractos citosólicos y pellets nucleares los cardiomiocitos fueron tripsinizados y centrifugados a 500 x g por 5 minutos, luego fueron lavados con PBS y centrifugados a 500 x g por 5 minutos. Luego, se realizó una lisis hipotónica de acuerdo a las instrucciones del kit NE-PER (ThermoFisher Scientific). Finalmente, se obtuvieron los extractos citosólicos y pellets nucleares, estos últimos fueron lavados con PBS con el fin de eliminar la contaminación citosólica. Las proteínas se cuantificaron mediante Bradford (Sigma-Aldrich) y las diferentes muestras se guardaron a -80°C hasta su uso.

5.6 Determinación de VCAM-1 soluble.

Luego de realizar la IS en presencia o ausencia de insulina, se colectó el sobrenadante isquémico y se centrifugó a 15000 x g a fin de descartar los restos celulares. Luego, se recuperó el sobrenadante y fue concentrado 10 veces mediante columnas Microcon-10kDa según las instrucciones del fabricante (Merk MilliPore). Luego de sucesivas centrifugaciones, 1 mL fue concentrado a 100 uL. Se invirtió la columna y se recuperó el volumen remanente de esta (~100 uL). Se agregó tampón de carga y se realizó una electroforesis con 50 uL del sobrenadante. Finalmente, las proteínas fueron detectadas por *western blot*. La forma soluble de VCAM-1 es cortada al final de la región transmembrana, generándose un producto de alrededor de los 100-110 kDa^{81,82}. Estas columnas permiten filtrar todas las moléculas con tamaños menores a 10 kDa, por lo tanto, a medida que disminuye el volumen el medio, este se va enriqueciendo en moléculas de pesos moleculares mayores a 10 kDa, entre ellas, VCAM-1 soluble.

5.7 Electroforesis de proteínas y electrotransferencia

40 µg de proteínas fueron cargadas en geles SDS-PAGE en gradiente 20-5%, la electroforesis fue realizada a 120 V por 2 horas. Terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) a 400 mA por 1,5 horas (objetivo 1), o transferidas a nitrocelulosa a 25 Volts por 7 minutos (Tans-Blot Turbo blotting system, Bio-Rad) (Objetivos 2 y 3).

5.8 Western blot.

Las membranas de PVDF, utilizadas en objetivo 1; o nitrocelulosa, utilizadas en objetivos 2 y 3, se bloquearon por 30 minutos con 3% leche descremada en TBS-Tween 0,1% (tampón tris salino-tween), después se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios toda la noche a 4 °C (**Tabla 2**). Luego, las membranas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (objetivo 1) o conjugados con sondas fluorescentes (objetivo 2 y 3). Finalmente, las imágenes se adquirieron en un equipo de captura digital de luminiscencia (Syngene G:BOX, objetivo 1) o mediante captura digital de infrarrojo (ODYSSEY CLx imager, objetivos 2 y 3).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados. La dilución 1/50 fue utilizada para las inmunofluorescencias. Todas las otras diluciones fueron utilizadas para los *western blots*. pS, fosforilación en residuo de serina; pT, fosforilación en residuo de treonina; pY, fosforilación en residuo de tirosina. CS, Cell Signalling. SC, Santa Cruz.

Anticuerpo	Código	Dilución
AKT ratón	CS 2920	1/2000
pS473 AKT conejo	CS 4060	1/2000
pT308 AKT conejo	CS 2975	1/1000
GSK3 α/β conejo	CS 5676	1/1000
pS21/9 GSK3 α/β conejo	CS 9331	1/1000
Caspasa 3 conejo	CS 9665	1/1000
PARP conejo	CS 9532	1/1000
p65 conejo	CS 8242	1/1000
pS536 p65 conejo	CS 3033	1/1000
I κ B α ratón	CS 4814	1/1000
ERK1/2 conejo	CS 9107	1/1000
pT202/pY204 ERK1/2 conejo	CS 4376	1/1000
BAD conejo	CS 9239	1/1000
pS136 BAD conejo	CS 4366	1/1000
IRS1 conejo	CS 3407	1/1000
pS307 IRS1 conejo	CS 2381	1/1000
S6 ratón	CS 2317	1/1000
pS240/244 S6 conejo	CS 5364	1/1000
GAPDH conejo	CS 2118	1/1000
β -actina ratón	CS 3700	1/1000
VCAM-1 conejo C-19	SC 1504	1/50 1/200 1/1000
VCAM-1 conejo H-276	SC 8304	1//50 1/200
VCAM-1 ratón MR106	SC 53548	1/50 1/200

5.9 Transfección de cardiomiocitos.

Los cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA, para VCAM-1 y control *scramble* (Tabla 3), mediante RNAiMAX (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, al día siguiente del sembrado, los cardiomiocitos fueron lavados 3 veces con PBS, luego fueron incubados con lipofectamina RNAiMAX preparada en Opti-MEM durante toda la noche. Al día siguiente esta solución se cambió por medio de mantención de cardiomiocitos. Finalmente, todos los experimentos se realizaron 48 horas luego de realizar la transfección. El silenciamiento de VCAM-1 se denominó siVCAM-1 y el silenciamiento control como siControl.

Tabla 3. siRNAs utilizados en los experimentos de transfección. Para los experimentos se escogió el mix de dos siVCAM-1 1+2 (**Figura Anexa A3**).

siRNA	Sigma-Aldrich código	concentración
siVCAM-1 1	SASI_Rn01_00066469	100 nM
siVCAM-1 2	SASI_Rn01_00066470	100 nM
Mezcla siVCAM-1 1+2		50 nM 1 + 50 nM 2
siControl	SIC001	100 nM

5.10 Evaluación de la muerte celular.

Los cardiomiocitos, se sometieron a IS en presencia o ausencia de insulina, se analizó la muerte celular por: **a) viabilidad**, mediante exclusión por azul de Tripán. Las células fueron lavadas con PBS y luego resuspendidas con tripsina por 2 minutos, después rápidamente fueron teñidas con azul de Tripán, y se contaron células vivas (no teñidas azules); **b) degradación de DNA por TUNEL**, se determinó el número de células TUNEL positivas [mediante *In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein* (Roche)] del promedio de 3 campos al azar obtenidos por microscopía de epifluorescencia para cada experimento independiente; **c) población subG1**, mediante citometría de flujo se detectaron los niveles de yoduro de propidio incorporado a las células¹⁵; **c) Necrosis**, se determinó la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (LDH) presente en el medio cultivo (Promega). Los resultados se expresaron como porcentaje de cambio respecto al control de normoxia.

5.11 Inmunofluorescencia.

Los cardiomiocitos se sembraron sobre un cubreobjeto y expuestos a las diferentes condiciones experimentales. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 minutos, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS por 10 minutos (este paso fue omitido en las condiciones sin permeabilizar), luego se bloquearon con BSA 1% en PBS a temperatura ambiente por 1 hora. Luego, se incubaron con anticuerpo primario a 4°C toda la noche, se lavaron con PBS e incubaron con su respectivo anticuerpo secundario diluido en 1% BSA en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Los cubreobjetos con las células se colocaron en portaobjetos mediante medio de montaje (Dako Denmark), y finalmente se observaron al microscopio de epifluorescencia y/o confocal (LSM510, Carl Zeiss).

5.12 Análisis de imágenes.

Las imágenes para densitometría se cuantificaron con el *software* UN-SCAN-IT gel (versión 6.1). Las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia se procesaron mediante ImageJ (versión 1.48v).

5.13 Expresión de resultados y análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como promedio \pm SEM (error estándar medio). Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada condición de trabajo y se presentó la figura representativa del experimento. Las comparaciones entre los distintos grupos experimentales se realizaron utilizando el *software* GraphPad Prism 6 realizando t-Student para 2 grupos o ANOVA para más de dos grupos (una vía o dos vías, para una o dos condiciones respectivamente). Se utilizó un Post test Tukey. Se estableció como nivel de significancia un $p \leq 0,05$.

6 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Demostrar que insulina protege de la muerte en el modelo de IS en cardiomiocitos de rata neonata.

Raciocinio: Debido a que la función protectora de insulina frente a infarto cardiaco aún permanece en discusión, este trabajo de tesis evaluó si insulina es protectora frente a un modelo de IS en cardiomiocitos. Ya que previamente nuestro grupo demostró que la vía insulina/AKT/NF- κ B regula el metabolismo del cardiomiocito en condiciones de normoxia⁸³. Por lo tanto, se evaluó la participación de esta vía en la protección frente a IS.

Diseño experimental: cultivos primarios de cardiomiocitos fueron incubados con y sin insulina 10 nM, luego fueron sometidos a IS. Se determinó el efecto protector de insulina frente a isquemia mediante muerte por: **a) Viabilidad** por exclusión por azul de Tripán. **b) Apoptosis**, por TUNEL y/o mediante ioduro de propidio para detectar población subG1 por citometría de flujo; **c) Necrosis** por LDH en el medio de cultivo. Para estudiar la activación de AKT se analizó la fosforilación de su “loop” de activación (pT308), la fosforilación regulatoria que permite a esta quinasa estar en una conformación activa (pS473), y se midió la fosforilación de uno de sus sustratos BAD (pS136)^{33,84}. La activación de NF- κ B se determinó mediante: translocación nuclear de la subunidad p65 por inmunofluorescencia, activación de NF- κ B por fosforilación de la subunidad p65 (pS536) y niveles de I κ B- α (total) por western blot. Para comprobar la participación de este factor se realizó IS por 8 horas en presencia y ausencia de insulina, se intervinieron las vías de señalización mediante los inhibidores AKTi VIII (inhibidor competitivo del dominio de homología a pleckstrina de AKT) y BAY 11-7082 (inhibidor irreversible de la vía NF- κ B, que actúa sobre el complejo IKK).

6.2 Evaluar el rol de VCAM-1 en la protección por insulina en el modelo de IS.

Raciocinio: VCAM-1 es esencial para el desarrollo del corazón^{67,68,78}, se ha propuesto como marcador de diferenciación de cardiomiocitos a partir de células

troncales inducidas^{71,72} y diferenciación muscular⁶⁹. Además, se ha descrito en células endoteliales que insulina incrementa los niveles de VCAM-1^{45,77,85} y en modelo de resistencia a insulina, en este mismo tipo celular, los niveles de VCAM-1 se encuentran elevados^{85,86}. Por lo tanto, VCAM-1 podría ser un blanco río abajo de la señalización de insulina y/o un regulador de la señalización de insulina. **Diseño experimental:** cultivos primarios de cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1, luego cultivados con y sin insulina 10 nM y sometidos a IS. Mediante western blot y RT-PCR en tiempo real, se determinaron niveles proteicos y de mRNA, respectivamente, para VCAM-1. Se evaluó el efecto protector de insulina por LDH y TUNEL.

6.3 Estudiar el efecto de la disminución de VCAM-1 en la señalización de insulina durante IS.

Raciocinio: La disminución de VCAM-1 podía producir cuatro posibles resultados: a) VCAM-1 podría estar río abajo de la señalización de insulina, ya que se ha descrito que insulina induce exposición de VCAM-1 a la superficie celular^{45,77}. Por lo tanto, su disminución reduciría o incrementaría los efectos protectores de insulina frente a isquemia. b) Que VCAM-1 regule la señalización de insulina, ya que los niveles de VCAM-1 están incrementados en modelo de resistencia a insulina en células endoteliales^{85,86}. No obstante, a nuestro conocimiento no existen antecedentes que asocien estos fenómenos directamente. c) Que VCAM-1 sea esencial para los cardiomiocitos, por lo tanto, se produciría incremento de la muerte solo con el silenciamiento. d) Que el silenciamiento de esta proteína no produzca ningún efecto. **Diseño experimental:** cultivos primarios de cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1, luego cultivados con y sin insulina 10 nM y sometidos a IS. Mediante western blot se determinaron niveles proteicos de VCAM-1 y proteínas involucradas en la señalización de insulina (AKT, IRS-1, ERK y GSK3). Con el fin de describir la localización subcelular de VCAM-1 se realizaron estudios de microscopía confocal, en células permeabilizadas y no permeabilizadas.

7 RESULTADOS

7.1 Objetivo 1: Demostrar que insulina protege de la muerte en el modelo de IS de cardiomiocitos de rata neonata.

7.1.1 Insulina protege frente a isquemia

Previamente, se describió que insulina protege del daño de la I/R²⁴, por lo tanto, se corroboró esta observación en el modelo de trabajo. Se encontró que insulina efectivamente protegió y/o previno el daño generado por I/R simulada (**Figura 3**).

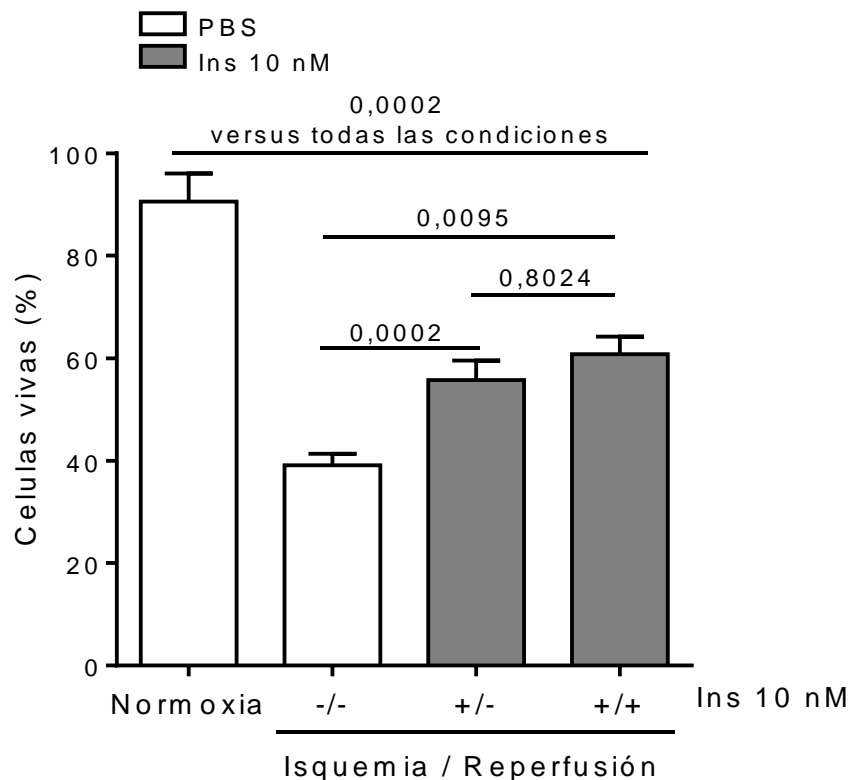


Figura 3. Efecto protector de insulina en isquemia reperfusion simulada (I/R). Cardiomiocitos fueron sometidos 8 horas de isquemia simulada y 16 horas de reperfusion en ausencia (-/-), presencia durante isquemia (+/-) o durante todo el proceso de I/R (+/+) de insulina 10 nM (Ins). Normoxia corresponde al control que contiene nutrientes y oxígeno. Se determinó viabilidad celular mediante conteo por azul de Tripán. Datos expresados en promedio \pm SEM. Tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$ (experimento realizado en colaboración con Claudio Humeres).

El uso clínico de insulina ha tenido controversia, de si es protector o no frente al infarto^{18,26,27,87}. Esto ha sido atribuido a que insulina podría tener mayores efectos

protectores al ser administrada antes del proceso isquémico²⁷, como un precondicionante. Al administrar insulina durante todo el proceso de I/R se recupera significativamente la viabilidad celular frente al control normoxia, no obstante, no se detectaron diferencias significativas entre insulina administrada en isquemia comparada con insulina durante todo el proceso de I/R simulada (**Figura 3**). Un efecto similar fue observado en modelo *ex-vivo* Langendorff (Memoria de Tesis Natalia Montt). Esto estaría indicando que insulina protege de I/R, principalmente inhibiendo la muerte celular durante la isquemia. En base a esta observación se estudió el efecto protector de insulina solo en IS. Por lo cual, primero se estandarizó el tiempo de isquemia por 2, 4 y 8 horas, y se observó una disminución de la viabilidad celular aproximadamente en un 20, 35 y 50%, respectivamente (**Figura 4**). Se escogió el tiempo de 8 horas en el cual se detectó la menor viabilidad, ya que es un porcentaje de muerte en el que la protección por insulina podría ser más evidente. Luego, se titularon diferentes dosis de insulina (1, 10, 50 y 100 nM), y se encontró que la concentración 10 nM de insulina fue la óptima para prevenir y/o reducir la muerte inducida por IS (**Figura 5**). En este mismo experimento se observó que la concentración 1 nM de insulina tendió a disminuir la viabilidad durante IS (**Figura 5**). Además, se corroboró por otras técnicas, y se encontró que IS incrementó el porcentaje de LDH liberada al medio (**Figura 6**), así como también la población apoptótica subG1 (**Figura 7**) y células TUNEL positivas (**Figura 8**). Sin embargo, la presencia de insulina a una concentración de 10 nM redujo todos estos parámetros de muerte celular (**Figuras 5-8**). Estos resultados sugieren que insulina protege y/o previene del daño por IS, inhibiendo la apoptosis y/o necrosis.

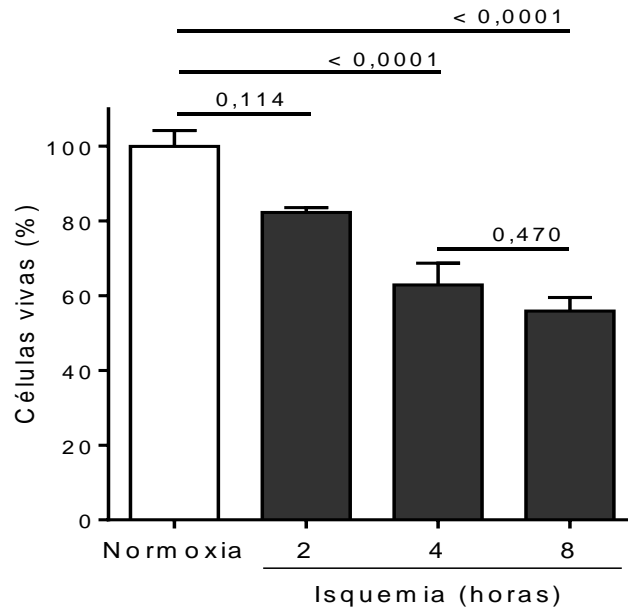


Figura 4. Efecto del tiempo de IS sobre la viabilidad de los cardiomiocitos. Cardiomiocitos neonatos fueron sometidos a IS por 2, 4 y 8 horas. La viabilidad celular fue determinada por azul de Tripán. Datos expresados en promedio \pm SEM. Tamaño muestral de al menos 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de una vía (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$ (experimento realizado en colaboración con Claudio Humeres).

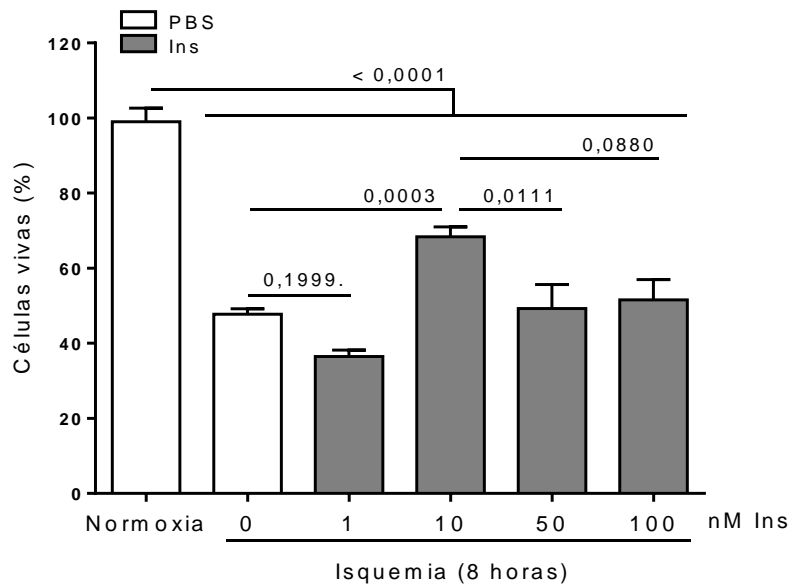


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre la viabilidad en cardiomiocitos sometidos a IS. Cardiomiocitos fueron sometidos a IS por 8 horas en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de insulina (Ins; 0, 1, 10, 50 y 100 nM). La viabilidad celular fue determinada por azul de Tripán. Datos expresados en promedio \pm SEM. Tamaño muestral de al menos 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de una vía (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$ (experimento realizado en colaboración con Claudio Humeres).

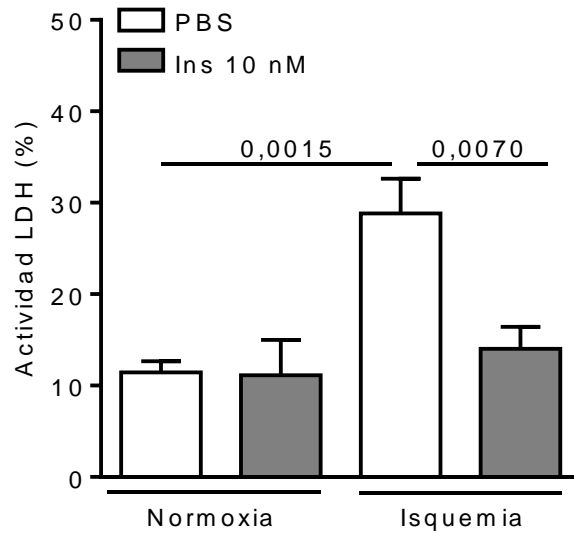


Figura 6. Efecto de insulina sobre la necrosis en cardiomiocitos sometidos a IS. Cardiomiocitos fueron sometidos a IS por 8 horas en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. La muerte celular fue cuantificada por presencia de actividad deshidrogenasa láctica liberada en el medio. Datos expresados en promedio \pm SEM. Tamaño muestral de 5 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vía (p global = 0,0006) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$ (experimento realizado en colaboración con Claudio Humeres).

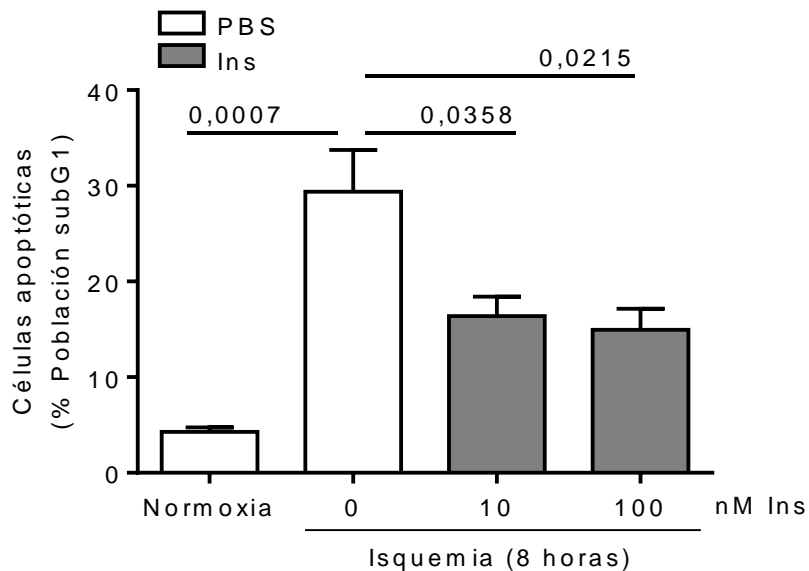


Figura 7. Efecto de insulina sobre el porcentaje de células apoptóticas en cardiomiocitos sometidos a IS. Cardiomiocitos fueron sometidos a IS por 8 horas en presencia o ausencia de insulina (Ins; 10 o 100 nM). Se determinó la población apoptótica subG1 mediante incorporación de yoduro de propidio detectado por citometría de flujo. Datos expresados en promedio \pm SEM. Tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de una vía (p global = 0,0012) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$ (experimento realizado en colaboración con Claudio Humeres).

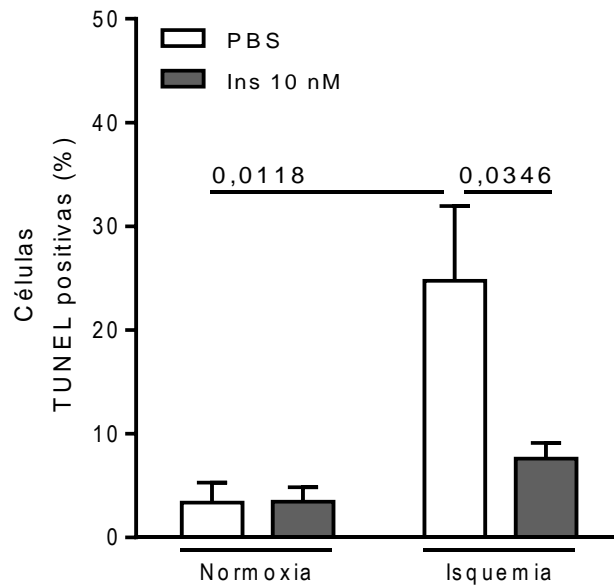
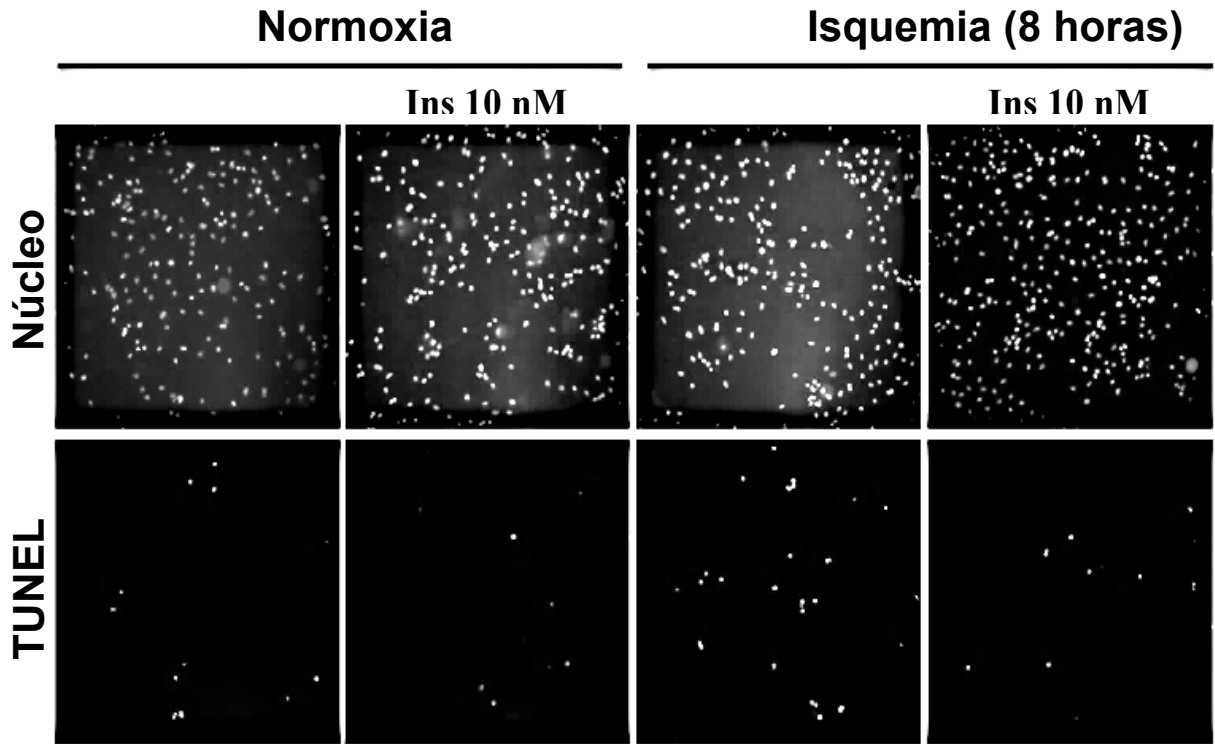


Figura 8. Efecto de insulina sobre el porcentaje de células apoptóticas en cardiomiocitos sometidos a IS. Cardiomiocitos sometidos 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron células TUNEL positivas. Panel superior, imagen representativa de TUNEL. Panel inferior, porcentaje de células TUNEL positivas obtenidas del promedio de 3 campos al azar por experimento. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global = 0,0132) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

7.1.2 Insulina activa a la quinasa AKT en isquemia

Las caspasas son cisteinil-aspartato proteasas las cuales participan en la muerte celular, por lo tanto, se determinó la activación por proteólisis de una de las caspasas ejecutoras, caspasa 3⁴. Tanto caspasa 3 activa (**Figura 9**) como su sustrato PARP (Poli ADP ribosa polimerasa) (**Figura 10**) aumentaron luego de IS, pero insulina no produjo ningún efecto significativo sobre los niveles de estas proteínas (**Figura 9 y 10**).

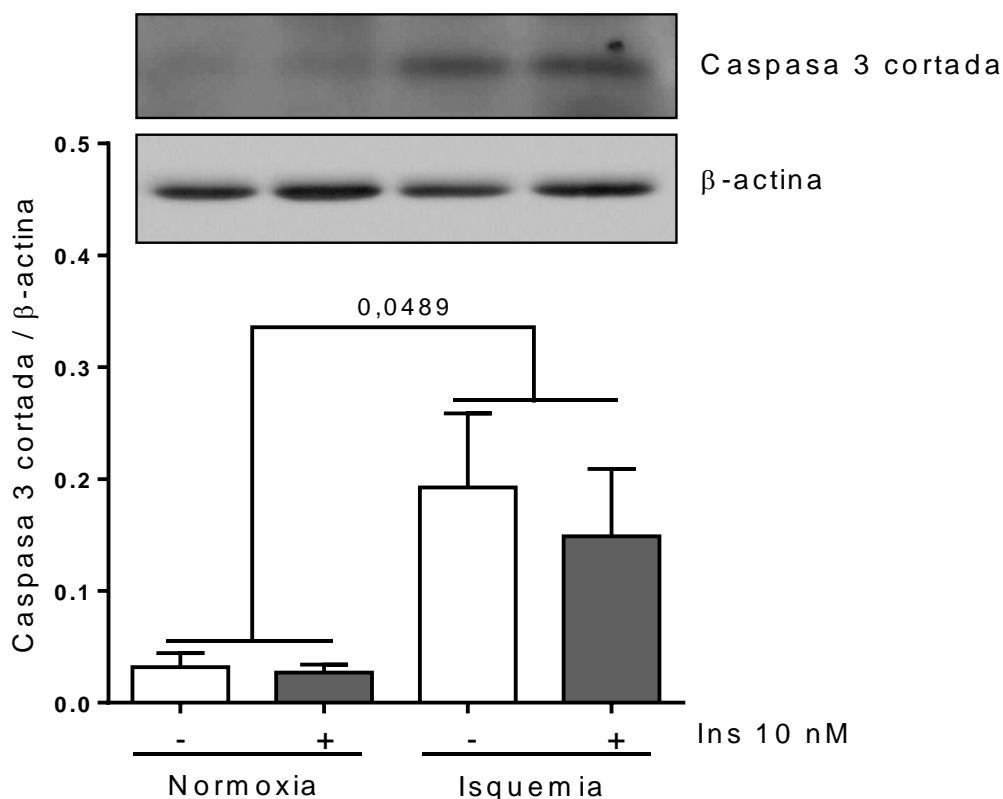


Figura 9. Efecto de insulina sobre los niveles de caspasa 3 cortada durante IS. Cardiomiocitos sometidos a 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinó caspasa 3 cortada por *western blot*. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global = 0,0375) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

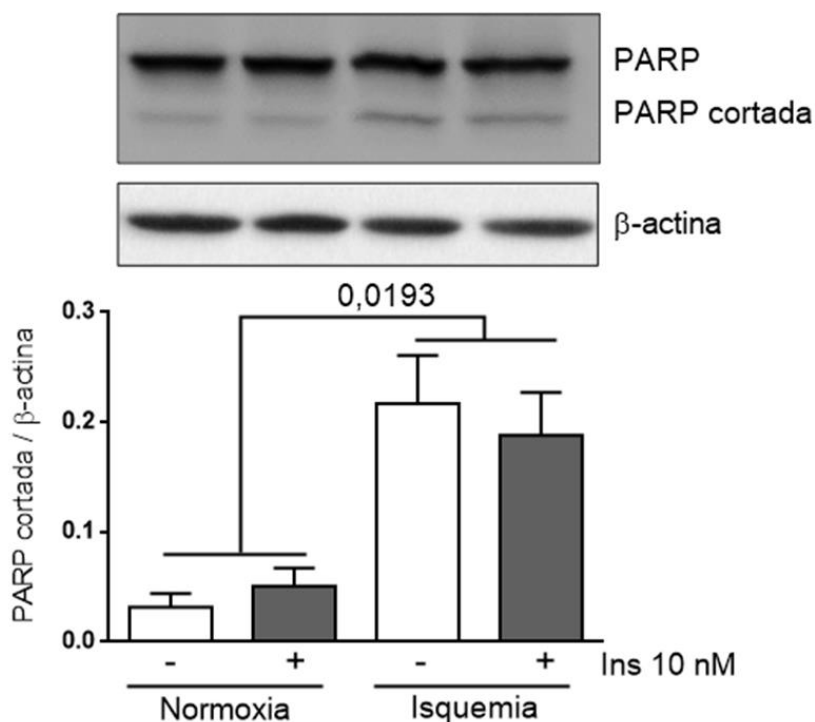


Figura 10. Efecto de insulina sobre los niveles de PARP durante IS. Cardiomiocitos sometidos a 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de PARP cortada mediante *western blot*. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global = 0,0018) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

AKT es una proteína clave en la señalización de insulina⁸⁸. AKT fue activada por la presencia de insulina durante IS, ya que se detectó incremento en la fosforilación de los residuos S473 y T308 de esta quinasa (**Figura 11**), interesantemente, se observó que la isquemia por si sola produjo aumento significativo en la activación de AKT. Al analizar la fosforilación en S136 de BAD, un sustrato de AKT³³, se encontró un patrón similar inducido por la presencia insulina durante IS (**Figura 12**). La activación de AKT disminuyó al utilizar diferentes dosis (5, 1, 0.1 y 0.01 μ M) del inhibidor específico de AKT (AKTi VIII) (**Figura 13**). Se encontró que la menor concentración para inhibir la activación de AKT inducida por insulina durante IS fue 0.1 μ M de AKTi VIII. Los efectos protectores de insulina durante IS fueron inhibidos y/o prevenidos cuando se utilizó 0.1 μ M de AKTi VIII. Este efecto se observó al cuantificar viabilidad celular (**Figura 14**) y necrosis por actividad LDH presente en el medio de cultivo (**Figura 15**).

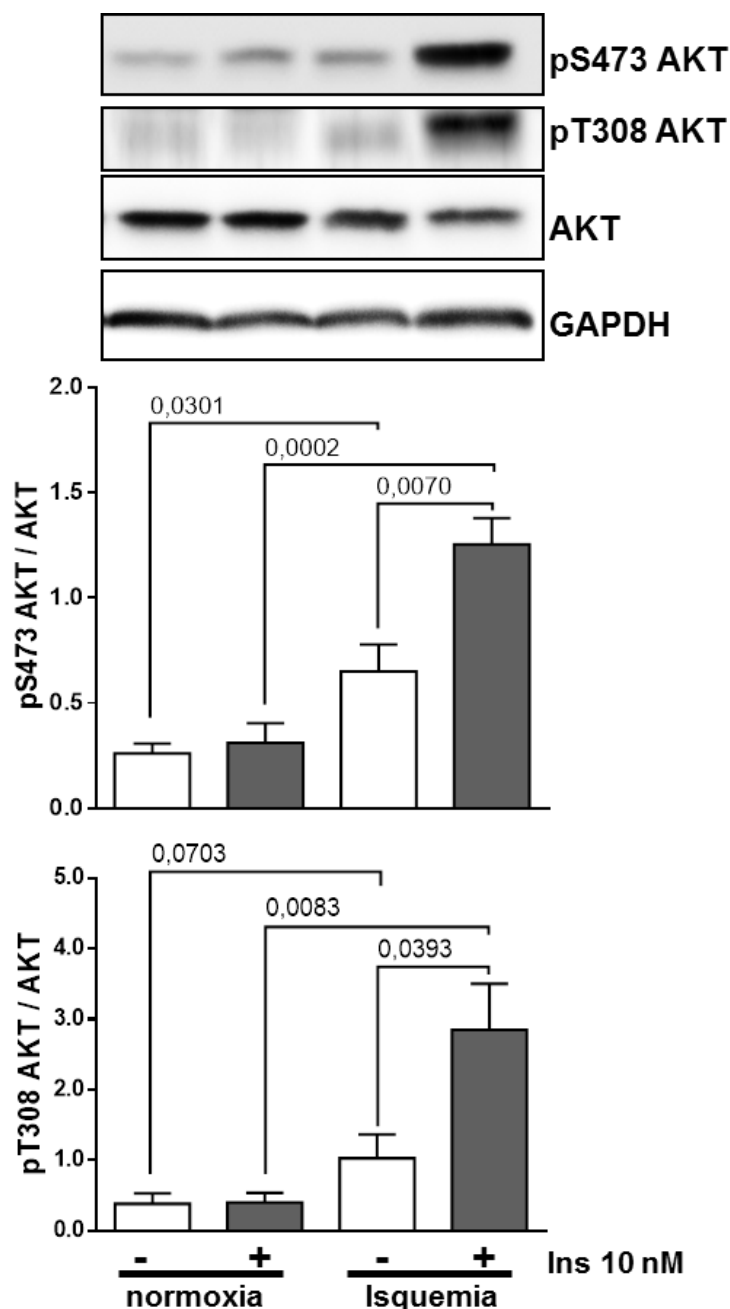


Figura 11. Efecto de insulina sobre la activación de AKT en IS. Cardiomiocitos sometidos a 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de fosforilación en los residuos S473 y T308 AKT. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0056$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

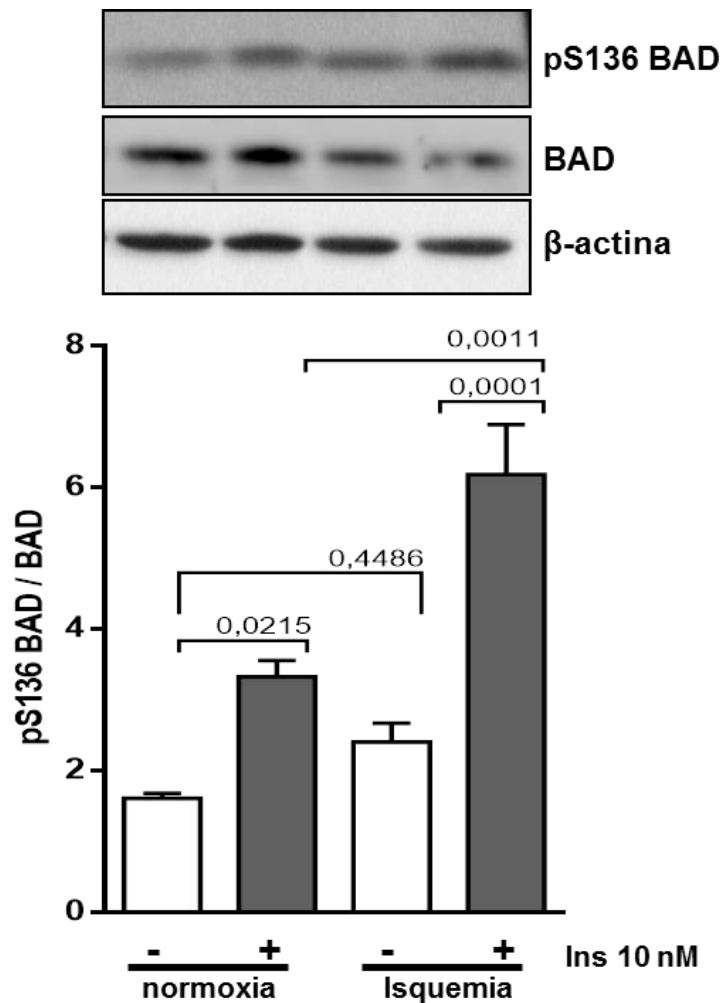


Figura 12. Efecto de insulina sobre la fosforilación de BAD durante IS. Cardiomiocitos sometidos a 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de fosforilación en S136 de BAD y niveles BAD total. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

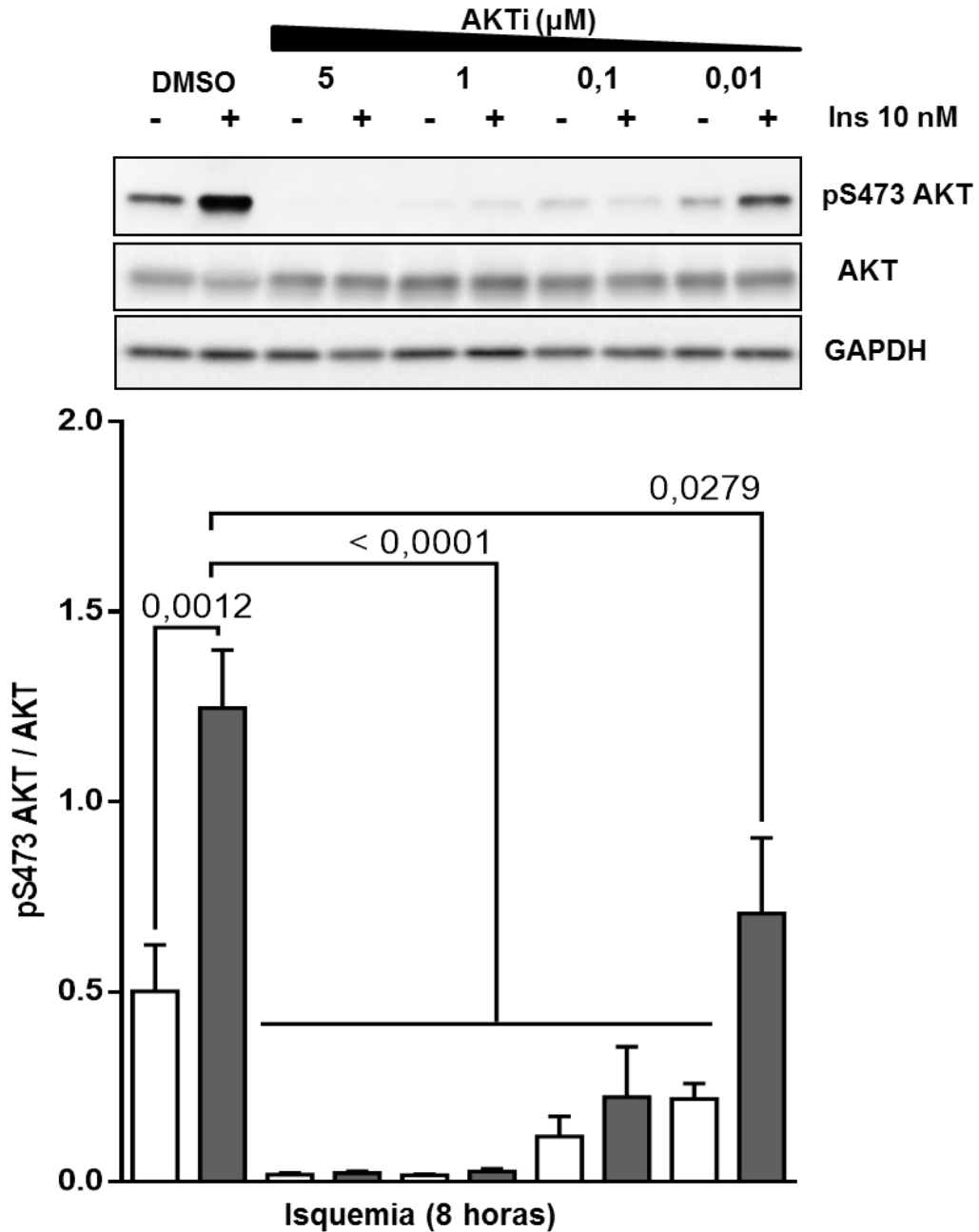


Figura 13. Estandarización del inhibidor AKTi VIII en IS. Cardiomiocitos fueron preincubados 30 minutos con AKTi (5, 1, 0.1, 0.01 μM) y luego sometidos a 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de fosforilación en S473. Datos expresados en promedio ± SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global < 0,0001) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un p≤0,05.

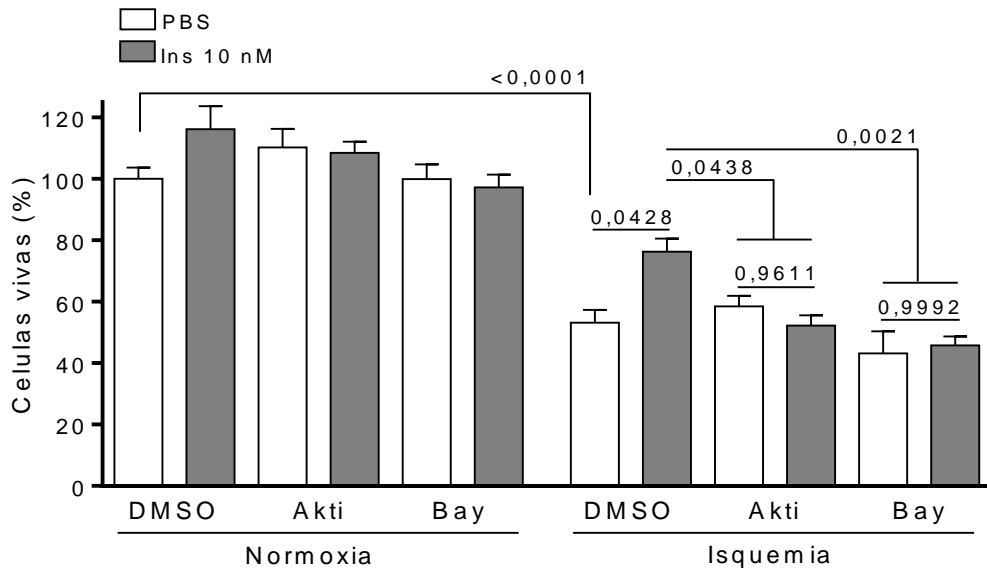


Figura 14. Efecto de la inhibición de AKT y NF- κ B en la función protectora de insulina en IS. Cardiomiocitos fueron preincubados 30 minutos con AKTi VIII (0.1 μ M) y BAY 11-7082 (0.05 μ M) y luego sometidos a 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. DMSO fue utilizado como vehículo y control en la misma condición que los respectivos inhibidores. El efecto citoprotector de insulina fue evaluado por conteo por azul de tripán. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

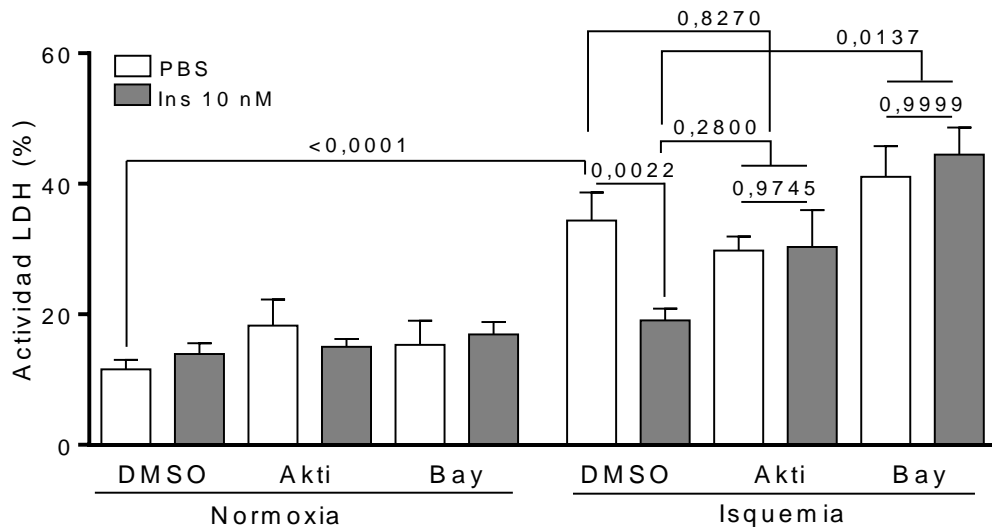


Figura 15. Efecto de la inhibición de AKT y NF- κ B en la función anti-necrótica de insulina durante IS. Cardiomiocitos fueron preincubados 30 minutos con AKTi VIII (0.1 μ M) y BAY 11-7082 (0.05 μ M) y luego sometidos a 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. DMSO fue utilizado como vehículo y control en la misma condición que los respectivos inhibidores. El efecto citoprotector de insulina fue evaluado por actividad LDH libera al medio. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 6 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

7.1.3 Insulina activa a NF- κ B en isquemia

Previamente nuestro grupo reportó que insulina regula la dinámica mitocondrial a través del eje AKT/NF- κ B en condiciones de normoxia⁸³. Por lo tanto, se estudió el rol de insulina en la activación de NF- κ B durante IS.

En IS, insulina produjo una disminución significativa de I κ B α , el represor NF- κ B (**Figura 16**), y se observó incrementó de la marca nuclear de p65 (**Figura 17**). Interesantemente, los mayores cambios producidos sobre la activación de la vía de señalación de NF- κ B se observaron con la IS por si sola, e insulina solo potenció estos efectos (**Figura 16 y 17**). Además, se detectó que durante IS la presencia de insulina aumentó los niveles de fosforilación de p65 en S536 (**Figura 18**), modificación postraduccional que se relaciona con mayor activación de la vía NF- κ B⁸⁹. Esta fosforilación disminuyó al utilizar diferentes dosis (5, 0.5 y 0.05 μ M) del inhibidor del complejo IKK (BAY-117082). Se observó que la menor dosis para inhibir la activación de NF- κ B inducida por insulina durante IS fue 0.05 μ M BAY-117082 (**Figura 18**), dosis mayores que 0.5 μ M produjeron efectos inespecíficos sobre las células. Finalmente, los efectos protectores de insulina durante IS fueron inhibidos cuando se utilizó 0.05 μ M de BAY-117082. Este efecto se observó al cuantificar viabilidad celular (**Figura 14**) y necrosis por actividad LDH presente en el medio de cultivo (**Figura 15**). También se observó que la presencia de este inhibidor, produjo una tendencia a potenciar los efectos de IS (**Figura 14**).

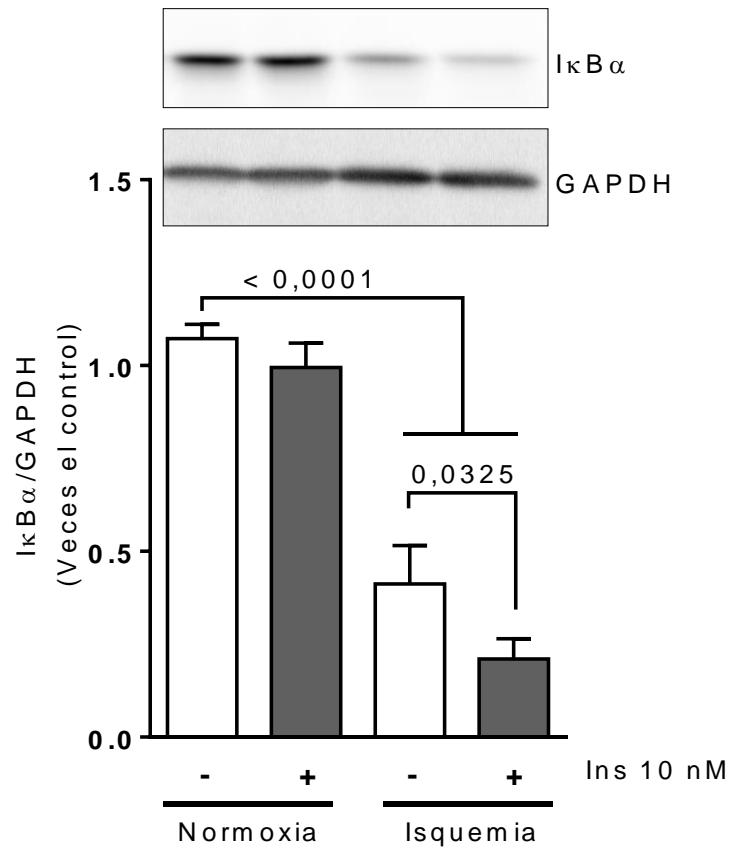
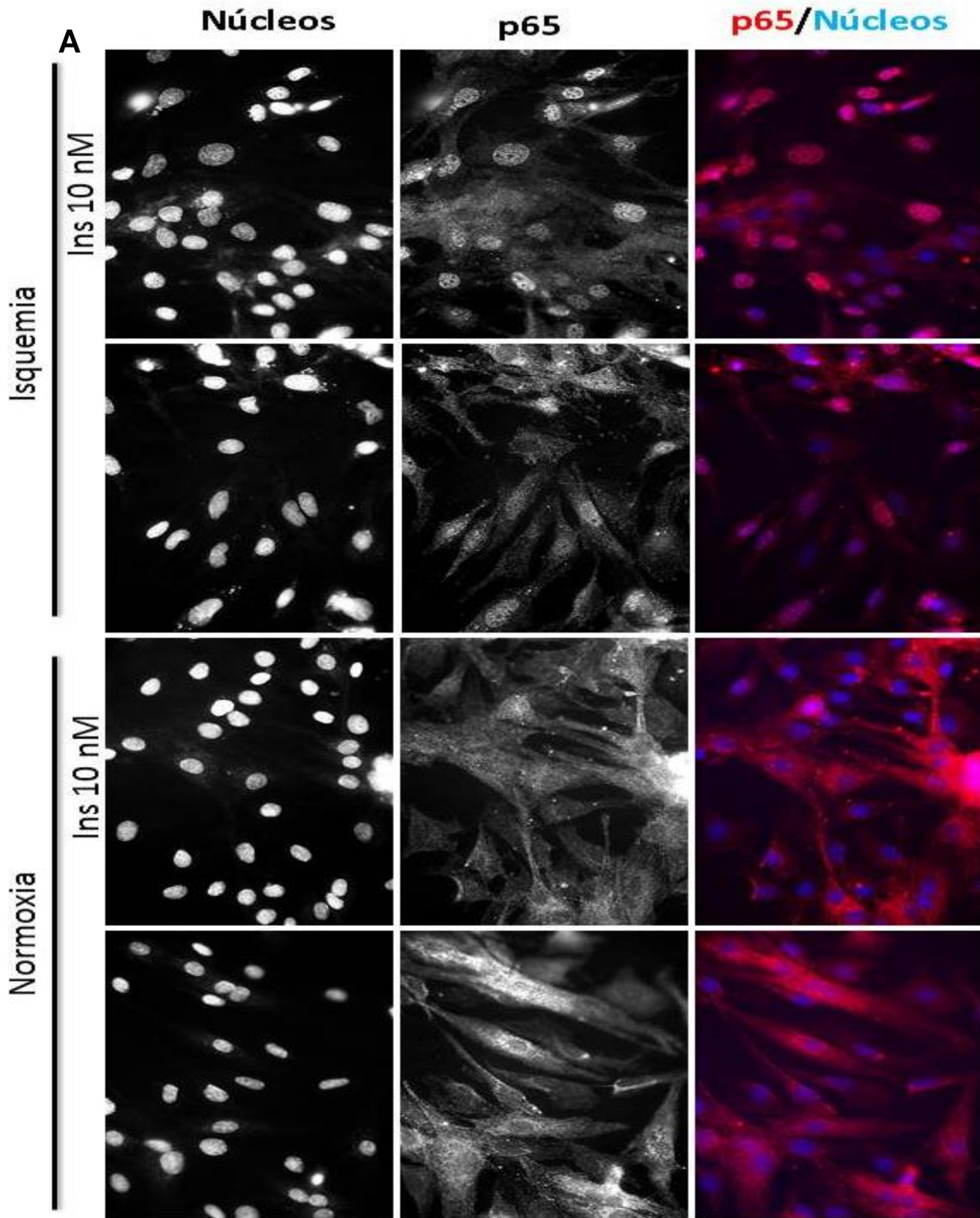


Figura 16. Efecto de insulina sobre niveles de $I\kappa B\alpha$ durante IS. Cardiomiocitos fueron sometidos a IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de $I\kappa B\alpha$. Datos expresados en promedio más error estándar con un tamaño muestral de 5 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.



Ver pie de foto en la página siguiente.

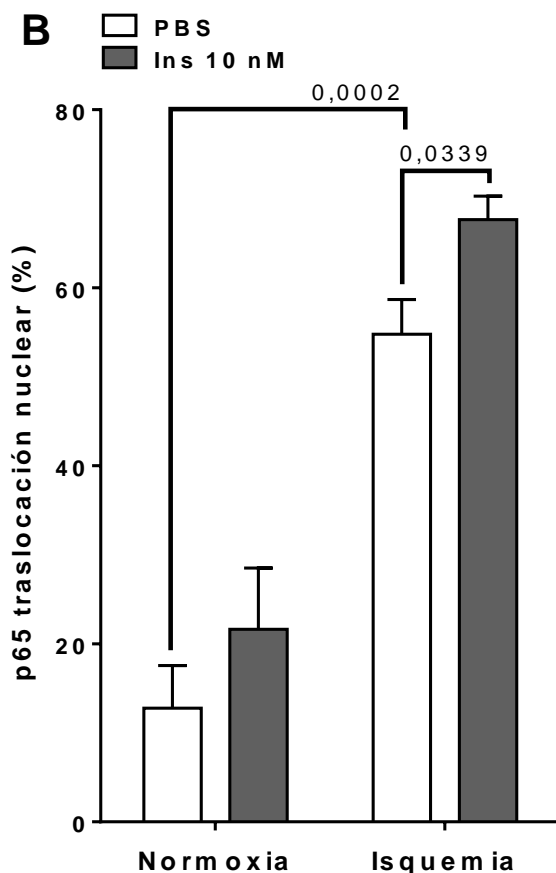


Figura 17. Efecto de insulina sobre traslocación nuclear de p65 durante IS. Cardiomiocitos sometidos a IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Panel A, imagen representativa distribución subcelular de p65 determinada por inmunofluorescencia. Panel B, porcentaje de células p65 positivas en el núcleo determinada por el promedio de 3 campos al azar por experimento. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

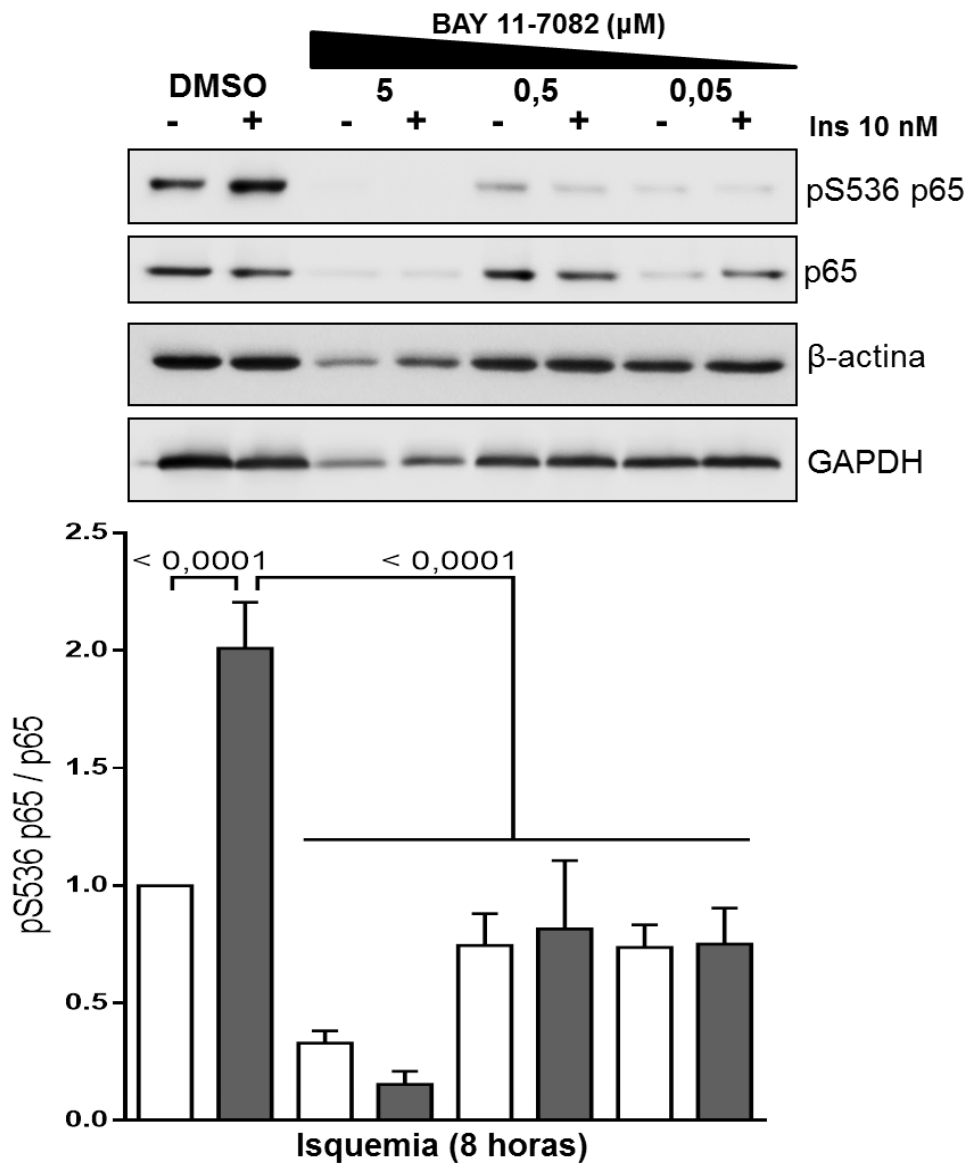


Figura 18. Estandarización de inhibidor BAY 11-7082 en IS. Cardiomiocitos fueron preincubados 30 minutos con BAY 11-7082 (5, 0.5 y 0.05 μ M) y luego sometidos a IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de fosforilación en S536 de p65. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes. ANOVA de una vía (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

7.2 Objetivo 2: evaluar el efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la protección por insulina durante IS.

7.2.1 Insulina no altera los niveles de VCAM-1 en cardiomiocitos

Está descrito que insulina incrementa los niveles de VCAM-1 en células endoteliales^{45,85}. Sin embargo, en el modelo de cardiomiocito neonato esta hormona no produjo cambios en los niveles del mRNA (**Figura 19**) ni en los niveles proteicos de VCAM-1 (**Figura 20**), al menos hasta las 6 horas de tratamiento en condiciones de normoxia. Durante IS, la presencia de insulina 10 nM tampoco produjo cambios significativos en los niveles del mRNA ni de la proteína, al menos hasta las 8 horas (**Figuras 21-25**). No obstante, la IS produjo una reducción significativa del mRNA y la proteína de VCAM-1 (**Figuras 21, 23-25**). Esta proteína puede ser cortada al final de la región transmembrana, generándose una forma soluble de alrededor de los 100-110 kDa^{81,82,90}; sin embargo, no se detectó presencia de esta isoforma en el medio de cultivo después de isquemia (**Figura 23**). Por lo tanto, estos resultados estarían indicando que IS reduce los niveles de VCAM-1 y la presencia de insulina no regula los niveles de esta proteína, al menos hasta 8 horas en condiciones de normoxia e IS en cardiomiocitos neonatos.

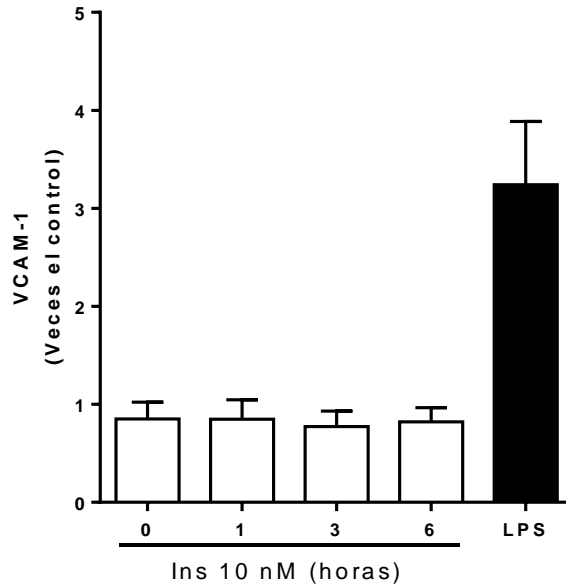


Figura 19. Efecto de insulina sobre los niveles de mRNA de VCAM-1 en cardiomiocito en condiciones de normoxia. Cardiomiocitos neonatos fueron estimulados con insulina (Ins) 10 nM a diferentes tiempos (0, 1, 3 y 6 horas). LPS (250 ng/mL) por 6 horas se utilizó como control positivo. Se determinaron niveles de mRNA de VCAM-1 relativos a 18S. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes.

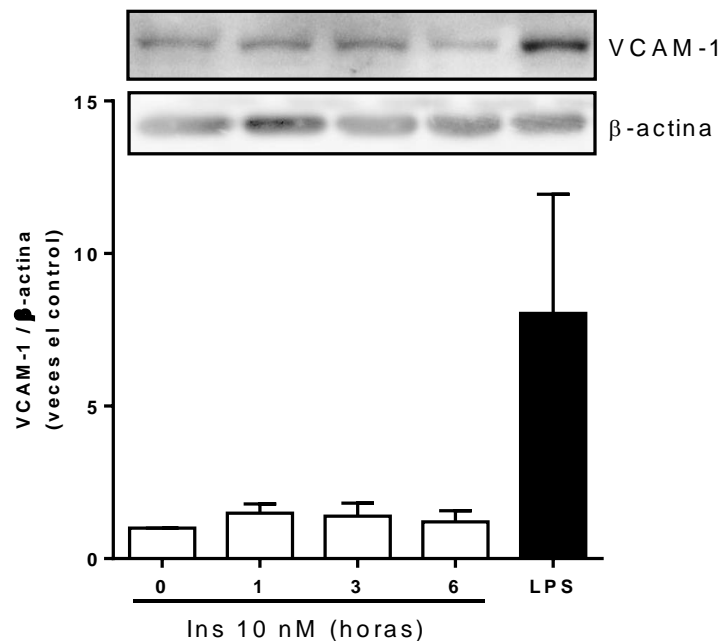


Figura 20. Efecto de insulina sobre los niveles de proteicos de VCAM-1 en cardiomiocito en condiciones de normoxia. Cardiomiocitos neonatos fueron estimulados con insulina (Ins) 10 nM a diferentes tiempos (0, 1, 3 y 6 horas). LPS (250 ng/mL) por 6 horas se utilizó como control positivo. Se determinaron niveles proteicos de VCAM-1 relativos a β -actina. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes.

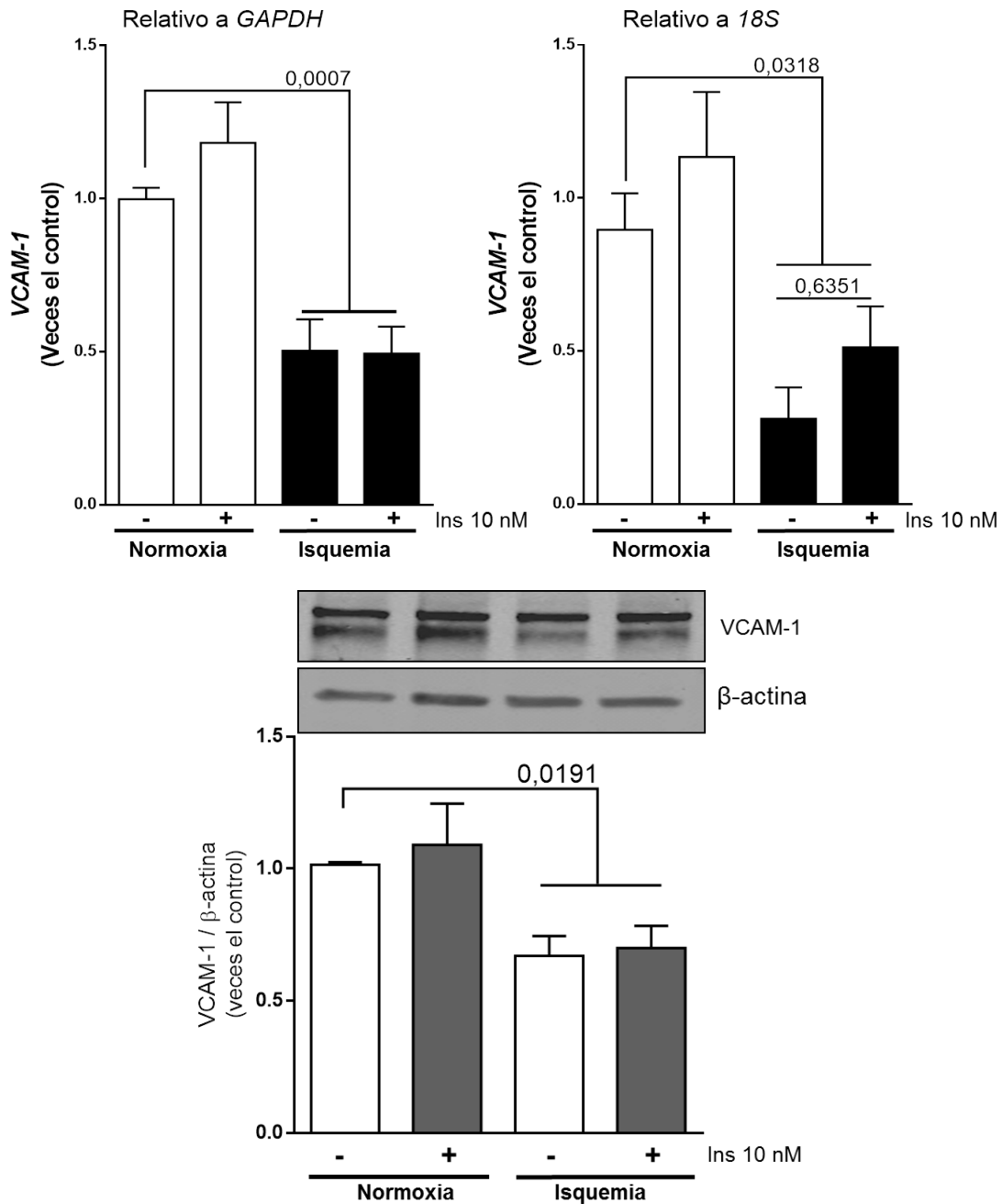


Figura 21. Efecto de insulina sobre los niveles de VCAM-1 durante IS. Cardiomiocitos sometidos a IS en presencia o ausencia de insulina 10 nM. **Panel superior**, se determinaron niveles de mRNA para VCAM-1 relativos a *GAPDH* y *18S*. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 5 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías y un post análisis de Tukey. **Panel inferior**, se determinaron niveles proteicos de VCAM-1 mediante *western blot*, se cuantificó banda inferior relativa a β -actina. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

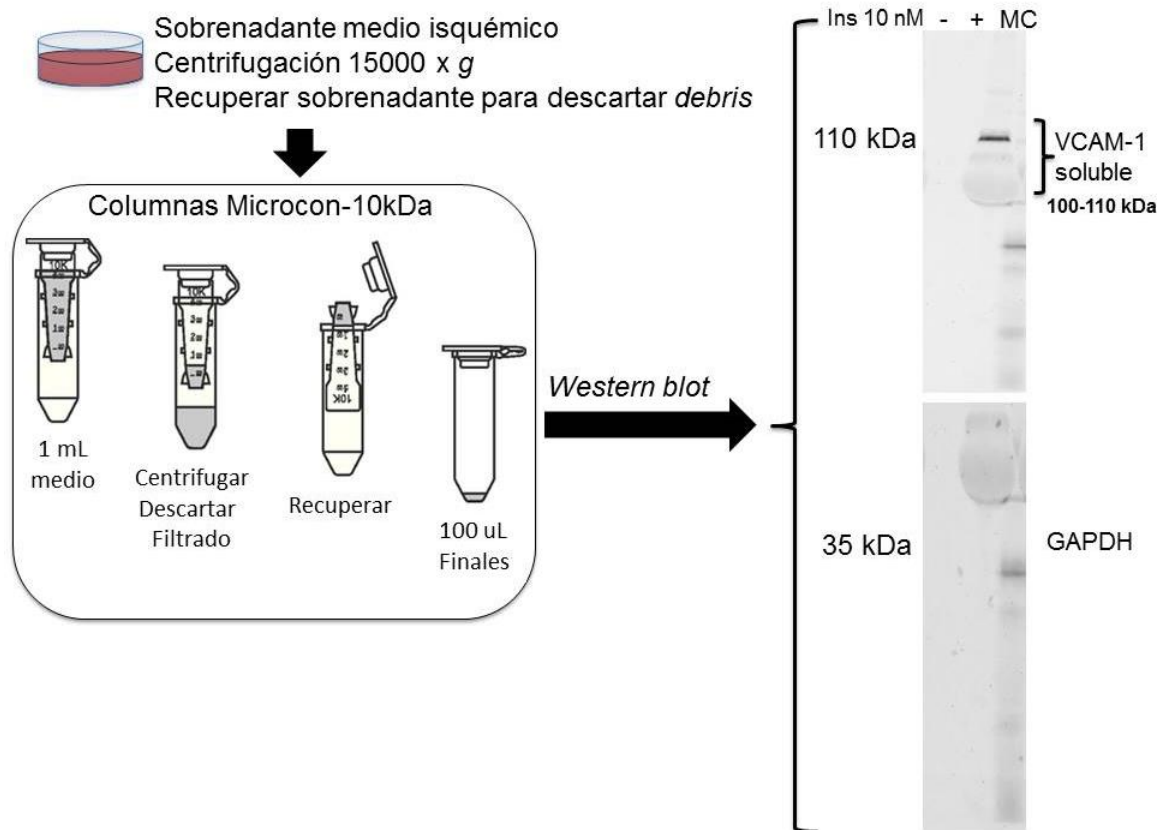


Figura 22. Efecto de insulina sobre los niveles de VCAM-1 soluble en IS. Cardiomiocitos sometidos a IS en presencia o ausencia de insulina 10 nM. Luego de la isquemia los medios fueron recolectados y concentrados 10 veces mediante columnas microcon 10 kDa (ver materiales y métodos), se detectaron niveles de VCAM-1 soluble mediante *western blot*. MC, medio mantención cardiomiocitos antes de realizar isquemia. GAPDH fue utilizado como control de lisis celular. Imagen representativa de 3 repeticiones independientes.

7.2.2 VCAM-1 participa en los efectos protectores de insulina frente a isquemia.

Se estudió el efecto del silenciamiento de VCAM-1 sobre la función protectora de insulina frente a IS. Se utilizó una mezcla de dos siRNAs (siVCAM-1) dirigidos hacia dos regiones distintas del mRNA de VCAM-1 (**Figuras anexas A2**). Se detectaron por *western blot*, dos bandas cercanas al peso molecular esperado de VCAM-1, ~110 kDa. Aunque ambas marcas disminuyeron significativamente con el tratamiento siVCAM-1, el mayor efecto se observó en la banda de menor peso molecular (**Figuras anexas A4**). El tratamiento siVCAM-1 produjo una disminución significativa tanto del mRNA (**Figuras 23 y 24**) como de la proteína VCAM-1

comparada con la condición siControl (**Figura 25**). Esto fue efectivo en la condición de normoxia como en la condición de IS. Simillar a la condición sin transfectar (**Figura 21**), la isquemia *per se* disminuyó los niveles del mRNA y la proteína, e insulina no produjo ningún cambio significativo sobre estos (**Figuras 23-25**). Al estudiar los efectos del tratamiento siVCAM-1 sobre la función protectora de insulina (**objetivo 1**), se observó que el tratamiento siVCAM-1 inhibió y/o previno los efectos protectores de insulina frente a IS, esto fue detectado por LDH presente en el medio (**Figura 27**) y células TUNEL positivas (**Figura 28**). Interesantemente, en la condición siVCAM-1 tanto en normoxia como en IS, se observó una tendencia de incremento en los niveles de LDH en el medio (**Figura 27**). Estos resultados sugieren que VCAM-1 sería necesario para función protectora de insulina frente a IS.

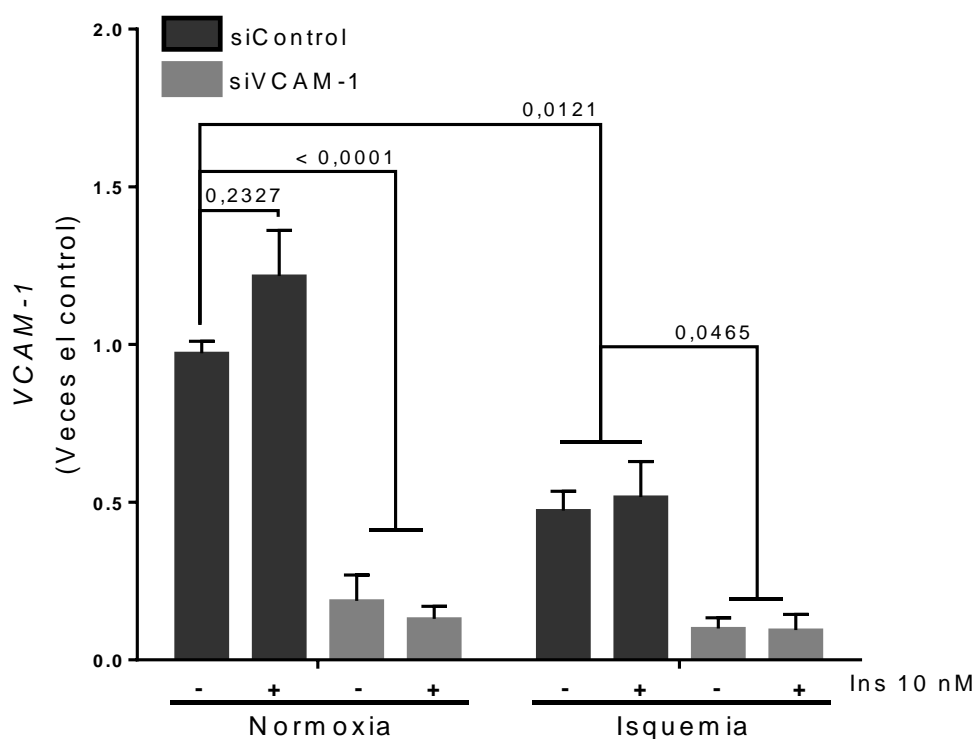


Figura 23. Efecto de siVCAM-1 en los niveles del mRNA de VCAM-1 relativos a GAPDH. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a IS en presencia o ausencia de insulina 10 nM. Se determinaron niveles de mRNA para VCAM-1 relativos a GAPDH. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

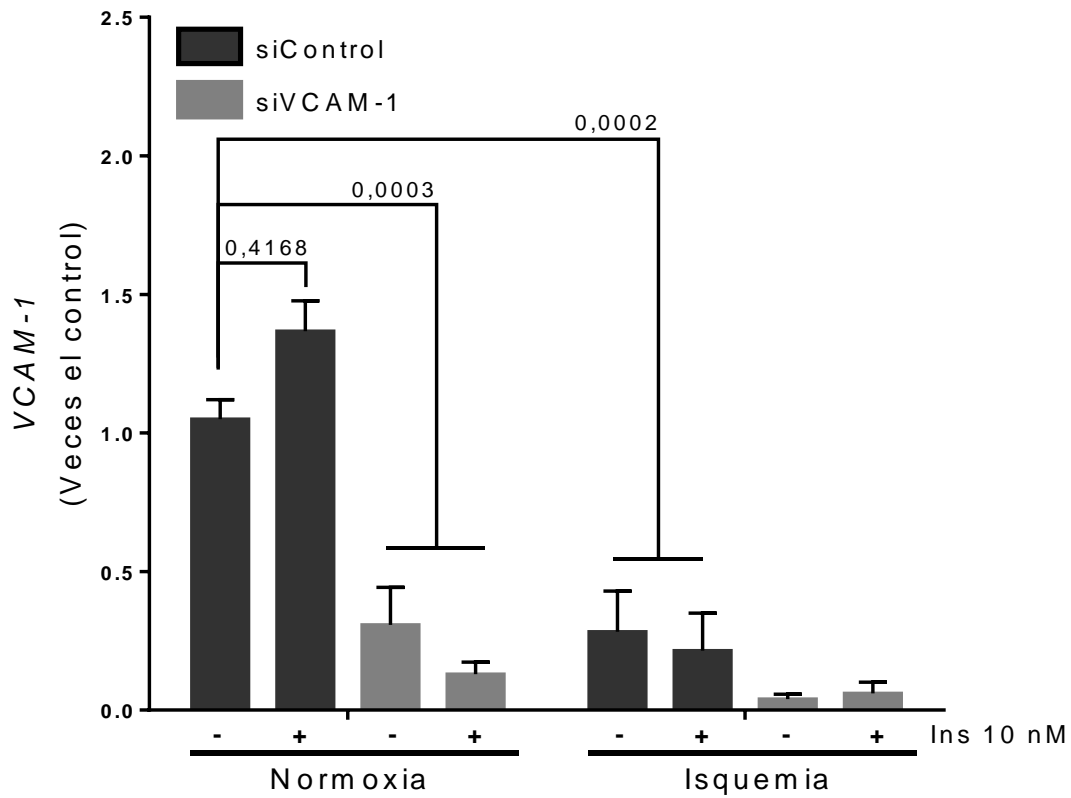


Figura 24. Efecto de siVCAM-1 en los niveles del mRNA de VCAM-1 relativos a 18S. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a IS en presencia o ausencia de insulina 10 nM. Se determinaron niveles de mRNA para VCAM-1 relativos a 18S. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

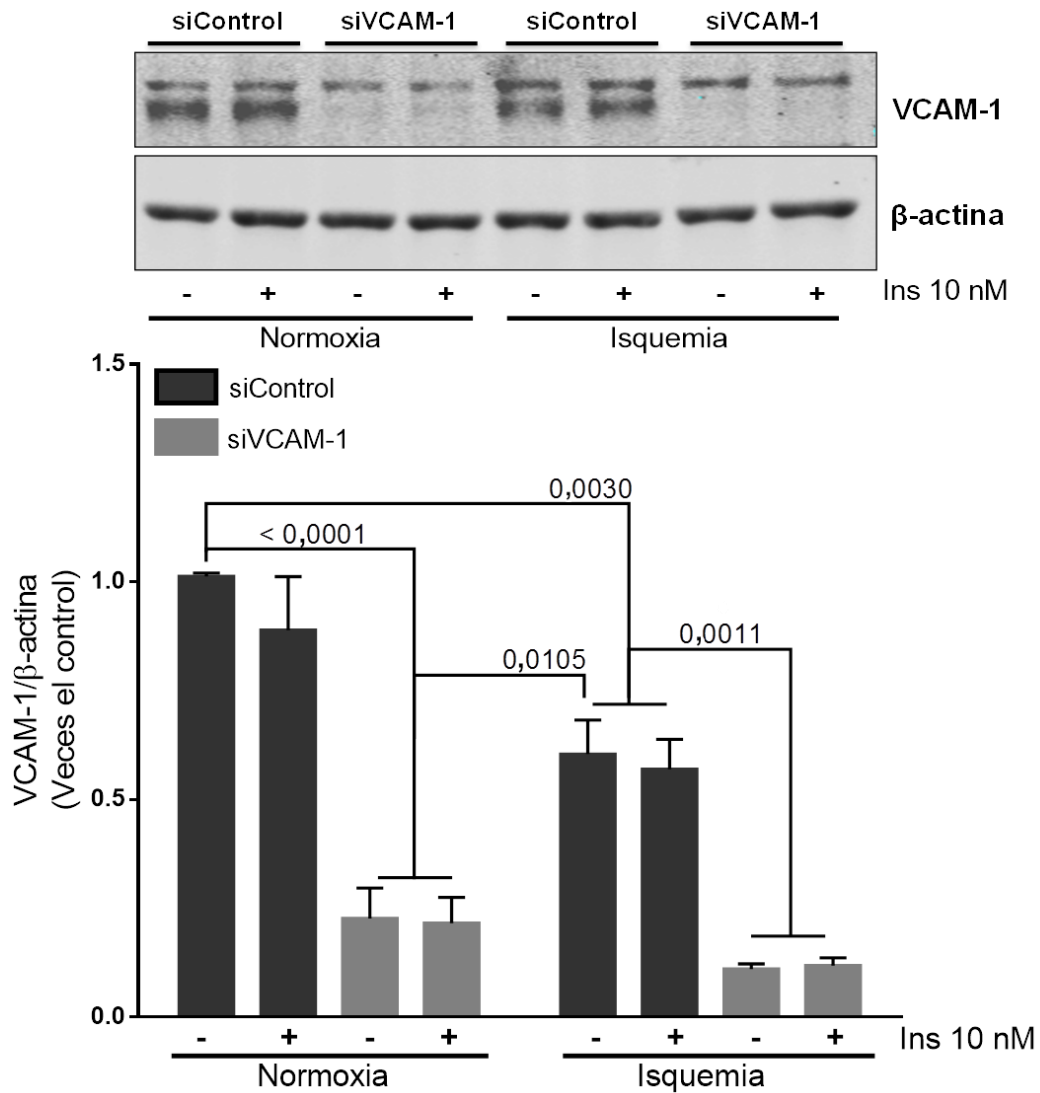


Figura 25. Efecto de siVCAM-1 en los niveles proteicos de VCAM-1. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles proteicos de VCAM-1 determinados por *western blot*, se cuantificó la banda inferior normalizada por β -actina. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

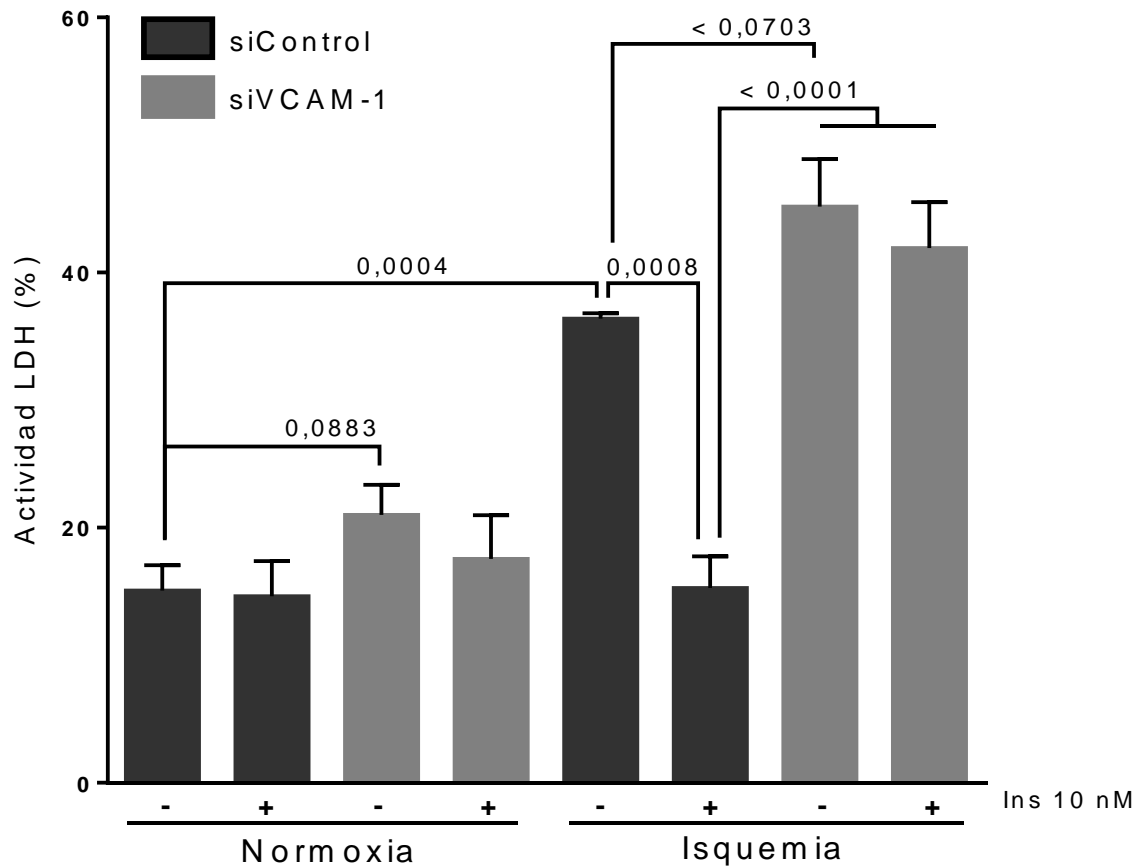
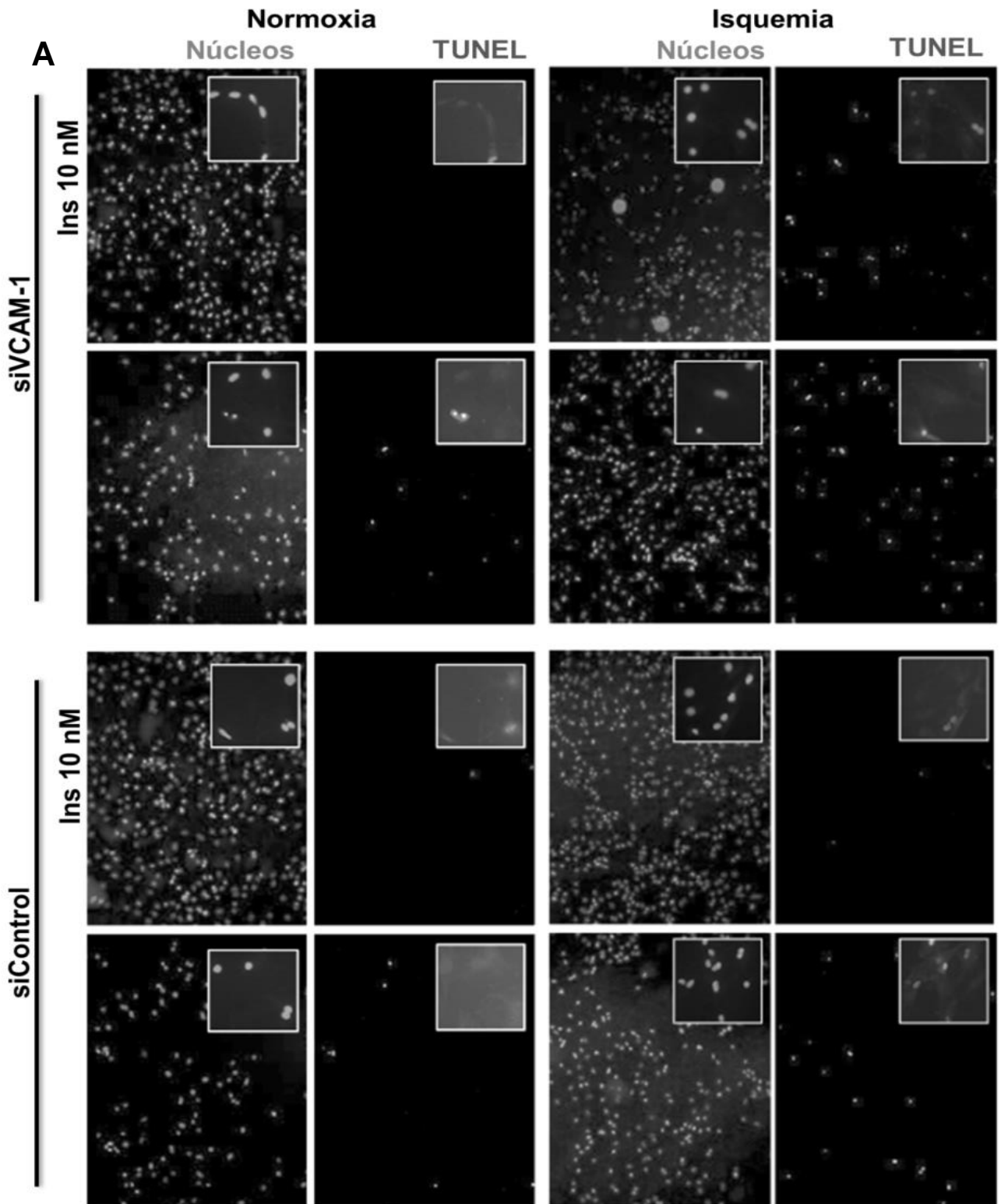


Figura 26. VCAM-1 participa en los efectos protectores de insulina en IS. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a 8 horas de IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinó porcentaje de actividad LDH presente en el medio. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 4 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global < 0,0001) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.



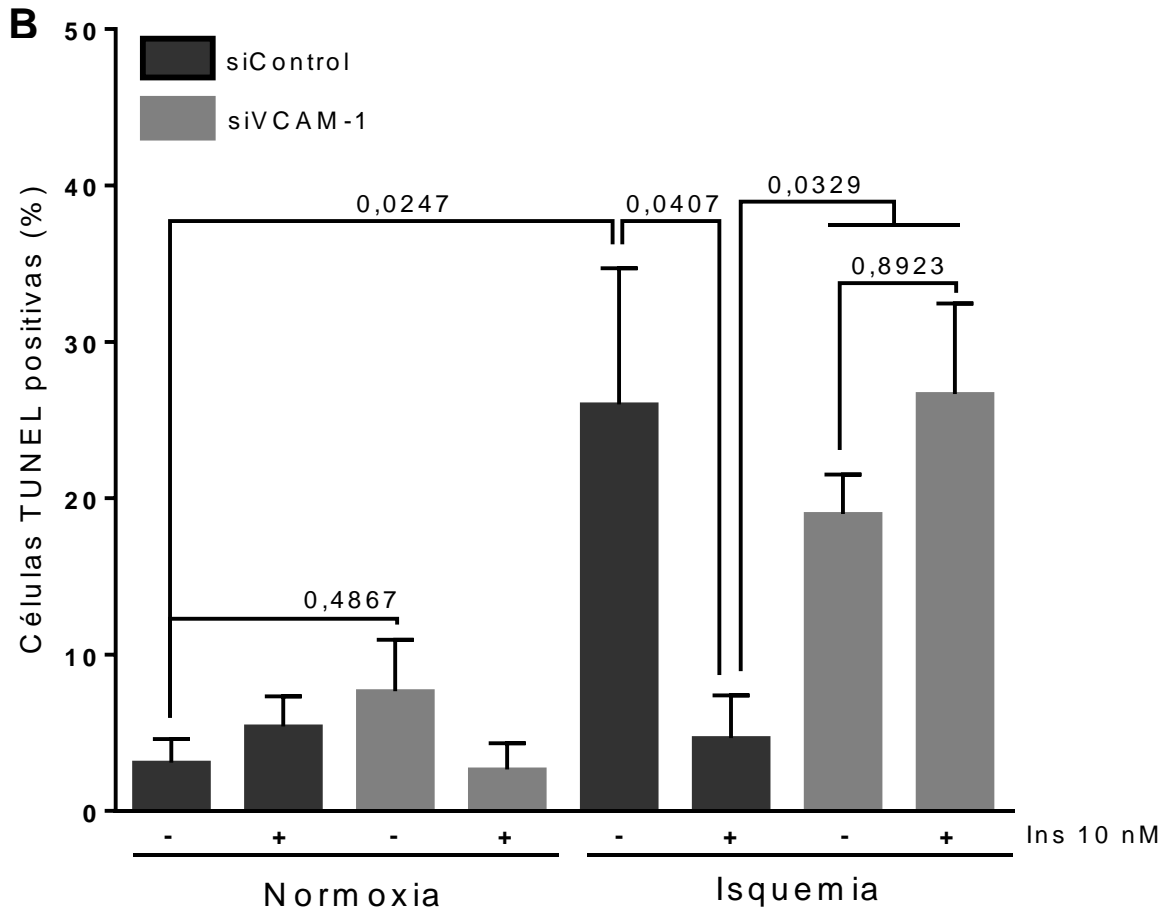


Figura 27. VCAM-1 participa en la función anti-apoptótica de insulina en isquemia simulada. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a 8 horas a IS en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinó apoptosis mediante TUNEL. **Panel A**, imagen representativa de TUNEL. **Panel B**, porcentaje de células TUNEL positivas obtenido del promedio de 3 campos al azar por experimento. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global = 0,0015) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

7.3 Objetivo 3: Estudiar el efecto de la disminución de VCAM-1 en la señalización de insulina durante IS.

7.3.1 Localización de VCAM-1 en cardiomiocitos

Se estudió la ubicación de VCAM-1 en condiciones de normoxia. Esto debido a que no existían antecedentes que describieran la ubicación celular de esta proteína en cardiomiocitos. Utilizando un anticuerpo dirigido contra la región N-terminal y mediante microscopía confocal se detectó VCAM-1, principalmente, en la vecindad de la superficie celular, la región perinuclear y nuclear (**Figura 28**). Ya que el cardiomiocito presenta invaginaciones que protruyen al núcleo⁹¹, lo cual podría explicar este patrón en la zona perinuclear y nuclear. Por lo tanto, se realizaron inmunofluorescencias en condiciones no permeabilizadas. Se observó marca para VCAM-1, principalmente, en la zona perinuclear, este patrón fue similar tanto para el anticuerpo monoclonal como policlonal, ambos dirigidos a la región N-terminal extracelular (**Figura 29**). Además, en el fraccionamiento citosólico/nuclear se detectó VCAM-1 enriquecido en los precipitados nucleares, lo cual disminuyó con el tratamiento siVCAM-1 (**Figura 30**). Al efectuar un análisis *in silico* mediante el alineamiento de diferentes secuencias peptídicas de VCAM-1 en diferentes especies, se detectó una posible señal de localización nuclear en el dominio tipo IgG 7 (residuos K636, R637, K638, K640, K647, K656, K657 y K671) (**Figura 31**). Estas señales corresponden a grupos de lisinas y argininas⁹². Aunque los residuos se encontraban separados en la secuencia lineal, en el modelamiento computacional se encontró que estos estarían expuestos hacia el mismo lugar en la superficie del dominio tipo IgG (**Figura 32**).

VCAM-1 / Núcleo

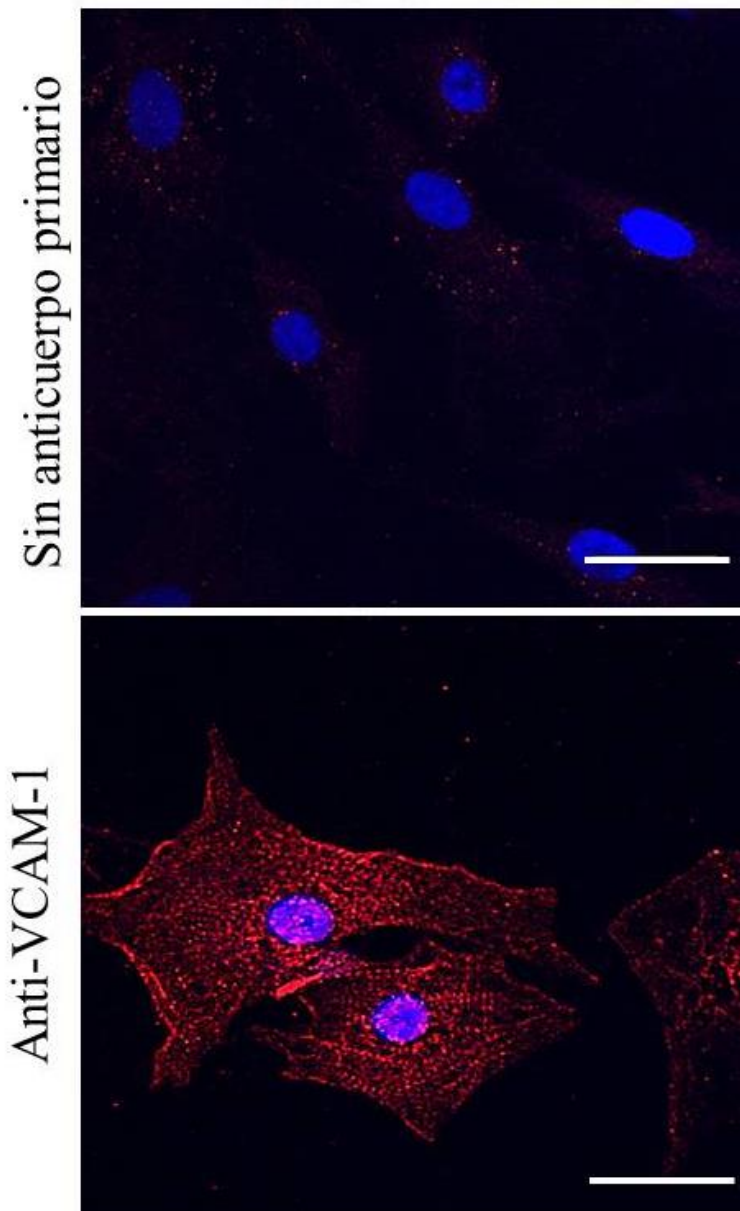
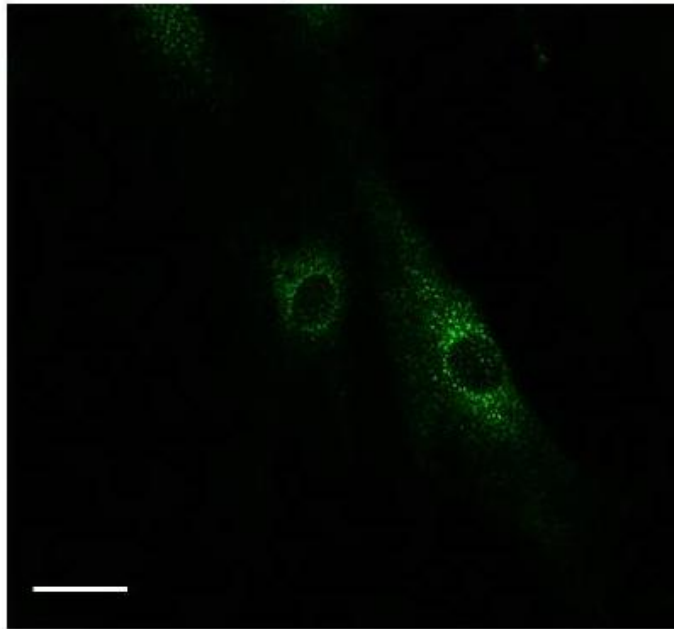


Figura 28. Localización de VCAM-1 mediante Inmunofluorescencia en cardiomiocitos neonatos en condiciones de células permeabilizadas. Detección de VCAM-1 mediante anticuerpo policlonal que reconoce región amino terminal extracelular en cardiomiocitos permeabilizados con Tritón X-100. Rojo (VCAM-1), azul (DAPI). Foto representativa de 5 experimentos independientes. Barra, 40 μ m.

Anticuerpo monoclonal



Anticuerpo policlonal

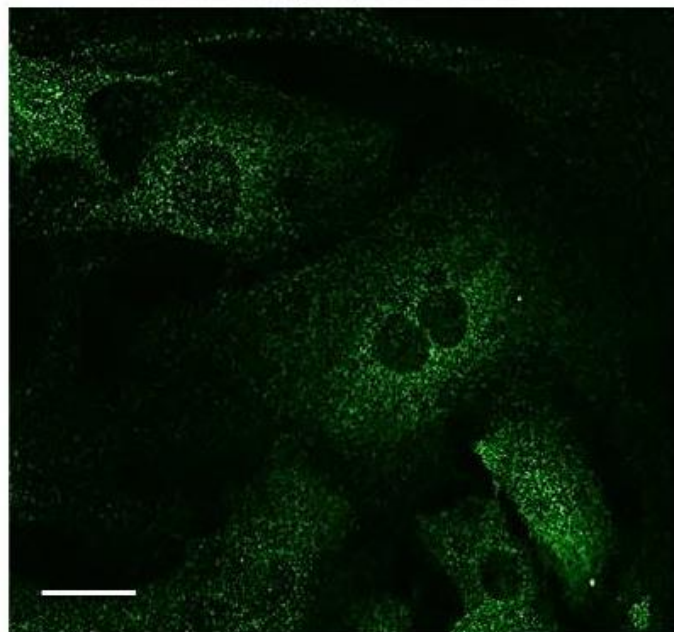


Figura 29. Detección de VCAM-1 en cardiomiocitos neonatos mediante inmunofluorescencia en condiciones no permeabilizadas. Cardiomiocitos fueron fijados en normoxia, se detectó VCAM-1 en condiciones no permeabilizadas. **Panel de arriba**, detección de VCAM-1 mediante anticuerpo monoclonal (MR106) que reconoce región amino terminal extracelular. **Panel de abajo**, detección de VCAM-1 mediante anticuerpo policlonal (H-276) que reconoce región amino terminal extracelular. Foto representativa de 4 experimentos independientes. Barra, 20 μ m.

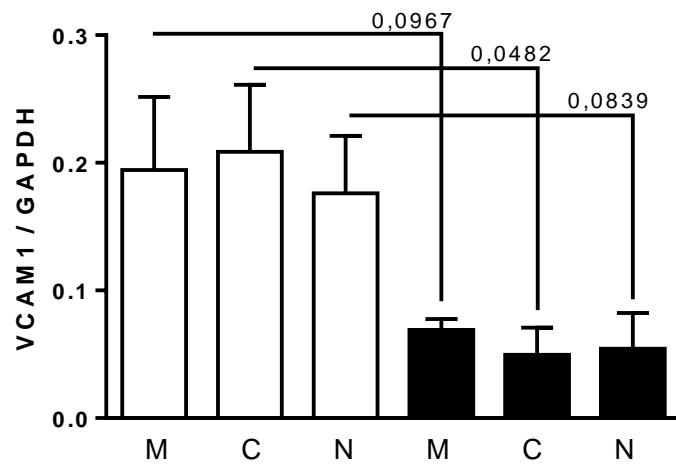
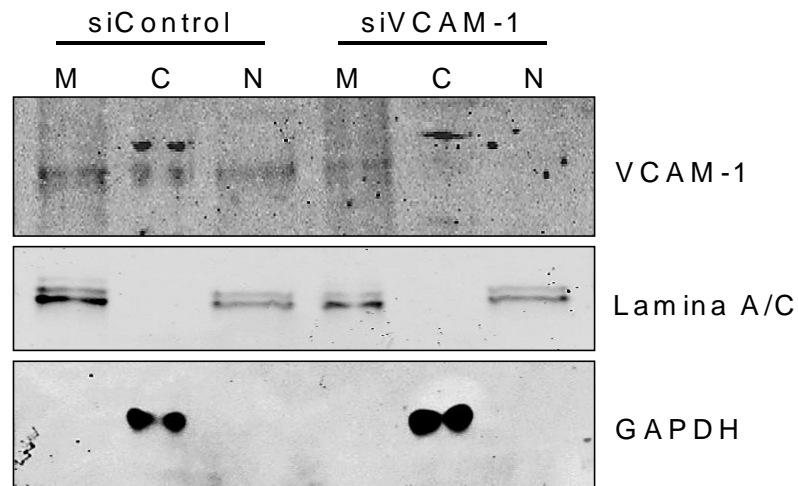


Figura 30. VCAM-1 está enriquecido en precipitado nuclear. Cardiomiocitos fueron transfectados con siControl o siVCAM-1, luego se realizó una extracción citosólica nuclear (Ver materiales y métodos). Se determinaron niveles de VCAM-1 (anticuerpo C-19) en los diferentes extractos. GAPDH, control citosol. Lamina A/C, control nuclear. M, membranas; C, extracto citosólico; N, *pellets* nucleares. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico t-student de dos colas. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.


```

[Equus      PAKKILWRRQLNNGELQFLSENTTLTLLISTKMEDSGIYVCEGINQAGKSRKEVELTIQVA 599
[Canis      PAPANILWSRRLSNGRLQSLSEDPILTLTSAKMEDSGIYVCEGINQAGISRKEVELIIQVA 599
[Bos        PAKKILWSRQLSNGDLQPISENATLSFMSTKMEDSGIYVCEGINQVGTSRKEVNLIQVA 600
[Homo       PAKKILWSRQLPNEGELQPLSENATLTLLISTKMEDSGVYLCEGINQAGRSRKEVELIIQVT 599
[Oryctolagus PAKKILWSRQLKNGDLQPLSENTTLALISTKLEDSGIYVCEGINLAGKSRKEVELVIQVA 599
[Rattus     PTPKILWSRQLKNGELQPLSQNTTLSFMATKMEDSGIYVCEGINEAGISKKSVELIIQGS 599
[Mus        PAPKILWSRQLNNGELQPLSENTTLTFMSTKRDDSGIYVCEGINEAGISRKSVELIIQVS 599
*:*:*:*:* *:* * * * * :*:* . *:* :*:* :*:*:*:*:* * . * *:*:*:* * * :

[Equus      PKDIQLRAIPSESVKEGDTVII SCTCGNVPQTWIIILKKKKAETGDTVLSKSTGGEYTIHKQAQ 659
[Canis      PKDIQLIAFPSESVKEGDTVII SCTCGNVPKTWIIILKKKKAETGDTVLSKSRDGYTIHKVQ 659
[Bos        PKDIQLTAFPPSERVKEGDTVII SCTCGNVPPTLIIILKKKKAETGYTVLSKSTGGAYTIHRAQ 660
[Homo       PKDIQLTAFPPSESVKEGDTVII SCTCGNVPETWIIILKKKKAETGDTVLSIDGAYTIKKAQ 659
[Oryctolagus PKDIQLTAFPPSKSVKEGDTVII SCTCGNVPETWIIILKKKKAETGDTVLSIDGAYTIKKAQ 659
[Rattus     SKDIQLTVFPSPKSVKEGDTVII SCTCGSVPEIWIILKKKKAETGDMVLSVNGSYTIKKAQ 659
[Mus        PKDIQLTVFPSPKSVKEGDTVII SCTCGNVPETWIIILKKKKAETGDMVLSVDGYSYTIKKAQ 659
.***:* .***: *****.*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

[Equus      LEDAGVYECESKNQVGLQLRSLTLDVKGRENNDYFSPPELLLVLYCASSLIIPAIGMIYF 719
[Canis      LEDAGVYECESKNEAGLQLRSLTLDVKGRENNDYFSPPELLLVLYCASSLIIPAIGMIYF 719
[Bos        LEDAGVYQCESKNEVGSQLRSLTLDVKGRESNKDYFSPPELLLVLYCASSLIIPAIGMIYF 720
[Homo       LKDAGVYECESKNKVGSQLRSLTLDVQGRENNKDYFSPPELLLVLYFASSLIIPAIGMIYF 719
[Oryctolagus LEDAGVYECESKNEVGSQLRSITLDVKGRENNDYFSPPELLLVLYCASSLIIPAIGMIYF 719
[Rattus     LQDAGVYECESKTEVGSQLRSLTLDVKGKENNDYFSPPELLALYFASSLVIIPAIGMIYF 719
[Mus        LQDAGIYECESKTEVGSQLRSLTLDVKGKEHNNDYFSPPELLALYFASSLVIIPAIGMIVYF 719
*:*:*:*:* * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

[Equus      ARRANMKGSYSLVEAQKSKV 739
[Canis      ARRANMKGSYSLVEAQKSKV 739
[Bos        ARRANMTGYSYSLVEAQKVC- 739
[Homo       ARKANMKGSYSLVEAQKSKV 739
[Oryctolagus ARKANMKGSYSLVEAQKSKV 739
[Rattus     ARKANMKGSYSLVEAQKSKV 739
[Mus        ARKANMKGSYSLVEAQKSKV 739
* . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

```

Figura 31. Secuencia putativa de localización nuclear de VCAM-1. Alineamiento secuencias peptídicas de VCAM-1 entre posición 539-739 en diferentes mamíferos. La región 539-595 es parte del dominio IgG 6 y la región 612-685 corresponde al dominio IgG 7. Los últimos 19 residuos enmarcados corresponden a la región carboxilo terminal citósolica. Se utilizó el algoritmo de Clustal Omega. La secuencia de localización nuclear fue marcada con los rectángulos grises.

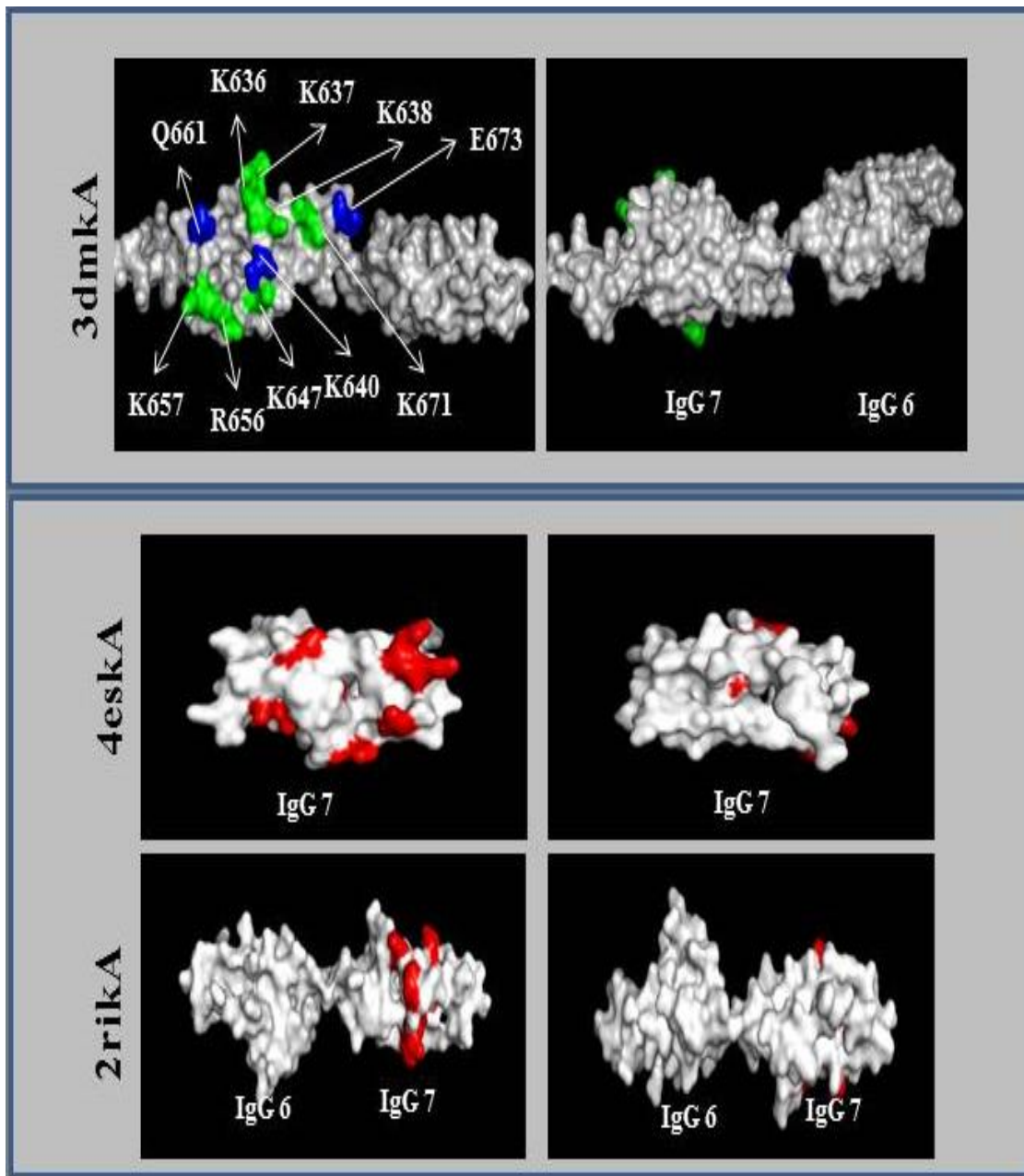


Figura 32. Modelamiento de secuencia putativa de localización nuclear de VCAM-1. La posible secuencia de nuclear de VCAM-1 fue marcada y luego modelada mediante PyMOL utilizando los modelos 3dmkA, 4eskA y 2rikA. Verde, residuos conservados en humano. Azul, residuos no conservados. Rojo, todos los residuos sin diferenciar conservación.

7.3.2 VCAM-1 y activación de AKT.

VCAM-1 podría estar regulando la señalización de insulina, por lo tanto, se analizaron distintos blancos de la señalización de insulina en IS. Se observó que con el tratamiento siVCAM-1 aumentó significativamente la fosforilación en el residuo S473 de AKT comparada con el siControl. Esto tanto en la condición de normoxia como en IS por 8 horas; No obstante, con la presencia de insulina no se observó incremento en la activación de AKT (**Figura 33**). Un patrón similar se observó para el sustrato de AKT, GSK3 α/β , el cual es fosforilado en los residuos S21 y S9 (**Figura 34**). Para ERK 1/2, no se detectaron cambios significativos (**Figura 35**). También se observó activación de AKT y vías río abajo, como pS240/244 S6, al transfectar cardiomiocitos en condiciones de normoxia; además, no se detectaron cambios en IRS-1 (**Figuras Anexas A5**). Debido a que no se observó incremento significativo de la fosforilación en S473 de AKT con la presencia de insulina a las 8 horas de IS (**Figura 33**), se efectuó IS por 1 hora. Se observó que insulina produjo un aumento significativo en la fosforilación del residuo S473 en las células siControl en normoxia e isquemia; sin embargo, en la condición siVCAM-1, la presencia de insulina produjo aumento significativo en solo en la condición de normoxia (**Figura 36**). Estos resultados sugieren que VCAM-1 estaría regulando la activación de AKT, y que la activación crónica de esta quinasa sería responsable de la disminución de los efectos protectores de insulina durante IS.

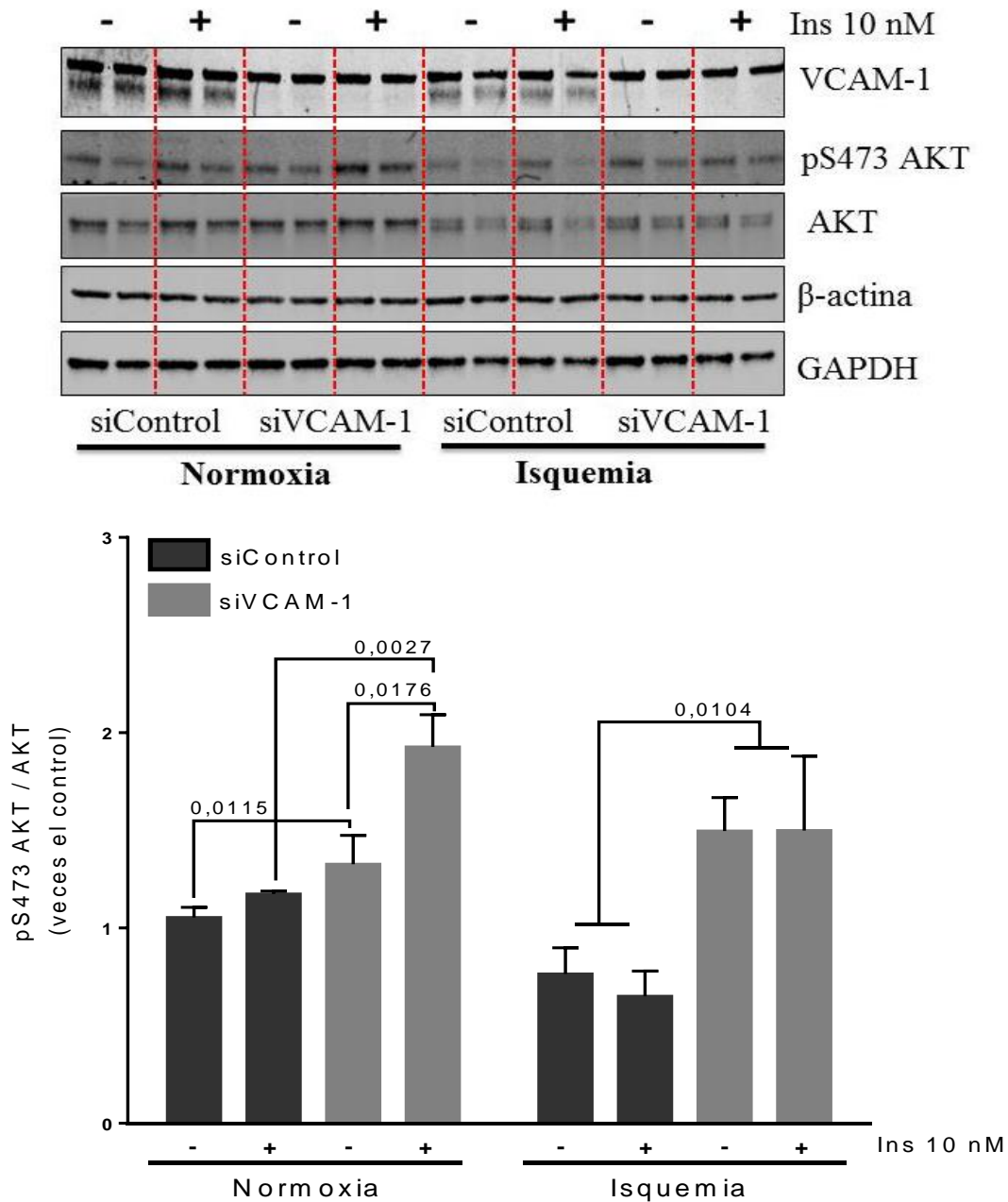


Figura 33. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en IS sobre la fosforilación de AKT en presencia de insulina. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a IS por 8 horas en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de VCAM-1, fosforilación en Ser473 AKT, AKT totales. β -actina y GAPDH fueron usados como controles de carga. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global = 0,0466) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

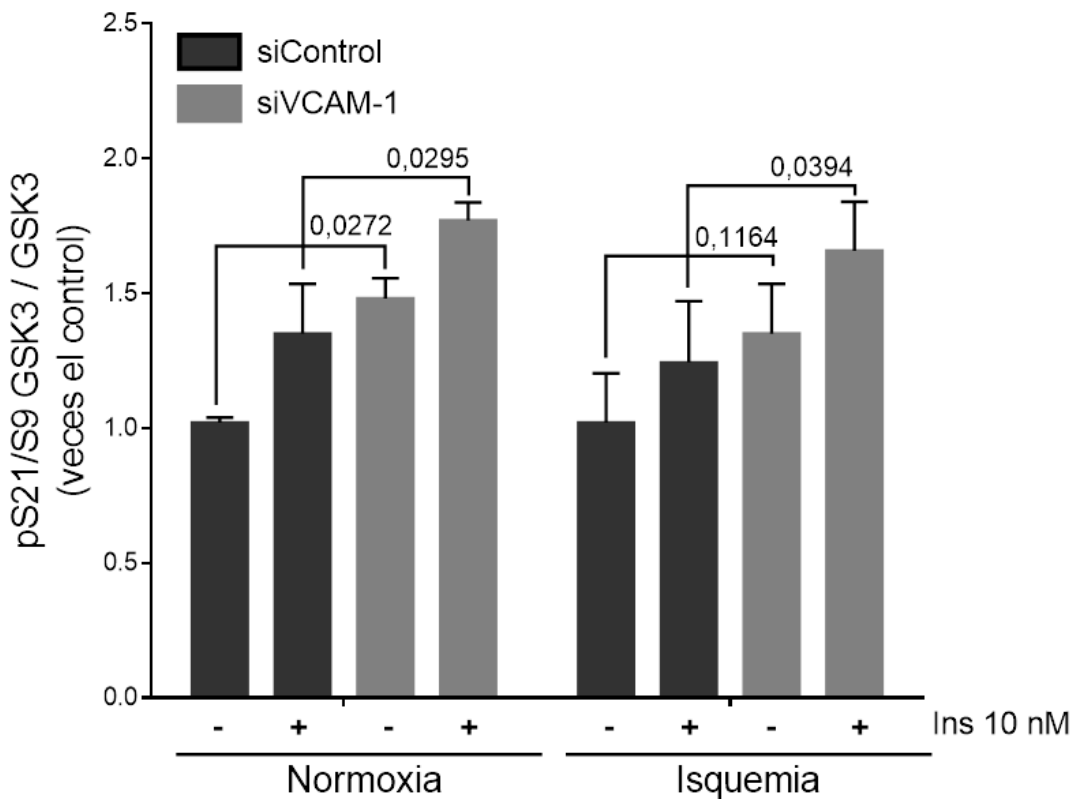
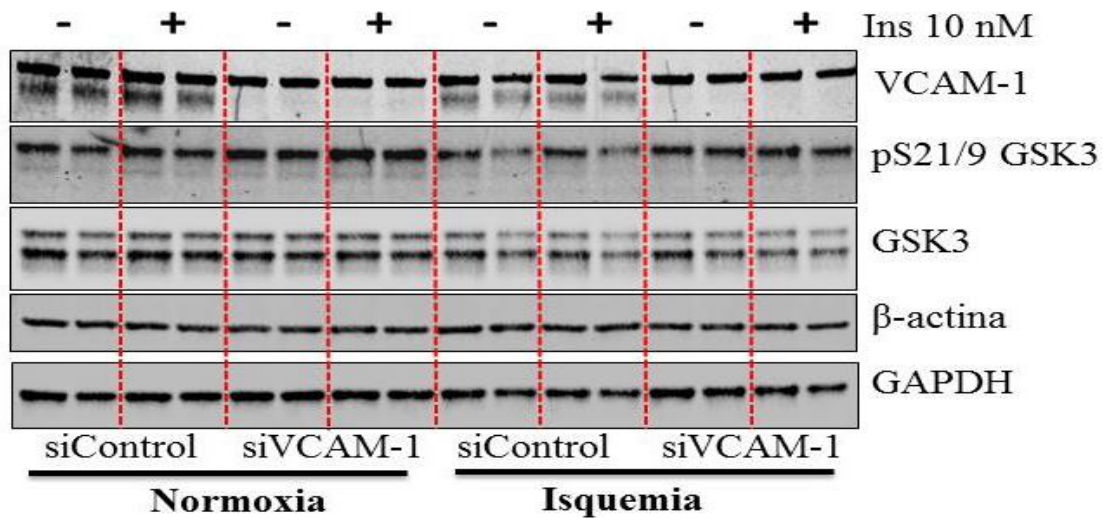


Figura 34. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en IS sobre fosforilación en los residuos de serinas 21/9 de GSK3 en presencia de insulina. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a IS por 8 horas en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de niveles de VCAM-1, fosforilación de GSK3 (S21/9). β-actina y GAPDH fueron usados como controles de carga. Datos expresados en promedio ± SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global = 0,0391) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un p≤0,05.

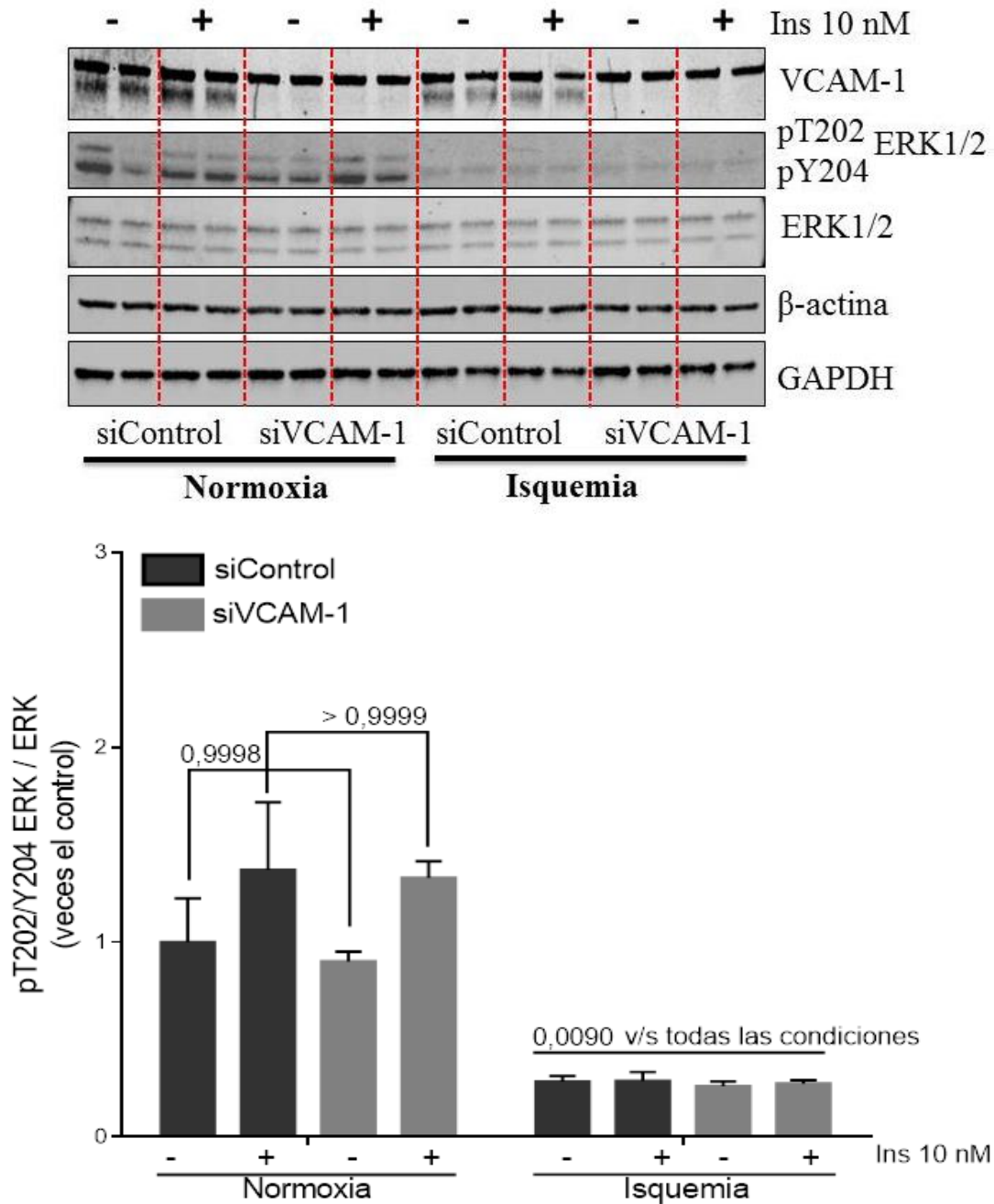


Figura 35. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en IS sobre fosforilación de ERK1/2 en presencia de insulina. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a IS por 8 horas en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de niveles de VCAM-1, fosforilación de ERK 1/2 (T202 y Y204). β-actina y GAPDH fueron usados como controles de carga. Datos expresados en promedio ± SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global = $< 0,0001$) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

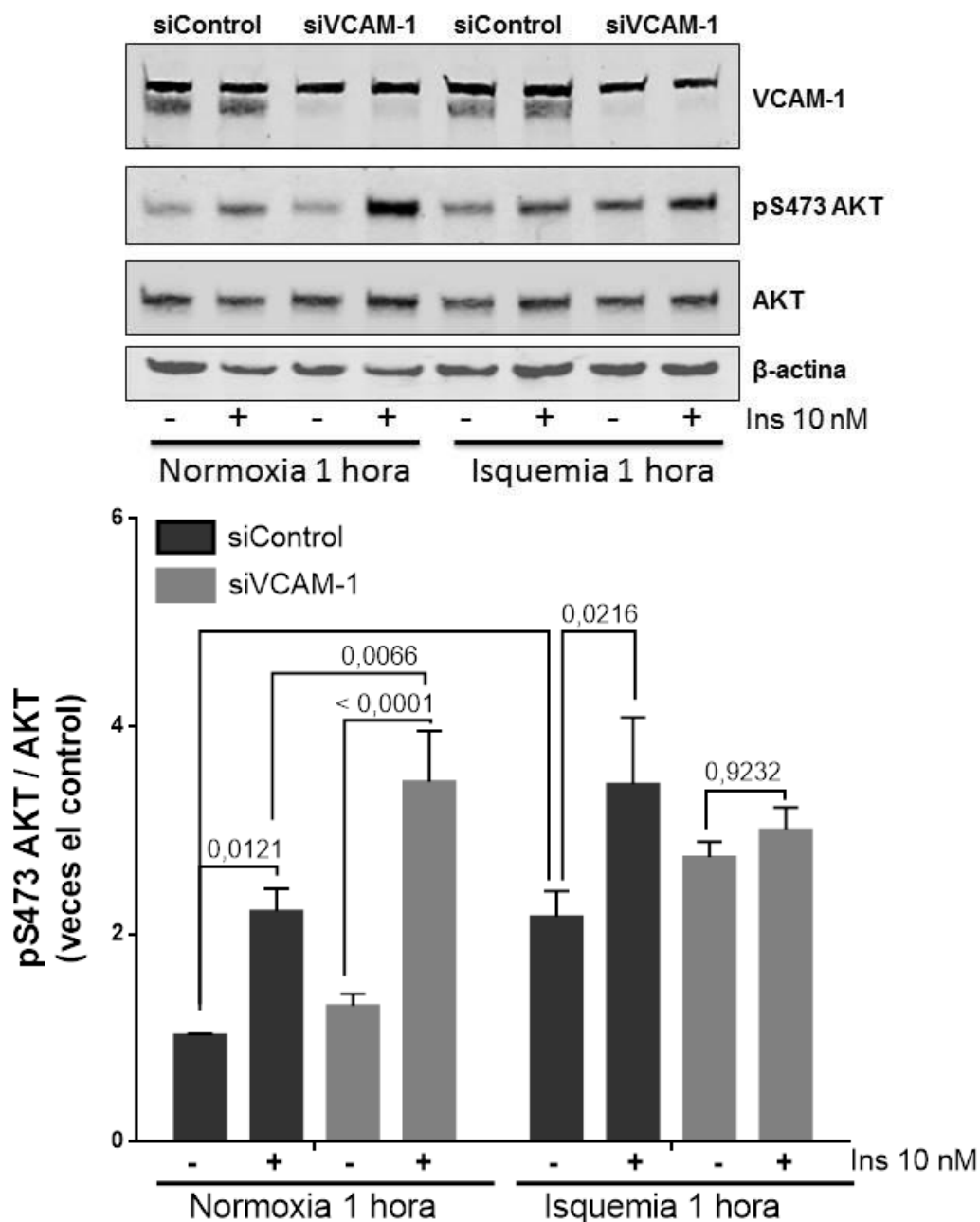


Figura 36. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la activación de AKT por presencia de insulina durante en IS por 1 hora. Cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA para VCAM-1 luego sometidos a IS por 1 hora en presencia o ausencia de insulina (Ins) 10 nM. Se determinaron niveles de VCAM-1, fosforilación de AKT en S473 y AKT total. β -actina fue usado como control de carga. Datos expresados en promedio \pm SEM con un tamaño muestral de 3 repeticiones independientes, análisis estadístico ANOVA de dos vías (p global 0,0001) y un post análisis de Tukey. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

8 DISCUSIÓN

En esta tesis se presentan dos grandes hallazgos: Primero, resultados que apuntan a clarificar el rol cardioprotector de insulina, encontrando que esta hormona protege los cardiomiocitos reduciendo la muerte por necrosis durante IS, rol protector que estaría mediado por AKT y NF- κ B. Segundo, nuestros resultados sugieren que VCAM-1 sería necesario para la función protectora de insulina, mecanismo que estaría mediado por la regulación de AKT.

8.1 Insulina protege frente a isquemia

Desde que Sodi-Pallares reportó que la infusión de GIK luego de un infarto agudo al miocardio produjo una mejor recuperación de los pacientes¹⁸, la literatura acerca del rol cardioprotector de insulina frente a I/R se ha extendido de manera significativa^{19,24,88,93-98}. Estas evidencias han fortalecido la idea del uso de la infusión de GIK con un agente cardioprotector durante reperfusión en humanos. Sin embargo, en el ensayo clínico CREATE-ECLA usando GIK como agente cardioprotector no encontraron resultados positivos²⁶. Por otro lado, Apstein *et al* propusieron que la efectividad de GIK estaría dada por su administración de forma temprana y antes de la reperfusión⁹⁹. En esta tesis se describen resultados que sugieren que el principal efecto de insulina está asociado con la disminución de la necrosis durante la isquemia. Por lo tanto, en los trabajos que han descrito cardioprotección por insulina durante reperfusión^{18,24,97}, este efecto se haya producido por la administración temprana de insulina, lo cual estaría reduciendo algún proceso necrótico iniciado en la isquemia. En conclusión, una vez que la reperfusión es iniciada los efectos de insulina sobre la apoptosis podrían ser insignificantes, lo cual explicaría los efectos nulos del ensayo clínico CREATE-ECLA²⁶. Pocos trabajos han estudiado los efectos cardioprotectores de insulina administrada antes o durante la isquemia^{98,100,101}. Sin embargo, ninguno de ellos caracterizó el efecto sobre la muerte de los cardiomiocitos durante esta etapa. Xing *et al* y Maroko *et al* mostraron que el tratamiento con insulina durante isquemia disminuyó las actividades de creatina quinasa y LDH en el plasma^{98,101}. Xing *et al* describieron una disminución de la apoptosis después de la reperfusión,

sin embargo, los análisis histológicos¹⁰¹ y ensayos de actividades enzimáticas plasmáticas^{98,101} sugieren una acción de insulina anti-necrótica.

Una observación que resulta interesante discutir, es la concentración de insulina. Debido a que se estudió el efecto de diferentes concentraciones de esta hormona (1, 10, 50 y 100 nM) y se observó que la mejor dosis para proteger los cardiomiocitos correspondió a 10 nM. Al utilizar concentraciones mayores o menores que esta, la función protectora de insulina disminuyó. Iwasaki *et al* describieron efectos antagonistas de insulina en modelo de hepatocarcinoma HuH7. En este trabajo observaron que insulina 1 nM por 6 horas tiene efectos anti-inflamatorios, pero al trabajar por tiempos mayores a 36 horas observaron un efecto contrario, pro-inflamatorio⁴³. Por lo tanto, es posible que en el modelo de cardiomiocitos las diferentes dosis de insulina tengan roles antagónicos. Además, sólo se estudiaron los efectos protectores de insulina en rangos muy amplios de concentración, por lo tanto, sería interesante explorar si existen dosis más efectivas que 10 nM en el modelo de cardiomiocitos.

8.2 Mecanismos de muerte celular en IS

Está bien descrito que los cardiomiocitos pueden morir por autofagia, apoptosis y necrosis⁴; sin embargo, durante I/R la muerte se asocia cerca de un 70% a necrosis y el otro 30% con apoptosis¹⁰². Insulina puede participar en la inhibición de cada uno de estos mecanismos de muerte^{88,103}. En nuestro modelo de IS se observó aumento de la muerte celular por necrosis y apoptosis, los cuales fueron inhibidos por la presencia de insulina; no obstante, no se observó disminución de los marcadores caspasa 3 activa y su sustrato PARP. Caspasa 3, es una caspasa ejecutora activada por la vía extrínseca de la apoptosis, iniciada por caspasa 8, y/o por la vía intrínseca mediada por el complejo entre apaf-1, citocromo c y caspasa 9 (conocido como apoptosoma)⁴. No obstante, caspasa 3 también puede ser cortada y activada por calpainas¹⁰⁴, las cuales corresponden a cisteína proteasas dependientes de calcio que también han sido descritas en modelos de isquemia en cardiomiocitos^{15,105}. Probablemente, en el modelo IS en cardiomiocitos las calpainas sean la principal vía de activación de caspasa 3. Otra vía de muerte no

estudiada en esta tesis, es la necroptosis, la cual corresponde a la muerte por necrosis programada¹⁰⁶. La necroptosis y proteínas participantes en este proceso han sido descritas en modelo de isquemia en el corazón^{106,107}. Sin embargo, los efectos de insulina sobre la necroptosis aún siguen siendo desconocidos. Más aún, la comunicación entre las diferentes rutas de muerte, y de cómo insulina podría estar regulando el flujo entre cada una durante I/R también son inciertos.

8.3 Insulina activa AKT en isquemia

Varios trabajos han involucrado a la vía PI-3K/AKT para explicar los efectos protectores de la solución GIK^{22,97,108-110}. AKT fosforila e inactiva varias proteínas pro-apoptóticas incluyendo BAD^{33,111}. En esta tesis se encontró que con la presencia de insulina en isquemia aumentaron las fosforilaciones de AKT que se asocian con su activación, es decir tanto en el loop de activación (T308) y como en la región regulatoria (S473). Interesantemente, también observamos que la IS, *per se*, produjo activación de AKT. Está reportado que esta quinasa de salvataje es activada en modelos de I/R^{112,113}. Sin embargo, a nuestro conocimiento sólo un trabajo ha descrito la activación de esta quinasa en modelo de IS¹¹³. Mockridge *et al* utilizaron una solución isquemia de composición similar a la nuestra, pero sin hipoxia, y observaron que la IS, hasta 60 minutos, no producía activación de AKT en cardiomiocitos neonatos de rata¹¹³. Esta diferencia podría ser atribuida a principalmente a los niveles de oxígeno, ya que Alvarez-Tejado *et al* describieron que la hipoxia induce activación de la vía PI-3K/AKT en modelo celular PC12¹¹⁴. Además, los niveles fosforilación de los residuos T308 y S473 de AKT se asociaron con un aumento en la fosforilación del residuo S136 de la proteína BAD, salvo en la condición de normoxia, lo cual podría ser atribuido a un efecto de temporalidad o posiblemente a otra quinasa que fosforile el mismo residuo, como PAK1 (*P21-activated kinase 1*)¹¹⁵. Esta es una proteína proapoptótica que pertenece a la familia Bcl-2, y ejerce su función uniéndose a Bcl-2 y Bcl-XL^{116,117}. Cuando AKT fosforila a BAD en S136 crea sitio de reconocimiento e interacción con la proteína 14-3-3, esta interacción libera a Bcl-2 o Bcl-XL promoviendo la sobrevivencia celular^{116,117}. Bcl-2 se asocia con prevención de la apertura del poro de

transición mitocondrial, evento que resulta en apoptosis o necrosis^{118,119}. De hecho, Bcl-2 o Bcl-XL por si solos pueden inhibir al poro de transición mitocondrial¹²⁰. El posible mecanismo involucra la inhibición de VDAC y ANT por Bcl-2^{121,122}. Por lo tanto, la fosforilación de BAD inducida por insulina por un lado estaría protegiendo de la IS, por un lado a través de la inhibición de la apoptosis por eje BAD/Bcl-2, y por otro lado a través de la inhibición de la necrosis mediante regulación la apertura del poro de transición mitocondrial.

8.4 Insulina activa NF- κ B en isquemia

Nuestros resultados mostraron que insulina estimula la activación de NF- κ B, lo que fue evidenciado por una disminución de los niveles proteicos del represor de NF- κ B, I κ B α , y se asoció con mayor traslocación nuclear de p65 e incremento de los niveles en la fosforilación en S536 de p65. Dan *et al* describieron activación de IKK dependiente de AKT/mTOR, lo cual lleva a una disminución de I κ B α y activación de NF- κ B⁵⁰. Además, previamente nuestro grupo mostro que insulina activa NF- κ B en cardiomiocitos, mecanismo dependiente de AKT⁴⁶. En esta tesis mostramos que insulina activa NF- κ B durante IS. Más aún, la inhibición tanto de AKT como NF- κ B usando AKTi VIII y BAY 11-7082, respectivamente, redujo los efectos protectores de insulina frente a IS. Sin embargo, los datos muestran claramente que el principal efecto en la activación de esta ruta de señalización fue inducido la IS, por lo tanto, es posible que insulina este potenciando y/o cambiando flujo de señalización de la vía NF- κ B. Esta posibilidad no se descarta, ya que durante la isquemia se generan citoquinas proinflamatorias y ligandos endógenos de los receptores tipo Toll los cuales inducen activación de vía NF- κ B, induciendo la expresión de proteínas proinflamatorias¹²³. La inflamación puede gatillar daño cardíaco, de hecho la inhibición de NF- κ B, en modelos animales, reduce el infarto cardíaco¹²³⁻¹²⁵. Por el contrario, nuestros resultados sugieren que la intervención de NF- κ B debe ser analizada con detalle, ya que NF- κ B regula necrosis durante la isquemia. En este sentido, Misra *et al* observaron que la activación de NF- κ B es requerida para disminuir la muerte celular inducida por isquemia, esto a través de la inducción de las proteínas antiapoptóticas c-IAP1

and Bcl-2⁵². Además, Baetz *et al* mostraron que NF-κB participaba en la protección frente a hipoxia, esto a través de la inhibición de la apertura de poro de transición mitocondrial¹²⁶.

NF-κB es un factor transcripcional anti-apoptótico^{52,127}. Sin embargo, NF-κB también puede inhibir la necrosis^{126,127}. NF-κB ejerce su rol protector mediante la inducción de la expresión de varios genes. Tales como A1/Bfl-1, Bcl-XL, FLIPL, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, TRAF1, TRAF2, SPI2a¹²⁸. Por otro lado, NF-κB también puede reprimir la expresión de ciertos genes, Baetz *et al* mostraron que NF-κB participa en la protección frente a hipoxia reprimiendo la expresión de la proteína BNIP3, proteína que induce de muerte a través de la apertura del poro de transición mitocondrial¹²⁶. Por lo tanto, la activación de NF-κB dependiente de insulina podría ser considerada como un mecanismo para disminuir la necrosis durante isquemia.

En conclusión, con estos resultados proponemos que insulina estaría protegiendo de la isquemia inhibiendo la necrosis, mecanismo que estaría dado a través de la activación AKT y NF-κB (Figura 39). De esta manera, estos resultados ayudan a clarificar el rol de insulina durante isquemia y soportan la literatura que apoya el uso de GIK durante el infarto cardiaco y otras situaciones de isquemia como los trasplantes.

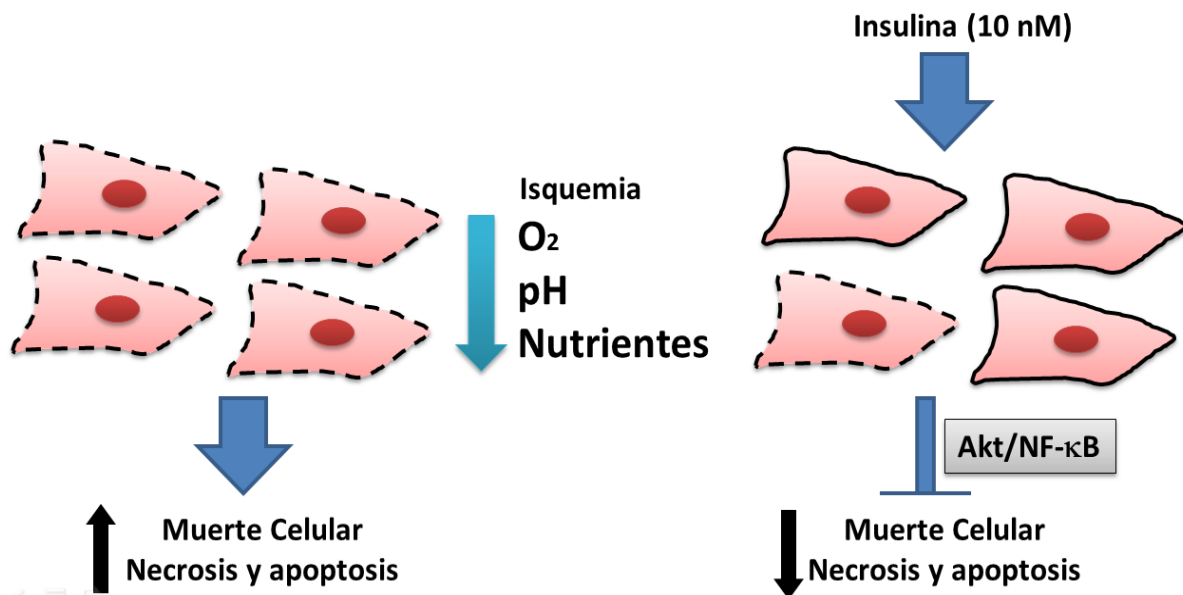


Figura 37. Modelo protección de insulina en IS. Durante IS (baja de oxígeno, pH y nutrientes), se produce muerte de los cardiomiocitos por apoptosis y necrosis. Sin embargo, con la presencia de insulina este daño fue reducido, mecanismo dependiente de la vía de señalización AKT y NF-κB.

8.5 VCAM-1 en isquemia y los efectos protectores de insulina

La primera parte de esta tesis describe los efectos protectores de insulina frente a IS, sin embargo estos efectos protectores fueron inhibidos por el silenciamiento de VCAM-1. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que VCAM-1 sería necesario para la función protectora de insulina durante isquemia.

Durante la isquemia se generan mediadores proinflamatorios que inducen la expresión de proteínas de adhesión¹²³. La inflamación puede gatillar daño cardíaco, por lo que su intervención, en modelos animales, reduce el infarto cardíaco^{123-125,129,130}. Debido a que VCAM-1, durante inflamación, participa en la adhesión de los leucocitos a la superficie endotelial¹³¹, por lo tanto sus niveles han sido asociado con daño cardíaco^{75,132,133}. No obstante, existen una serie de antecedentes que estarían sugiriendo una función diferente en el corazón, entre estos: a) ratones nulos para VCAM-1 no son viables ya que no se desarrollan correctamente el corazón y la placenta⁶⁷; b) la delección de su ligando, integrina α_4 , genera un fenotipo similar⁶⁸; c) VCAM-1 participa en el desarrollo muscular,

permitiendo la organización y fusión de los miotubos⁶⁹; d) se ha observado que esta proteína promueve la fusión celular, en modelo de células hematopoyéticas y líneas celulares HL-1 en respuesta a hipoxia⁶¹; e) la interacción VCAM-1/integrina $\alpha_4\beta_1$ participa en la inervación simpática del corazón, en modelo de rata⁷⁰; f) esta proteína fue propuesta como marcador de diferenciación de cardiomiocitos obtenidos a partir de células troncales y embrionarias inducidas^{71,72}; g) nuestro grupo detectó altos niveles de VCAM-1 en cardiomiocitos presentes en biopsias de corazón humano⁷⁵. Siguiendo con esta línea, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren un rol cardioprotector de VCAM-1, mediante la regulación la función protectora de insulina y/o factores de crecimiento, esto debido a tres razones: Primero, con la disminución de VCAM-1, la función protectora de insulina frente a IS es inhibida. Segundo, la disminución de VCAM-1 en modelo de I/R simulada incrementa el daño celular (datos no publicados, colaboración internacional). Tercero, la delección del gen de *VCAM-1* en cardiomiocitos en modelo de I/R *in vivo* en ratones incrementa el tamaño del infarto cardiaco (datos no publicados, colaboración internacional). En la literatura solo existe un antecedente que relaciona VCAM-1 con una función protectora⁷⁴. Chen *et al* demostraron, en modelo de cáncer mama, que VCAM-1 participaba en la protección de esta línea de cáncer cuando realiza metástasis al pulmón, esto a través de la interacción con los macrófagos residentes de este tejido⁷⁴. En células endoteliales, insulina incrementa los niveles de VCAM-1^{77,85}. Sin embargo, en cardiomiocito no detectamos cambios con la presencia de insulina, ni en condiciones de normoxia ni IS. En nuestras condiciones insulina no induce cambios, al menos hasta las 8 horas, en los niveles de esta proteína. En el cardiomiocito se expresan dos factores transcripcionales que reconocen elementos de respuesta en el promotor de VCAM-1 y que además son regulados por insulina, estos son NF- κ B⁶⁵ y FoxO1¹³⁴. Un vez que AKT es activado puede estimular la vía NF- κ B^{46,50}, por lo tanto, aumentar los niveles de VCAM-1^{45,77,85}; por otro lado, insulina puede inhibir a FoxO1 y reducir los niveles de VCAM-1^{85,134,135}. En nuestro modelo se detectó que la vía NF- κ B estaba activada en isquemia, pero tanto el mRNA como la proteína de VCAM-1 disminuyeron luego IS e *in vivo* (datos no publicados,

colaboración internacional). Además, Ferdous *et al* propusieron al eje FoxO1/VCAM-1 como una vía importante para el funcionamiento y desarrollo del corazón^{67,78,134}. Interesantemente, al igual que VCAM-1, los niveles de FoxO1 se encontraban reducidos en isquemia (datos no publicados, colaboración internacional). Todo esto sugiere que el principal regulador de VCAM-1 en cardiomiocitos, durante IS, sería el factor transcripcional FoxO1. Por otro lado, no existen antecedentes que relacionen a VCAM-1 y la adhesión de células del sistema inmune en el sitio del daño, por ejemplo interacción cardiomiocito macrófago. Aurora *et al* demostraron que los macrófagos son necesarios para la regeneración del corazón, en modelo de ratones neonatos¹³⁶. Por lo tanto, no se descartaría la participación de esta proteína de adhesión en la regeneración mediada por macrófagos. Sin embargo, en nuestro modelo, el cual está enriquecido en cardiomiocitos, siendo los otros tipos celulares menores al 5%¹³⁷, esto sugiere descartar la participación de macrófagos, y por lo tanto VCAM-1 podría estar participando mayormente en interacciones cardiomiocito-cardiomiocito y/o interacciones independiente de ligando. En resumen, todos estos antecedentes sugieren, y ya que no se observaron efectos de insulina, que VCAM-1 no sería un blanco río abajo de la señalización de insulina, por el contrario, estaría río arriba y/o en paralelo a la señalización de insulina participando en la cardioprotección frente al daño por isquemia.

8.6 Localización de VCAM-1 en cardiomiocitos.

VCAM-1 es una proteína que se localiza en vesículas para luego ser expuesta a la superficie celular y permitir la adhesión celular^{138,138-141}. Los resultados obtenidos, sugieren que VCAM-1, detectado con diferentes anticuerpos, estaría localizado en la superficie celular, en la región perinuclear y nuclear. Esto fue corroborado mediante extracción citosólica nuclear, encontrando a VCAM-1 enriquecido en los *pellets* nucleares. Este patrón es muy similar al del receptor de IGF-1 y al canal calcio tipo L que fue reportado por Ibarra *et al*, en este trabajo se describió que el receptor de IGF-1 estaría en invaginaciones membranosas que se proyectan desde la membrana celular hacia el núcleo, denominadas tubulos-T⁹¹. Sin

embargo, esta hipótesis debe ser probada con mayor rigurosidad, ya que se utilizó paraformaldehído como medio de fijación en las condiciones no permeabilizadas, por lo tanto, es probable que este reactivo haya seguido reaccionando para formar poros en la superficie celular. Interesantemente, mediante alineamiento de secuencias se encontró una secuencia de localización nuclear que podría explicar este patrón nuclear y perinuclear de VCAM-1. Aún desconocemos la relación entre la ubicación de VCAM-1 y la regulación de los efectos protectores de insulina. Posiblemente el receptor de insulina, al igual que el de IGF-1, se encuentre en los tubulos-T en donde VCAM-1 controlaría su señalización de manera estructural y/o funcional. En resumen, la localización debe ser explorada en profundidad.

8.7 VCAM-1 y la regulación de AKT.

VCAM-1 señala a través de ezrina, PI3K, AKT, RhoA, entre otros^{58,74}. En esta tesis se presentan resultados que sugieren a VCAM-1 como un regulador de AKT. En la literatura solo existe un antecedente que relaciona mecánicamente VCAM-1 y activación de AKT, en aquel trabajo Chen *et al* observaron que el agrupamiento de VCAM-1 reclutaba a ezrina la que a su vez interactúa con PI3K, llevando a la activación de AKT, y esta señalización estaría protegiendo a las células cancerígenas, sin embargo, este trabajo tiene un serie de falencias e incongruencias que debilitan la idea de que VCAM-1 podría activar AKT. Por ejemplo, el estudio de quinasas de este trabajo muestra que la aglomeración de VCAM-1 activa AKT, sin embargo, también observaron una disminución en la fosforilación de los residuos S21/9 de GSK3, que es un sustrato de AKT⁷⁴, lo cual estaría sugiriendo que VCAM-1 podría inhibir a esta quinasa. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la disminución de VCAM-1 favorece la activación de AKT, por lo tanto esta proteína sería “un regulador negativo o freno” de AKT. Aunque está descrito que esta quinasa participa activamente en protección^{88,108}, sin embargo su activación prolongada podría producir los efectos contrarios¹⁴². Fullmer *et al* observaron que tanto el preconditionamiento, pequeños ciclos de I/R, como insulina disminuyeron el tamaño del infarto, en modelo *ex vivo* de perfusión Langendorff en ratones, sin embargo el tratamiento combinado de

insulina y preconditionamiento no produjo efectos protectores, sin embargo, al deletar el gen que codifica para el receptor de insulina los efectos protectores del preconditionamiento combinado con insulina fueron recuperados, sugiriendo que estas vías protectoras se anulan entre sí. Un efecto similar fue observado al combinar el preconditionamiento o insulina con la sobreexpresión de AKT, mediante ratones transgénicos, en base a esto Fullmer *et al* propusieron que los efectos cardioprotectores del preconditionamiento e insulina frente al infarto serían anulados por una sobreactivación de AKT¹⁴². Por lo tanto, al igual que los resultados reportados por Fullmer *et al*, la sobreactivación y/o activación sostenida de AKT inducida por la disminución de VCAM-1 estaría inhibiendo la función protectora de insulina frente a IS. Sin embargo, la interrogante más importante que surge de esto es cómo la disminución de VCAM-1 activa a AKT. Posiblemente, en nuestro modelo, VCAM-1 actúa como un inhibidor en *cis* de la señalización de integrina $\alpha_4\beta_1$. Hipótesis se sustenta en los siguientes antecedentes: a) Se ha descrito que los receptores tipo IgG pueden interactuar en *cis*, actuando de manera inhibitoria en la señalización del contra receptor y/o ligando¹⁴³; b) VCAM-1 disminuye luego de IS e I/R (*in vitro* e *in vivo*, datos no publicados); c) siVCAM-1 activa AKT; d) integrinas α_4 (datos no publicados) y β_1 ¹⁴⁴ se encuentran expresadas en cardiomiocitos; e) Integrina β_1 se encuentra sobreactivada en tejido cardíaco infartado¹⁴⁵; f) β_1 señala a través de la proteína ezrina¹⁴⁶; y g) ezrina incrementa en SI, siVCAM-1 incrementa ezrina y el silenciamiento de ezrina reduce el daño en modelo I/R (datos no publicados). Por lo tanto, queda el camino abierto a futuras investigaciones para explorar esta posible interacción VCAM-1/Integrina en *cis* en células musculares.

Con la segunda parte de esta tesis (Objetivos 2 y 3), se obtuvo resultados que sugieren que VCAM-1 participa en el rol protector de insulina. Esta función estaría dada a través de la regulación de AKT (Figura 40). Respecto al eje VCAM-1/AKT en cardiomiocitos y su rol durante I/R, no existe ningún antecedente. Por lo tanto, estos resultados corresponden a una completa novedad acerca de VCAM-1, su función, localización y señalización. Sin embargo, queda mucho por estudiar sobre el mecanismo por el cual VCAM-1

regula AKT y la señalización de insulina, además de entender cómo se produce la activación de VCAM-1.

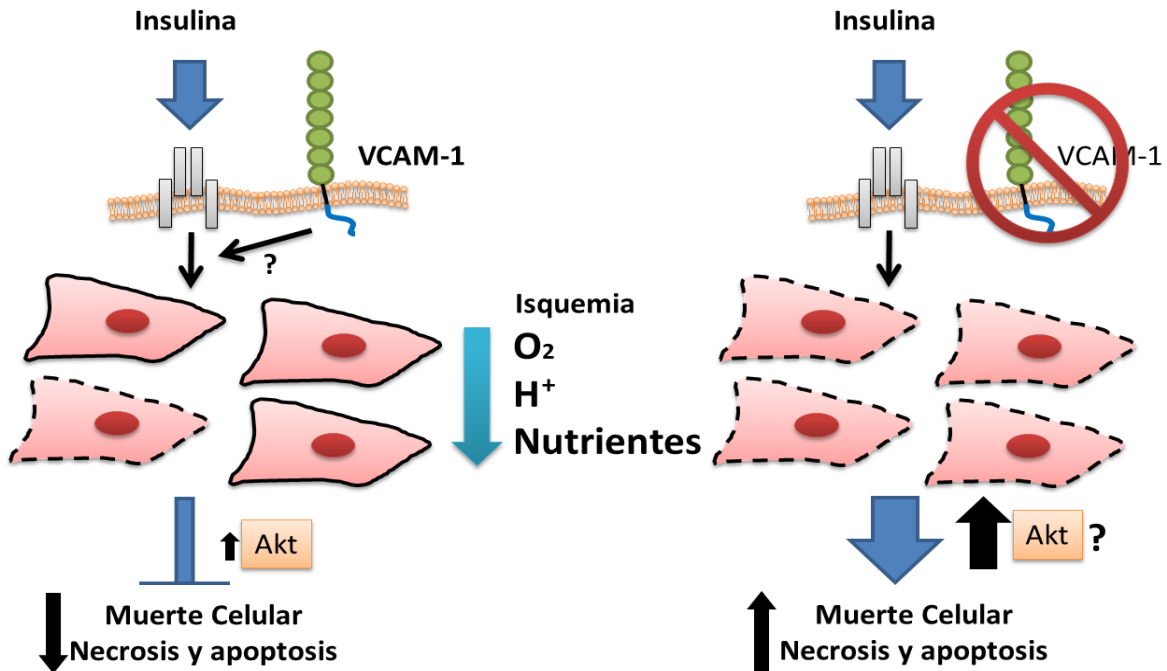


Figura 38. Modelo participación de VCAM-1 protección de insulina en IS. Durante IS (baja de oxígeno, pH y nutrientes), se produce muerte de los cardiomiocitos por apoptosis y necrosis. Sin embargo, con el tratamiento de insulina este daño es reducido, en parte, por la activación de AKT que es regulada de alguna manera por la presencia de VCAM-1. Por otro lado, con la disminución de VCAM-1, mediante un mecanismo aún desconocido, se produce una activación sostenida de AKT que sería responsable de la pérdida de los efectos protectores de insulina frente a IS.

9 CONCLUSIONES

- IS incrementa los parámetros de muerte celular asociados a necrosis (LDH y exclusión por azul de tripán) y apoptosis (células TUNEL positivas y población subG1) en modelo de cardiomiocitos neonatos de rata. La presencia de insulina reduce estos parámetros, principalmente la concentración 10 nM. Por lo tanto, insulina protege de IS, inhibiendo la necrosis y apoptosis.
- La presencia de insulina se correlacionó con mayor activación de AKT y NF- κ B durante IS, los inhibidores AKTi VIII y BAY 11-7082 redujeron los efectos protectores de esta hormona. Por lo tanto, AKT y NF- κ B estarían participando de los efectos protectores de insulina en el modelo de IS.
- La presencia de insulina no relacionó con cambios en los niveles de VCAM-1 en normoxia ni en IS, al menos hasta las 8 horas. Por lo tanto, insulina no regula los niveles de VCAM-1 en cardiomiocitos neonatos.
- La activación de NF- κ B no se correlacionó la disminución del mRNA y la proteína VCAM-1. Por lo tanto, NF- κ B no estaría regulando los niveles de VCAM-1 en el modelo de cardiomiocitos neonatos.
- IS se asoció con reducción del mRNA y proteína de VCAM-1 en comparación con la condición de normoxia. Por lo tanto, SI reduce los niveles de VCAM-1 posiblemente, inhibiendo la transcripción de este gen.
- siVCAM-1 redujo los efectos protectores de insulina frente a IS. Por lo tanto, VCAM-1 sería necesario para la función cardioprotectora de insulina frente a IS.
- siVCAM-1 se relacionó con mayor fosforilación de S473 de AKT a las 8 horas de IS. Por lo tanto, VCAM-1 estaría regulando la activación de AKT.
- En la IS por 1 hora, la condición siControl produjo mayor fosforilación en S473 de AKT con la presencia de insulina, sin embargo, el tratamiento siVCAM-1 no produjo incremento en esta fosforilación con la administración de insulina. Por lo tanto, VCAM-1 sería necesario para la función protectora de insulina frente a IS, a través de la regulación de AKT.

10 PROYECCIONES

Más de 50 años ha pasado desde la primera vez que se utilizó insulina como agente cardioprotector frente a infarto¹⁸, sin embargo se ha generado bastante controversia acerca de si realmente puede proteger^{27,87,147,148}. Por definición isquemia es un proceso que ocurre por la reducción total o parcial del flujo sanguíneo, lo que puede ocurrir durante infarto, aumento de la demanda energética o durante un trasplante de órgano. Esto último, es un tremendo campo para la aplicación de insulina como agente cardioprotector, ya que durante la cirugía de trasplante el corazón saludable es sometido a isquemia sin haber oclusión de una arteria, y la utilización de insulina durante el trasplante podría tener grandes beneficios para reducir el daño en el paciente y el órgano a trasplantar. Varias soluciones de preservación han sido utilizadas durante trasplante de corazón: solución de Wisconsin, histidina-triptofano-cetoglutarato, St. Thomas Hospital, solución de cardioplegia y sangre¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Insulina ha sido agregada en algunos casos para mantener el estado metabólico *ex vivo*^{152,153}. Sin embargo, ningún trabajo ha evaluado el rol cardioprotector de insulina en estas soluciones. Por lo tanto, son necesarias futuras investigaciones para clarificar la contribución de insulina como agente cardioprotector en la preservación de órganos.

Finalmente, sacar a la luz resultados que proponen a VCAM-1 como un regulador de la señalización de insulina, podría ser el eslabón faltante para relacionar inflamación y señalización de insulina. Aunque la idea de la comunicación entre adhesión y factores de crecimiento ha sido propuesta antes¹⁵⁴. Sin embargo, el rol de VCAM-1 en las fisiopatologías del corazón y cómo podría estar regulado la señalización de los factores de crecimientos, como insulina, aún son desconocidos. Además, deben realizarse muchos estudios para comprender el mecanismo por el cual VCAM-1 está regulando la señalización, posiblemente la agrupación de VCAM-1 y/o la comunicación *in cis* sea una plataforma de señalización que recluta diferentes mediadores como proteínas adaptadoras y fosfatasas que regulan la señalización de insulina.

11 REFERENCIAS

1. Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K. & Baudino, T. a. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **293**, H1883–91 (2007).
2. Ikenishi, A. *et al.* Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages. *Dev. Growth Differ.* **54**, 731–8 (2012).
3. Beltrami, A. P. *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* **344**, 1750–7 (2001).
4. Chiong, M. *et al.* Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis* **2**, e244 (2011).
5. Shi, Y., Camici, G. G. & Lüscher, T. F. Cardiovascular determinants of life span. *Pflugers Arch.* **459**, 315–24 (2010).
6. Albacker, T. B., Carvalho, G., Schrickler, T. & Lachapelle, K. Myocardial protection during elective coronary artery bypass grafting using high-dose insulin therapy. *Ann Thorac Surg* **84**, 1920–7; discussion 1920–7 (2007).
7. Hartmann, M. & Decking, U. K. Blocking Na(+)-H+ exchange by cariporide reduces Na(+)-overload in ischemia and is cardioprotective. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 1985–95 (1999).
8. Murphy, E., Perlman, M., London, R. E. & Steenbergen, C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* **68**, 1250–1258 (1991).
9. Steenbergen, C., Fralix, T. A. & Murphy, E. Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol* **88**, 456–70 (1993).
10. Vandenberg, J. I., Rees, S. A., Wright, A. R. & Powell, T. Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **32**, 85–97 (1996).
11. Bonen, a. Lactate transporters (MCT proteins) in heart and skeletal muscles. *Med Sci Sport. Exerc* **32**, 778–89 (2000).
12. Murphy, E. & Steenbergen, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev.* **88**, 581–609 (2008).
13. Stephanou, a *et al.* Distinct initiator caspases are required for the induction of apoptosis in cardiac myocytes during ischaemia versus reperfusion injury. *Cell Death Differ* **8**, 434–5 (2001).
14. Chandrashekhar, Y., Sen, S., Anway, R., Shuros, A. & Anand, I. Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**, 295–301 (2004).

15. Pedrozo, Z. *et al.* Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 356–62 (2010).
16. Liu, H., Cala, P. M. & Anderson, S. E. Na/H exchange inhibition protects newborn heart from ischemia/reperfusion injury by limiting Na⁺-dependent Ca²⁺ overload. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **55**, 227–33 (2010).
17. Chouchani, E. T. *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431–435 (2014).
18. Sodi-Pallares, D. *et al.* Effects of an intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report. *Am J Cardiol* **9**, 166–81 (1962).
19. Belke, D. D. *et al.* Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* **109**, 629–39 (2002).
20. Tune, J. D., Mallet, R. T. & Downey, H. F. Insulin improves cardiac contractile function and oxygen utilization efficiency during moderate ischemia without compromising myocardial energetics. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 2025–35 (1998).
21. Tune, J. D., Mallet, R. T. & Downey, H. F. Insulin improves contractile function during moderate ischemia in canine left ventricle. *Am J Physiol* **274**, H1574–81 (1998).
22. Jonassen, a. K., Sack, M. N., Mjos, O. D. & Yellon, D. M. Myocardial Protection by Insulin at Reperfusion Requires Early Administration and Is Mediated via Akt and p70s6 Kinase Cell-Survival Signaling. *Circ Res* **89**, 1191–1198 (2001).
23. Ricci, C., Pastukh, V., Mozaffari, M. & Schaffer, S. W. Insulin withdrawal induces apoptosis via a free radical-mediated mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* **85**, 455–64 (2007).
24. Jonassen, a K. *et al.* Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 757–64 (2000).
25. Yu, Q.-J. *et al.* Insulin inhibits beta-adrenergic action in ischemic/reperfused heart: a novel mechanism of insulin in cardioprotection. *Apoptosis* **13**, 305–17 (2008).
26. Mehta, S. R. *et al.* Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial. *JAMA* **293**, 437–46 (2005).
27. Apstein, C. S. Glucose-insulin-potassium infusion and mortality in the CREATE-ECLA trial. *JAMA* **293**, 2596–7; author reply 2598 (2005).
28. Weiss, M. a. Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus. *J Biol Chem* **284**, 19159–63 (2009).
29. Becker, A. B. & Roth, R. A. Insulin receptor structure and function in normal and pathological

- conditions. *Annu Rev Med* **41**, 99–115 (1990).
30. Sun, X. J., Crimmins, D. L., Myers, M. G., Miralpeix, M. & White, M. F. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* **13**, 7418–28 (1993).
 31. Sun, X. J. *et al.* Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* **377**, 173–7 (1995).
 32. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–9 (1995).
 33. Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231–41 (1997).
 34. Peck, G. R. *et al.* Insulin-stimulated phosphorylation of the Rab GTPase-activating protein TBC1D1 regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* **284**, 30016–23 (2009).
 35. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K. & Fukamizu, A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11285–90 (2003).
 36. Tiwary, R., Yu, W., Sanders, B. G. & Kline, K. α -TEA cooperates with MEK or mTOR inhibitors to induce apoptosis via targeting IRS/PI3K pathways. *Br J Cancer* **104**, 101–9 (2011).
 37. Wang, X. *et al.* Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* **20**, 4370–9 (2001).
 38. Kim, S. J. & Kahn, C. R. Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression. *Biochem J* **323**, 621–7 (1997).
 39. Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R.-H., Fingar, D. C. & Blenis, J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**, 556–64 (2002).
 40. Uchiyama, T., Engelman, R. M., Maulik, N. & Das, D. K. Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation* **109**, 3042–9 (2004).
 41. Yue, T. L. *et al.* Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res* **86**, 692–9 (2000).
 42. Conejo, R., Valverde, A. M., Benito, M. & Lorenzo, M. Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB and downregulation of AP-1 activities. *J Cell Physiol* **186**, 82–94 (2001).
 43. Iwasaki, Y. *et al.* Insulin exhibits short-term anti-inflammatory but long-term proinflammatory

effects in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **298**, 25–32 (2009).

44. Mackesy, D. Z. & Goalstone, M. L. Insulin augments tumor necrosis factor- α stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. *J. Inflamm.* **8**, 34 (2011).
45. Madonna, R., Massaro, M. & De Caterina, R. Insulin potentiates cytokine-induced VCAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 511–6 (2008).
46. Parra, V. *et al.* Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NF κ B-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes* **63**, 75–88 (2014).
47. Ozes, O. N. *et al.* NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82–5 (1999).
48. Sun, Z.-J. *et al.* Activation of PI3K/Akt/IKK- α /NF- κ B signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: its inhibition by quercetin. *Apoptosis* **15**, 850–63 (2010).
49. Sigala, I. *et al.* MAPKs and NF- κ B differentially regulate cytokine expression in the diaphragm in response to resistive breathing: the role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R1152–62 (2011).
50. Dan, H. C. *et al.* Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev.* **22**, 1490–500 (2008).
51. Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* **26**, 203–34 (2012).
52. Misra, A. *et al.* Nuclear factor- κ B protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circulation* **108**, 3075–8 (2003).
53. Maulik, N., Sato, M., Price, B. D. & Das, D. K. An essential role of NF κ B in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett* **429**, 365–9 (1998).
54. Xuan, Y.-T. *et al.* Nuclear Factor- κ B Plays an Essential Role in the Late Phase of Ischemic Preconditioning in Conscious Rabbits. *Circ Res* **84**, 1095–1109 (1999).
55. Zhong, X. & Rescorla, F. J. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Signal* **24**, 393–401 (2012).
56. van Buul, J. D., Kanters, E. & Hordijk, P. L. Endothelial signaling by Ig-like cell adhesion molecules. *Arter. Thromb Vasc Biol* **27**, 1870–6 (2007).
57. Henninger, D. D. *et al.* Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs

- of the mouse. *J Immunol* **158**, 1825–32 (1997).
58. van Wetering, S. *et al.* VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C343–52 (2003).
 59. Alon, R. *et al.* The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* **128**, 1243–53 (1995).
 60. Yang, J. C.-S. *et al.* Simvastatin reduces VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to lipopolysaccharide. *Inflamm Res* **61**, 485–91 (2012).
 61. Zhang, S., Shpall, E., Willerson, J. T. & Yeh, E. T. H. Fusion of human hematopoietic progenitor cells and murine cardiomyocytes is mediated by alpha 4 beta 1 integrin/vascular cell adhesion molecule-1 interaction. *Circ Res* **100**, 693–702 (2007).
 62. Gustavsson, C. *et al.* Vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in mice retinal vessels is affected by both hyperglycemia and hyperlipidemia. *PLoS One* **5**, e12699 (2010).
 63. Marui, N. *et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **92**, 1866–74 (1993).
 64. Neish, a S., Williams, a J., Palmer, H. J., Whitley, M. Z. & Collins, T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* **176**, 1583–93 (1992).
 65. Iademarco, M. F., McQuillan, J. J., Rosen, G. D. & Dean, D. C. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* **267**, 16323–9 (1992).
 66. Lee, S. *et al.* Hydrogen peroxide increases human leukocyte adhesion to porcine aortic endothelial cells via NFkappaB-dependent up-regulation of VCAM-1. *Int Immunol* **19**, 1349–59 (2007).
 67. Gurtner, G. C. *et al.* Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* **9**, 1–14 (1995).
 68. Yang, J. T., Rayburn, H. & Hynes, R. O. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* **121**, 549–60 (1995).
 69. Rosen, G. D. *et al.* Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* **69**, 1107–19 (1992).
 70. Wingerd, K. L. *et al.* Alpha 4 integrins and vascular cell adhesion molecule-1 play a role in sympathetic innervation of the heart. *J Neurosci* **22**, 10772–80 (2002).
 71. Uosaki, H. *et al.* Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PLoS One* **6**, e23657

(2011).

72. Elliott, D. a *et al.* NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. *Nat. Methods* **8**, 1037–40 (2011).
73. Lazaar, A. L., Krymskaya, V. P. & Das, S. K. VCAM-1 activates phosphatidylinositol 3-kinase and induces p120Cbl phosphorylation in human airway smooth muscle cells. *J Immunol* **166**, 155–61 (2001).
74. Chen, Q., Zhang, X. H.-F. & Massagué, J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell* **20**, 538–49 (2011).
75. Verdejo, H. *et al.* Systemic vascular cell adhesion molecule-1 predicts the occurrence of post-operative atrial fibrillation. *Int. J. Cardiol.* **150**, 270–276 (2011).
76. Iademarco, M. F., McQuillan, J. J. & Dean, D. C. Vascular cell adhesion molecule 1: contrasting transcriptional control mechanisms in muscle and endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3943–7 (1993).
77. Madonna, R., Pandolfi, a, Massaro, M., Consoli, a & De Caterina, R. Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated protein-kinase. *Diabetologia* **47**, 532–6 (2004).
78. Kwee, L. *et al.* Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* **121**, 489–503 (1995).
79. Gutiérrez, J., Párrizas, M., Maestro, M. A., Navarro, I. & Plisetskaya, E. M. Insulin and IGF-I binding and tyrosine kinase activity in fish heart. *J Endocrinol* **146**, 35–44 (1995).
80. Gutiérrez, T. *et al.* Alteration in mitochondrial Ca(2+) uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell Commun. Signal.* **12**, 68 (2014).
81. Rose, D. M., Cardarelli, P. M., Cobb, R. R. & Ginsberg, M. H. Soluble VCAM-1 binding to $\alpha_4\beta_1$ integrins is cell-type specific and activation dependent and is disrupted during apoptosis in T cells. **95**, 602–610 (2014).
82. Ranganathan, M., Dokic, D., Sterrett, S. W. & Dwyer, K. L. Soluble VCAM-1 Alters Lipid Phosphatase Activity in Epicardial Mesothelial Cells : Implications for Lipid Signaling During Epicardial Formation. **1**, 159–185 (2013).
83. Parra, V. *et al.* Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFkB-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes* 2–50 (2013). doi:10.2337/db13-0340
84. Martelli, A. M. *et al.* The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 2168–78 (2012).

85. Wang, Q. *et al.* Tectorigenin Attenuates Palmitate-Induced Endothelial Insulin Resistance via Targeting ROS-Associated Inflammation and IRS-1 Pathway. *PLoS One* **8**, (2013).
86. Zhang, Y. *et al.* Pharmacological activation of PPAR gamma ameliorates vascular endothelial insulin resistance via a non-canonical PPAR gamma-dependent nuclear factor-kappa B trans-repression pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **754**, 41–51 (2015).
87. Schipke, J. D., Friebe, R. & Gams, E. Forty years of glucose-insulin-potassium (GIK) in cardiac surgery: a review of randomized, controlled trials. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **29**, 479–85 (2006).
88. Yu, Q., Gao, F. & Ma, X. L. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* **89**, 516–24 (2011).
89. Ju, J. *et al.* Phosphorylation of p50 NF-kappaB at a single serine residue by DNA-dependent protein kinase is critical for VCAM-1 expression upon TNF treatment. *J Biol Chem* **285**, 41152–60 (2010).
90. Garton, K. J. *et al.* Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J. Biol. Chem.* **278**, 37459–64 (2003).
91. Ibarra, C. *et al.* Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors. *Circ. Res.* **112**, 236–45 (2013).
92. Lim, S.-T. *et al.* Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. *J. Cell Biol.* **197**, 907–19 (2012).
93. Zhang, H.-X. *et al.* Physiologically tolerable insulin reduces myocardial injury and improves cardiac functional recovery in myocardial ischemic/reperfused dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **48**, 306–13 (2006).
94. Wong, V. W., Mardini, M., Cheung, N. W. & Mihailidou, A. S. High-dose insulin in experimental myocardial infarction in rabbits: protection against effects of hyperglycaemia. *J. Diabetes Complications* **25**, 122–8 (2011).
95. Gao, X. *et al.* PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 14509–14514 (2011).
96. Ng, K. W., Allen, M. L., Desai, A., Macrae, D. & Pathan, N. Cardioprotective effects of insulin: how intensive insulin therapy may benefit cardiac surgery patients. *Circulation* **125**, 721–8 (2012).
97. Gao, F. *et al.* Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* **105**, 1497–502 (2002).
98. Xing, W. *et al.* Insulin inhibits myocardial ischemia-induced apoptosis and alleviates chronic

- adverse changes in post-ischemic cardiac structure and function. *Apoptosis* **14**, 1050–60 (2009).
99. Apstein, C. S. Glucose-insulin-potassium for acute myocardial infarction: remarkable results from a new prospective, randomized trial. *Circulation* **98**, 2223–6 (1998).
 100. Baines, C. P., Wang, L., Cohen, M. V & Downey, J. M. Myocardial protection by insulin is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase C or KATP channels in the isolated rabbit heart. *Basic Res. Cardiol.* **94**, 188–98 (1999).
 101. Maroko, P. R. *et al.* Effect of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial infarction following experimental coronary artery occlusion. *Circulation* **45**, 1160–75 (1972).
 102. Zhang, T. *et al.* CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat. Med.* (2016). doi:10.1038/nm.4017
 103. Chaanine, A. H. & Hajjar, R. J. AKT signalling in the failing heart. *Eur. J. Heart Fail.* **13**, 825–9 (2011).
 104. Li, X. *et al.* The role of the Hsp90/Akt pathway in myocardial calpain-induced caspase-3 activation and apoptosis during sepsis. *BMC Cardiovasc. Disord.* **13**, 8 (2013).
 105. Inserte, J., Hernando, V. & Garcia-Dorado, D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **96**, 23–31 (2012).
 106. Zhou, W. & Yuan, J. Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **35**, 14–23 (2014).
 107. Luedde, M. *et al.* RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **103**, 206–16 (2014).
 108. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail. Rev.* **12**, 217–34 (2007).
 109. Carvalho, G. *et al.* Cardioprotective effects of glucose and insulin administration while maintaining normoglycemia (GIN therapy) in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1469–77 (2011).
 110. Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N. & Walsh, K. Akt Promotes Survival of Cardiomyocytes In Vitro and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse Heart. *Circulation* **101**, 660–667 (2000).
 111. Dhanasekaran, A. *et al.* Multiple antiapoptotic targets of the PI3K / Akt survival pathway are activated by epoxyeicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia / anoxia. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **294**, H724–35 (2008).
 112. Armstrong, S. C. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **61**, 427–36 (2004).

113. Mockridge, J. W., Marber, M. S. & Heads, R. J. Activation of Akt during simulated ischemia/reperfusion in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 947–952 (2000).
114. Alvarez-Tejado, M. *et al.* Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 22368–74 (2001).
115. Schürmann, a *et al.* p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 453–61 (2000).
116. Downward, J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat. Cell Biol.* **1**, E33–5 (1999).
117. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619–28 (1996).
118. Shimizu, S. *et al.* Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene* **12**, 2045–50 (1996).
119. Tsujimoto, Y., Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W. & Matsuda, H. Bcl-2 and Bcl-xL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia* **11 Suppl 3**, 380–2 (1997).
120. Marzo, I. *et al.* The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* **187**, 1261–71 (1998).
121. Marzo, I. *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**, 2027–31 (1998).
122. Shimizu, S. *et al.* Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1455–9 (1998).
123. Van der Heiden, K., Cuhlmann, S., Luong, L. A., Zakkar, M. & Evans, P. C. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin. Sci. (Lond)*. **118**, 593–605 (2010).
124. Zingarelli, B., Hake, P. W., Denenberg, A. & Wong, H. R. Sesquiterpene lactone parthenolide, an inhibitor of IkappaB kinase complex and nuclear factor-kappaB, exerts beneficial effects in myocardial reperfusion injury. *Shock* **17**, 127–34 (2002).
125. Latanich, C. A. & Toledo-Pereyra, L. H. Searching for NF-kappaB-based treatments of ischemia reperfusion injury. *J. Invest. Surg.* **22**, 301–15 (2009).
126. Baetz, D. *et al.* Nuclear factor-kappaB-mediated cell survival involves transcriptional silencing of the mitochondrial death gene BNIP3 in ventricular myocytes. *Circulation* **112**, 3777–85 (2005).

127. Fan, Y., Dutta, J., Gupta, N., Fan, G. & Gélinas, C. Regulation of programmed cell death by NF-kappaB and its role in tumorigenesis and therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **615**, 223–50 (2008).
128. Papa, S. *et al.* The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ.* **13**, 712–29 (2006).
129. Kim, Y. S. *et al.* BAY 11-7082, a nuclear factor-kB inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model. *Int. Heart J.* **51**, 348–53 (2010).
130. Hamid, T. *et al.* Cardiomyocyte NF-kB p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure. *Cardiovasc Res* **89**, 129–38 (2011).
131. Elices, M. J. *et al.* VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60**, 577–84 (1990).
132. Qu, Y. *et al.* VCAM-1 siRNA reduces neointimal formation after surgical mechanical injury of the rat carotid artery. *J. Vasc. Surg. Off. Publ. Soc. Vasc. Surg. [and] Int. Soc. Cardiovasc. Surgery, North Am. Chapter* **50**, 1452–8 (2009).
133. Kacimi, R., Karliner, J. S., Koudssi, F. & Long, C. S. Expression and Regulation of Adhesion Molecules in Cardiac Cells by Cytokines : Response to Acute Hypoxia. *Circ Res* **82**, 576–586 (1998).
134. Ferdous, A. *et al.* Forkhead factor FoxO1 is essential for placental morphogenesis in the developing embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16307–12 (2011).
135. Battiprolu, P. K. *et al.* Metabolic stress – induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice. **122**, 1109–1118 (2012).
136. Aurora, A. B. *et al.* Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J. Clin. Invest.* **124**, 1382–92 (2014).
137. Foncea, R. *et al.* Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* **272**, 19115–24 (1997).
138. van Wetering, S. *et al.* VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C343–52 (2003).
139. Harant, H. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor cotranslational translocation by the cyclopeptolide CAM741. *Mol. Pharmacol.* **71**, 1657–65 (2007).
140. Besemer, J. *et al.* Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1. *Nature* **436**, 290–3 (2005).
141. Barreiro, O. *et al.* Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J. Cell Biol.* **183**, 527–42 (2008).

142. Fullmer, T. M. *et al.* Insulin suppresses ischemic preconditioning-mediated cardioprotection through Akt-dependent mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **64**, 20–9 (2013).
143. Held, W. & Mariuzza, R. a. Cis interactions of immunoreceptors with MHC and non-MHC ligands. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 269–78 (2008).
144. Ross, R. S. & Borg, T. K. Integrins and the Myocardium. *Circ Res* **88**, 1112–1119 (2001).
145. Sun, M. *et al.* Temporal response and localization of integrins beta1 and beta3 in the heart after myocardial infarction: regulation by cytokines. *Circulation* **107**, 1046–52 (2003).
146. Antelmi, E. *et al.* β 1 integrin binding phosphorylates ezrin at T567 to activate a lipid raft signalsome driving invadopodia activity and invasion. *PLoS One* **8**, e75113 (2013).
147. Apstein, C. S. & Opie, L. H. Glucose-insulin-potassium (GIK) for acute myocardial infarction: a negative study with a positive value. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **13**, 185–9 (1999).
148. Mehta, S. R. *et al.* Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial. *JAMA* **293**, 437–46 (2005).
149. Reichenspurner, H. *et al.* Comparison of UW versus HTK solution for myocardial protection in heart transplantation. *Transpl. Int.* **7 Suppl 1**, S481–4 (1994).
150. Jeevanandam, V. *et al.* University of Wisconsin solution versus crystalloid cardioplegia for human donor heart preservation. A randomized blinded prospective clinical trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **103**, 194–8; discussion 198–9 (1992).
151. Demertzis, S. *et al.* University of Wisconsin versus St. Thomas' Hospital solution for human donor heart preservation. *Ann. Thorac. Surg.* **55**, 1131–7 (1993).
152. Sakata, K. *et al.* University of Wisconsin solution versus modified collins solution for canine heart preservation: An experimental study. *Int. J. Angiol.* **6**, 176–179 (1997).
153. Chien, S. F., Diana, J. N., Oeltgen, P. R. & Salley, R. Functional studies of the heart during a 24-hour preservation using a new autoperfusion preparation. *J. Heart Lung Transplant.* **10**, 401–8 (1991).
154. Comoglio, P. M., Boccaccio, C. & Trusolino, L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 565–71 (2003).

12 FIGURAS ANEXAS

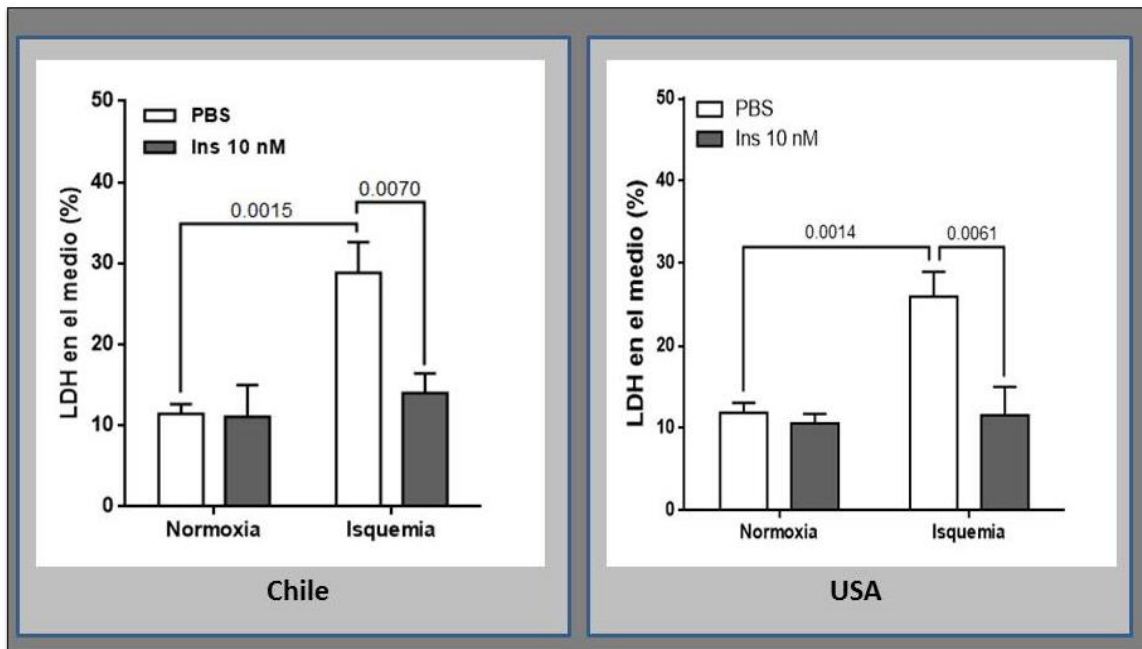


Figura A1. Comparación Isquemias y protección de insulina entre Chile y USA. Cardiomiocitos fueron sometidos a isquemia en presencia o ausencia de insulina 10 nM. Se determinó liberación de LDH luego de 8 horas de IS. Gráfico derecha, isquemia con N₂ 100% (Chile) N = 5 ANOVA de dos vías. Gráfico izquierda, isquemia con N₂ 95% + 5 CO₂ (USA). N = 3 ANOVA de dos vías. Valores expresados en promedios + SEM.

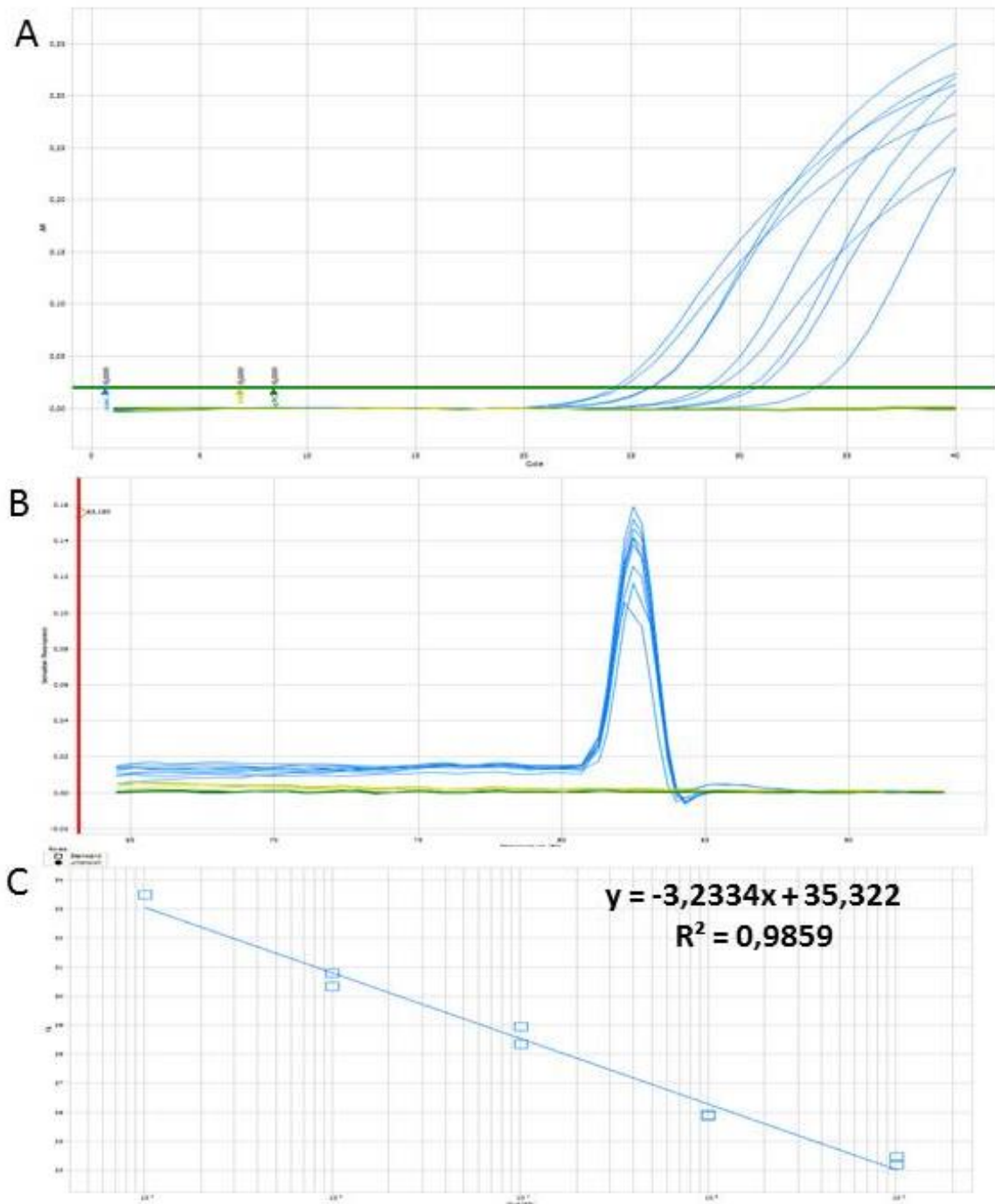


Figura A2. Estandarización primers para VCAM-1. RNA de cardiomiocitos sin tratamiento fue extraído y copiado a cDNA. Se realizaron diluciones seriadas del cDNA (5, 50, 500, 5000 y 50000 veces), líneas azules. Como controles se utilizaron RNA sin transcriptasa y reacción sin cDNA, líneas verde y amarilla respectivamente. **Panel A**, curva de amplificado, tamaño amplicón 180 pb (1484 a 1644, NM_012889.1). **Panel B**, segunda derivada de las curvas de disociación. **Panel C**, gráfico de linealidad y eficiencia de los primers para VCAM-1, se obtuvo una eficiencia de 103%.

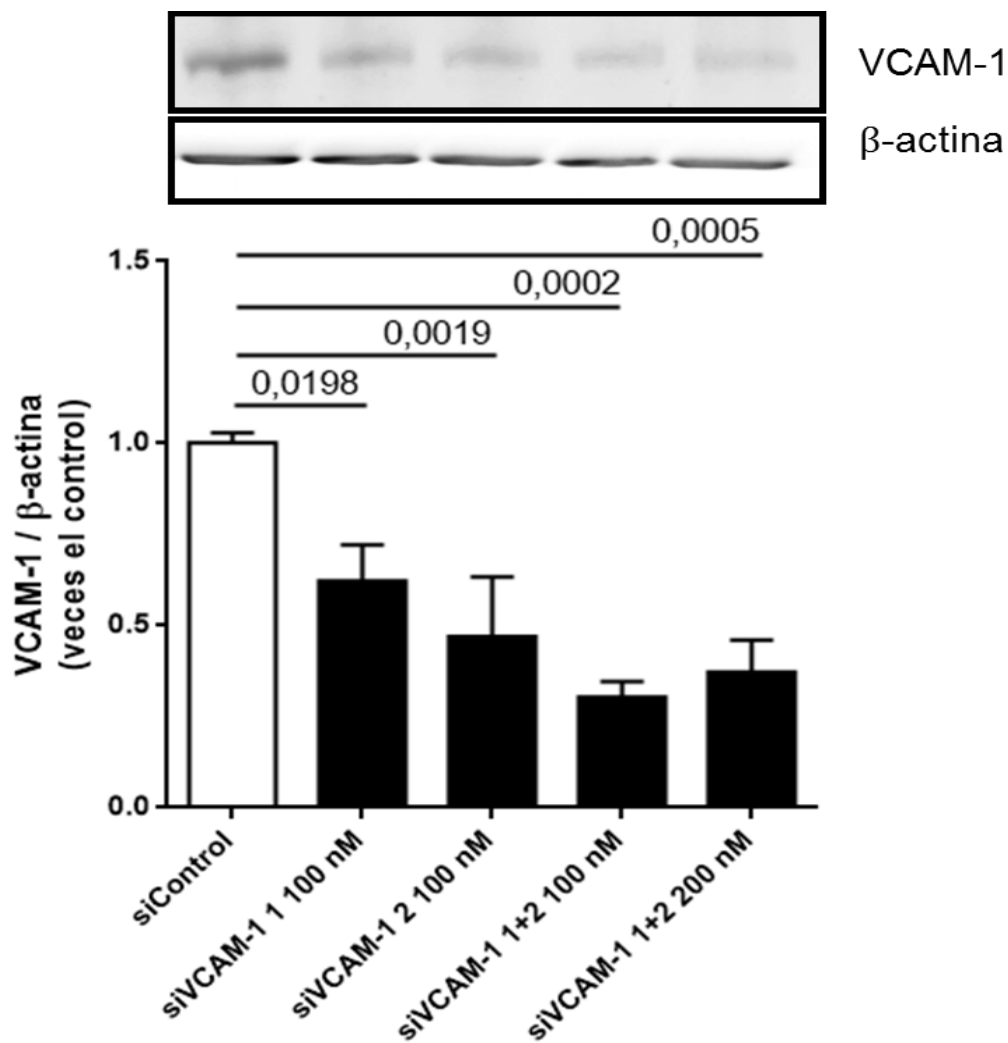


Figura A3. Estandarización siRNA VCAM-1. Cardiomiocitos fueron transfectados con siControl, con dos siVCAM-1 de manera independiente o mezclados a 100 y 200 nM por 48 horas. Finalmente, la inmunodetección fue realizada mediante el anticuerpo policlonal VCAM-1 C-19, dilución 1:200 (detección mediante Syngene G:BOX). Los valores obtenidos de las densitometrías se normalizaron con su respectiva transfección con siControl. Valores expresados en promedios más error estándar. n=3. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA one-way y un postest de Dunnett comparado con siControl. $p < 0.05$ fue considerado significativo.

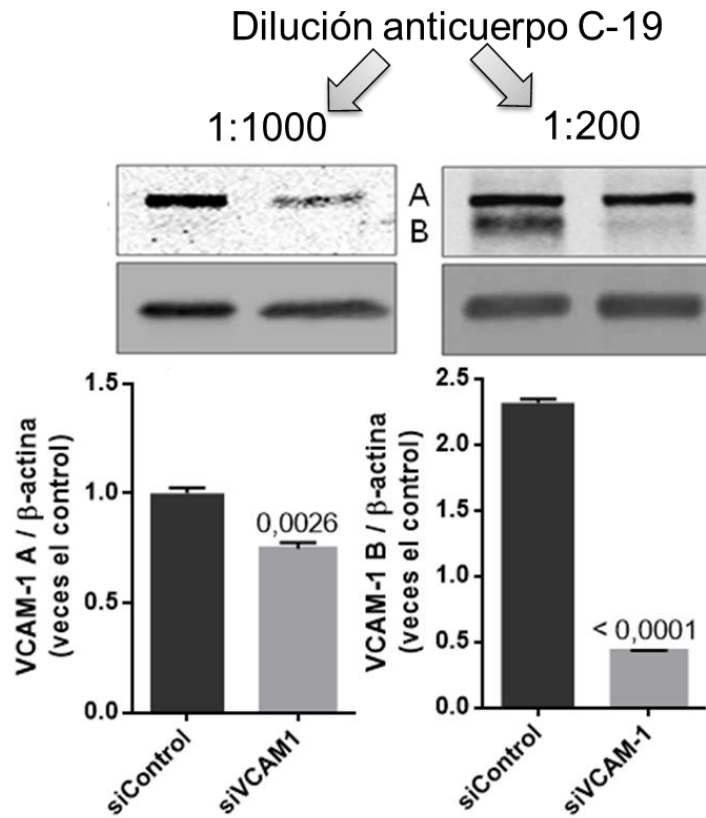


Figura A4. Isoformas de VCAM-1 en cardiomiocito. Las células fueron transfectadas con siControl o siVCAM-1, luego se determinaron niveles de VCAM-1. **Panel superior**, detección de VCAM-1 con anticuerpo policlonal conejo (VCAM-1 C-19), dilución 1:200 o 1:1000 (detección con infrarrojo mediante ODYSSEY CLx imager). A y B corresponde a diferentes estados de glicosilaciones de VCAM-1. **Panel inferior**, cuantificación de las bandas A y B. Tamaño muestral de 3 repeticiones independientes. Análisis estadístico t-student de dos colas. $p < 0.05$

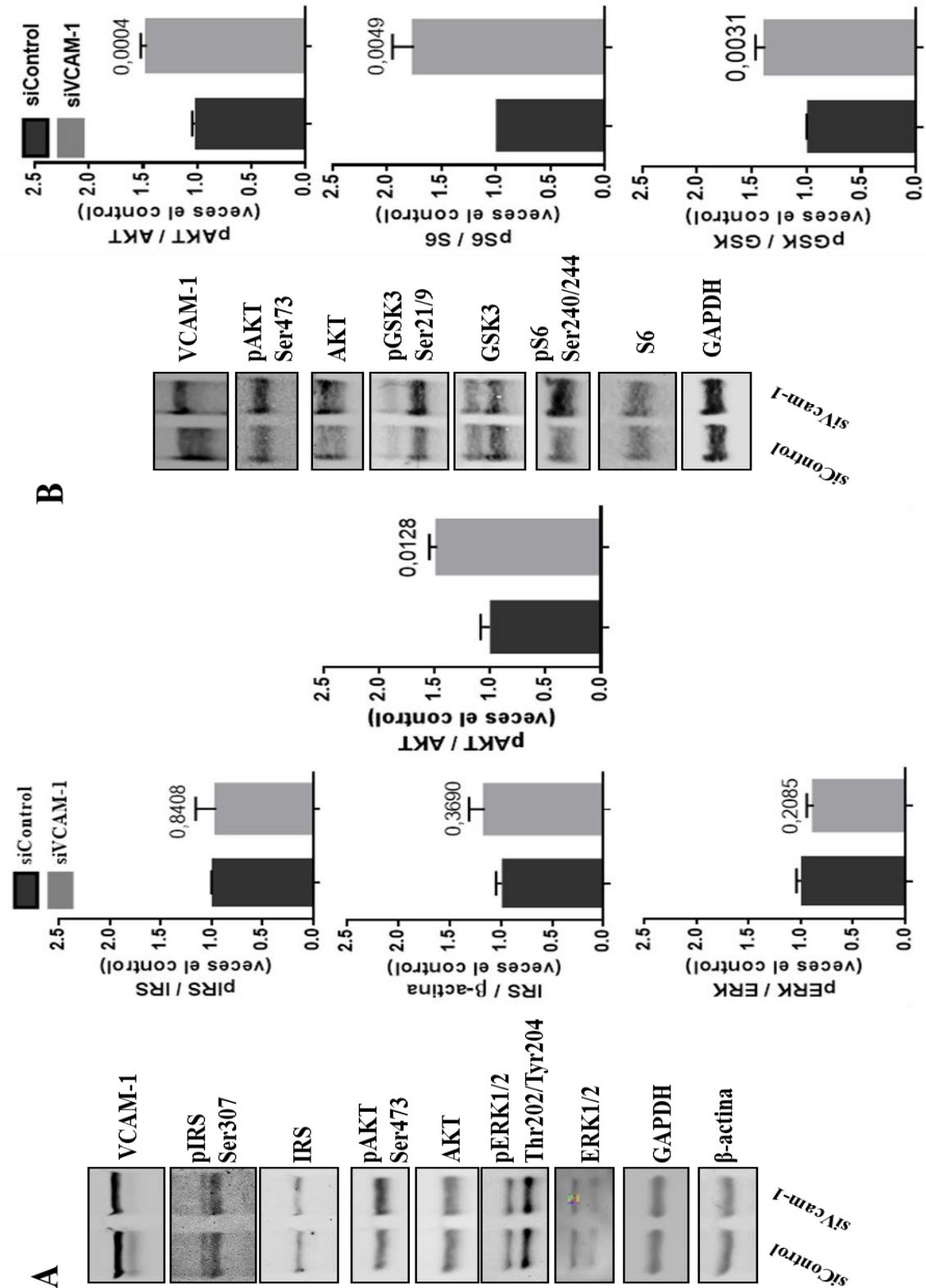


Figura A5. Efecto del silenciamiento de VCAM-1 en la activación de AKT.

Cardiomiocitos fueron transfectados con siControl o siVCAM-1, luego se determinaron niveles de VCAM-1, pS307 IRS-1, pSer473 AKT, pT202/pY204 ERK1/2, pS21/9 GSK3, pS240/244 S6. N = 3, t-student de dos colas. $p < 0.05$ fue considerado significativo.