

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## ROL DE $\text{NAD}^+$ EN EL METABOLISMO Y LA RESPUESTA ADAPTATIVA DEL CARDIOMIOCITO

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en  
Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular, y  
Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

**ALEJANDRA DEL PILAR OYARZÚN MEJÍA**

Directores de Tesis: Dr. Sergio Lavandero González  
Dr. Rodrigo Troncoso Cotal

Santiago, CHILE

2014

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

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER Y TÍTULO DE BIOQUÍMICO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata:

**ALEJANDRA DEL PILAR OYARZÚN MEJÍA**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de tesis rendido el día \_\_\_\_\_.

**Directores de Tesis:**

Dr. Sergio Lavandero González \_\_\_\_\_

Dr. Rodrigo Troncoso Cotal \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

Dra. M. Antonieta Valenzuela (Presidente) \_\_\_\_\_

Dra. Virginia Fernández \_\_\_\_\_

Dr. Mario Chiong \_\_\_\_\_

To that distant star of a blue glow,  
that collect our dreams and let them grow.

Esta tesis de Magíster se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, el cual pertenece al Centro de Estudios Moleculares de la Célula, en las Facultades de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Medicina de la Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- **Proyecto FONDAP ACCDiS 15130011** (Dres. S Lavandero y R Troncoso)
- **Proyecto Anillo ACT1111** (Dr. S Lavandero)
- **Proyecto FONDECYT 1120212** (Dr. S Lavandero)
- **Proyecto FONDECYT 11130285** (Dr. R Troncoso)

La presente tesis de Magíster y memoria de pregrado ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

**a) Presentaciones a congresos.**

**Oyarzun AP**, Troncoso R, Pennanen C, Lavandero S. Decrease in  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio produces mitochondrial dysfunction and prevents development of cardiomyocyte hypertrophy. XII PABMB Congress, XXXVI Anual meeting Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2013.

Rivera-Mejías P, Sotomayor-Flores C, Morales PE, Torres G, Del Campo A, Quiroga C, Garcia I, Pizarro M, López-Crisosto C, **Oyarzun AP**, Bravo-Sagua R, Paredes F, Gutierrez T, Parra V, Kuzmicic J, Pennanen C, Chiong M, Lavandero S. Dinámica mitocondrial en patologías cardiovasculares y metabólicas. XVI Aniversario del Instituto de Ciencias Biomédicas. Santiago, Chile. 2013.

**Oyarzun AP**, Parra V, Troncoso R, Lavandero S. The Nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor, FK866, disrupts mitochondrial dynamics and insulin signaling in cardiomyocytes. XX Reunión Anual International Society for Heart Research (ISHR), Santiago, Chile, 2012.

**Oyarzún AP**, Troncoso R, Rodríguez AE, Paredes F, Gatica D, Bravo R, Vasquez-Trincado C, Quiroga C, Criollo A, Lavandero S. Hyperosmotic stress triggers cytoprotective autophagy in HeLa cells. XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2012.

## **b) Publicaciones.**

**Oyarzún AP**, Pennanen C, Parra V, Westermeier F, Sotomayor C, Troncoso R, Lavandero S. The NAD<sup>+</sup> salvage pathway is essential for cardiomyocyte adaptive response. Manuscrito en preparación.

Troncoso R, Paredes F, Parra V, Gatica D, Vázquez-Trincado C, Quiroga C, Bravo-Sagua R, Lopez-Crisosto C, Rodriguez AE, **Oyarzún AP**, Kroemer G, Lavandero S. Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. Cell Cycle (en prensa. 2014).

Troncoso R, Díaz-Elizondo J, Espinoza S, Navarro-Marquez M, **Oyarzún AP**, Riquelme JA, Garcia-Carvajal I, Díaz-Araya G, García L, Hill JA, Lavandero S. Regulation of cardiac autophagy by insulin-like growth factor 1. IUBMB Life. 2013;65:593-601

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han sido parte del desarrollo de esta tesis:

En primer lugar, a mis directores de tesis, Dr. Sergio Lavandero, por acogerme en su laboratorio, entregarme su guía y apoyo durante este proceso. Y a Rodrigo Troncoso por su dedicación, enseñanzas e inagotable optimismo que fueron esenciales a lo largo de esta tesis y como aprendizaje personal.

A la comisión evaluadora por su orientación constructiva y cercana.

A cada uno de mis compañeros de laboratorio, por su alegría y cariño que hicieron de este trabajo una linda experiencia.

A mi familia por su amor incondicional y por apoyarme en todos mis proyectos.

A todos mis amigos por hacerme parte de sus vidas y llenarme de alegrías y momentos emocionantes. En especial a Daniela Figari por estar siempre conmigo, a una llamada de distancia.

Por último, a Santiago Sinclair por ser un gran compañero y cómplice.

## TABLA DE CONTENIDOS.

	Página
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	10
<b>ABREVIATURAS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1.1 Estructura y metabolismo cardiaco .....	15
1.2. NAD <sup>+</sup> y metabolismo energético .....	16
1.3. NAD <sup>+</sup> como modulador del metabolismo cardiaco.....	18
1.4. Síntesis de NAD <sup>+</sup> .....	18
1.5. Metabolismo en patologías cardiovasculares .....	20
1.5. NAD <sup>+</sup> en patologías cardiovasculares .....	22
1.6. NAD <sup>+</sup> y factores de riesgo cardiovascular .....	23
1.7. Dependencia energética de las respuestas adaptativas .....	24
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	26
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
4.1. Reactivos.....	27
4.2. Modelo experimental.....	28
4.3. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas.....	28
4.4. Tratamientos .....	29
4.5. Preparación de extractos celulares totales.....	29
4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas.....	30
4.7. Western blot .....	30
4.8. Microscopía de fluorescencia.....	31
4.9. Citometría de flujo.....	31
4.10. Medición de los niveles intracelulares de ATP mediante luminometría.....	32
4.11. Medición de la velocidad del consumo de oxígeno celular mediante oxigrafía de Clark.....	33
4.12. Medición de los niveles intracelulares de NAD <sup>+</sup> por espectrofotometría.....	34
4.13. Análisis estadístico.....	35

<b>5. RESULTADOS</b> .....	36
<b>5.1. Objetivo 1:</b> Determinar si FK866 reduce los niveles de NAD <sup>+</sup> en cultivos primarios de cardiomiocitos en forma dependiente de la concentración y tiempo de exposición.....	36
a). Efecto de FK866 sobre los niveles intracelulares de NAD <sup>+</sup> .....	36
b). Efecto de FK866 sobre la viabilidad de los cardiomiocitos.....	38
<b>5.2 Objetivo 2:</b> Evaluar si la disminución de NAD <sup>+</sup> reduce la tasa metabólica de cultivos primarios de cardiomiocitos.....	39
a). Efecto de la disminución de NAD <sup>+</sup> sobre el potencial de membrana mitocondrial.....	41
b). Efecto de la disminución de NAD <sup>+</sup> sobre la masa mitocondrial. ....	41
c). Efecto de la disminución de NAD <sup>+</sup> sobre los niveles de ROS. ....	43
d). Efecto de la disminución de NAD <sup>+</sup> sobre el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP. ....	44
<b>5.3 Objetivo 3:</b> Determinar si la disminución de NAD <sup>+</sup> reduce la respuesta adaptativa a estímulos estresores como NE, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , e insulina en cardiomiocitos.....	46
a). Efecto de la disminución de NAD <sup>+</sup> sobre la vía de señalización de insulina. ....	46
b). Efecto de la disminución de NAD <sup>+</sup> en la respuesta de sobrevida a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	47
c). Efecto de la disminución de NAD <sup>+</sup> en la respuesta hipertrófica a NE. ....	50
<b>5.4 Objetivo 4:</b> Evaluar si existe una relación de causalidad entre la disminución de los niveles de NAD <sup>+</sup> inducida por FK866, y la disminución en el metabolismo y la respuesta adaptativa en cardiomiocitos.....	52
a). Recuperación de los niveles de NAD <sup>+</sup> en cardiomiocitos tratados con FK866, y su efecto en el metabolismo del cardiomiocito. ....	52
b). Recuperación de los niveles de NAD <sup>+</sup> en cardiomiocitos tratados con FK866, y su efecto en la respuesta de supervivencia a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	54
c). Recuperación de los niveles de NAD <sup>+</sup> en cardiomiocitos tratados con FK866, y su efecto en la respuesta hipertrófica a NE. ....	55
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	58
6.1. FK866 .....	59
6.2. NAD <sup>+</sup> y metabolismo mitocondrial.....	61
6.3. NAD <sup>+</sup> y la respuesta adaptativa del cardiomiocito.....	62
6.4. NAD <sup>+</sup> y vía de señalización de insulina.....	63
6.5. NAD <sup>+</sup> y respuesta de sobrevida al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	64
6.6. NAD <sup>+</sup> y respuesta hipertrófica a NE. ....	67
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	69
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
<b>FIGURA 1.</b> Síntesis de NAD <sup>+</sup> a partir de nicotinamida.....	19
<b>FIGURA 2.</b> Compartimentalización de la síntesis, transporte y catabolismo de NAD <sup>+</sup> y sus intermediarios.....	21
<b>FIGURA 3.</b> FK866 disminuye los niveles de NAD <sup>+</sup> en cardiomiocitos, sin afectar su viabilidad.....	37
<b>FIGURA 4.</b> Funcionamiento de la Cadena Transportadora de Electrones mitocondrial ...	40
<b>FIGURA 5.</b> Disminución de NAD <sup>+</sup> reduce los niveles de EROS en cardiomiocitos, sin afectar su potencial o masa mitocondrial. ....	42
<b>FIGURA 6.</b> Disminución de NAD <sup>+</sup> reduce la función mitocondrial en cardiomiocitos. ....	45
<b>FIGURA 7.</b> Disminución de NAD <sup>+</sup> reduce la señalización de la vía clásica de Insulina en cardiomiocitos. ....	48
<b>FIGURA 8.</b> Disminución en los niveles de NAD <sup>+</sup> sensibiliza los cardiomiocitos a la muerte por peróxido. ....	48
<b>FIGURA 9.</b> Disminución en los niveles de NAD <sup>+</sup> impide el desarrollo de la respuesta hipertrófica a NE en cardiomiocitos. ....	51
<b>FIGURA 10.</b> NMN restablece los niveles de NAD <sup>+</sup> y la función mitocondrial de cardiomiocitos tratados con FK866. ....	53
<b>FIGURA 11.</b> Rescate de los niveles de NAD <sup>+</sup> recupera la supervivencia a peróxido de cardiomiocitos tratados con FK866. ....	55
<b>FIGURA 12.</b> Restitución de los niveles de NAD <sup>+</sup> no recuperan la respuesta hipertrófica a NE en cardiomiocitos tratados con FK866. ....	57
<b>FIGURA 13.</b> Estructura de FK866 y Nicotinamida.....	59
<b>FIGURA 14.</b> Modelo propuesto.....	70

## ABREVIATURAS.

Akt	Proteína quinasa Akt
ANGII	Angiotensina II
ANOVA	Análisis de varianzas (Analysis Of Variances)
Apaf-1	Factor activador de proteasa apoptótica-1
ASB	Albúmina de suero bovino
cADRP	Adenosina difosfato ribosa cíclica
CCCP	Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
CD38	Cluster de diferenciación 38
CoA	Coenzima A
CX43	Conexina 43
DHR	Dihidrorodamina
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DME	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
eNampt	Nicotinamida fosforribosil transferasa extracelular
ERRs	Receptores relacionados a la familia de receptores de estrógeno
FAT10	Transcripto 10 asociado al antígeno F de leucocitos humanos (human leukocyte antigen F-associated transcript 10)
FOXO	Sub familia O de la familia de factores transcripcionales FOX (Forkhead box)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GSK-3 $\beta$	Glicógeno sintasa quinasa 3 beta
HDACs	Histona Desacetilasas
IAPs	Familia de proteínas inhibidoras de apoptosis
IgG	Inmunoglobulina G
IP3	Inositol trifosfato
IR	Receptor de insulina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MM	Medio de mantención (DME:M199 (4:1) )
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
mPTP	Poro de transición de permeabilidad
MTG	Mitotracker green FM
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium

NAADP	Ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato
Nampt	Nicotinamida fosforribosil transferasa
NE	Norepinefrina
NFAT3	Factor nuclear de células T activadas 3
NMN	Nicotinamida mononucleótido
NMNAT	NMN adeniltransferasa
p-Akt	Proteína quinasa Akt fosforilada en serina473
p-IR	Receptor de insulina fosforilado en tirosina1150/1151
PARP-1	Poli-ADP-ribosa polimerasa 1
PBS	Amortiguador fosfato salino (Phosphate buffered saline)
PDK1	Proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositol Coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (Peroxisome proliferator- activated receptor gamma coactivator 1-alpha )
PGC1 $\alpha$	
PI	Yoduro de propidio
PIP3	Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato
PPAR	Receptores activados por proliferador de peroxisoma (peroxisome proliferator-activated receptors)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (polyvinylidene difluoride)
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media (Standard Error of the Mean)
SFB	Suero fetal bovino
SFT	Suero fetal de ternera
SIRT-KO	Organismo con el gen para SIRT inactivado (knock out)
SUMO	Modificador pequeño similar a la ubiquitina (Small ubiquitin-like modifier)
TAC	Constricción aórtica transversa
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante beta-1
TMRM	Tetrametil rodamina metil éster
TSA	Tris(hidroximetil)aminometano salino amortiguado
XIAPs	Subfamilia X de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis

## RESUMEN.

El dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $\text{NAD}^+$ ) es una coenzima con múltiples funciones. Participa en el metabolismo redox como molécula transportadora de electrones en procesos metabólicos, actúa como indicador del estado energético celular, y es también sustrato de numerosas enzimas implicadas en la desacetilación de reguladores transcripcionales y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, entre otros. Diversas investigaciones sugieren que la disminución de los niveles de  $\text{NAD}^+$  es un factor importante en la progresión de enfermedades cardiovasculares. En diferentes modelos de miocardiopatías se ha observado una disminución en la expresión de la enzima marcapaso de la síntesis de  $\text{NAD}^+$ , Nampt. También se ha descrito que los niveles de  $\text{NAD}^+$  están disminuidos en condiciones de riesgo cardiovascular como son el envejecimiento, dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2.

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de la disminución de  $\text{NAD}^+$  en el metabolismo y la capacidad adaptativa de los cardiomiocitos. Se utilizó el inhibidor de Nampt, FK866, para disminuir los niveles de  $\text{NAD}^+$  en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas. Se evaluó la viabilidad, el metabolismo mitocondrial y la respuesta adaptativa del cardiomiocito a estímulos de insulina, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y norepinefrina (NE).

Los resultados mostraron que la disminución de  $\text{NAD}^+$  por FK866 redujo el metabolismo mitocondrial sin afectar la viabilidad de los cardiomiocitos. Además, disminuyó la fosforilación de Akt en respuesta a insulina, la sobrevivencia frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y previno el aumento del área celular y sarcomerización en respuesta a NE. Para evaluar la relación de causalidad entre la disminución de  $\text{NAD}^+$  y estos efectos, se rescataron los niveles de  $\text{NAD}^+$  mediante la administración de nicotinamida mononucleótido (NMN). Se observó la recuperación de los parámetros metabólicos y la sobrevivencia a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero no se restableció la respuesta hipertrófica.

En conclusión, este trabajo muestra que  $\text{NAD}^+$  es esencial para el metabolismo mitocondrial del cardiomiocito, y sugiere su participación en la vía de señalización de insulina y en la respuesta adaptativa a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y NE.

## **ABSTRACT.**

The nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) is a coenzyme with multiple functions. In redox metabolism participates as an electron carrier in metabolic processes, is a cellular energetic status indicator and it is also substrate of many enzymes involved in transcription factor deacetylation and Ca<sup>2+</sup> mobilization, among others. Several reports suggest that NAD<sup>+</sup> levels are an important factor in cardiovascular diseases progression. In different cardiomyopathy models the expression of the NAD<sup>+</sup> synthesis rate-limiting enzyme, Nampt is diminished. Also NAD<sup>+</sup> levels are decreased in cardiovascular risk conditions such as aging, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus.

The aim of this work was to determine the effects of NAD<sup>+</sup> decrease on cardiomyocytes' metabolism and adaptive capability. The Nampt inhibitor, FK866, was used to reduce NAD<sup>+</sup> levels in primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes, and viability, mitochondrial metabolism, and cardiomyocytes adaptive response to insulin, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and norepinephrine (NE) stimuli were assessed.

The results showed that the NAD<sup>+</sup> reduction induced by FK866 decreased mitochondrial metabolism without affecting cardiomyocytes viability. Insulin-stimulated Akt phosphorylation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-survival were also diminished and cellular area increase and sarcomerization induced by NE was prevented. The causality between NAD<sup>+</sup> decrease and those effects was assessed through NAD<sup>+</sup> levels recovery by nicotinamide mononucleotide (NMN) administration. Both metabolism and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-survival were reestablished, but not the hypertrophic response.

In conclusion this work reveals that NAD<sup>+</sup> is essential for cardiomyocyte mitochondrial metabolism, and suggest its participation on insulin signaling pathway and adaptive responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NE.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 Estructura y metabolismo cardiaco.

El corazón es el órgano encargado de bombear la sangre a través del sistema circulatorio, con el fin de distribuir los nutrientes y el oxígeno, y además eliminar los productos de desecho del organismo. Está formado principalmente por dos tipos celulares; los fibroblastos, que modelan la matriz extracelular cardiaca y equivalen al 66% de las células totales (Weber et al. 1993), y los cardiomiocitos, que le otorgan la función contráctil a este órgano y que a pesar de corresponder al 33% del número total de células ocupan el 75% del espacio estructural del corazón, debido a su mayor tamaño (Van Wamel et al. 2001; Vliegen 1991).

Los cardiomiocitos son células altamente especializadas que cesan de dividirse inmediatamente después del nacimiento mientras que los fibroblastos proliferan en respuesta a estímulos tróficos, mecánicos y de estrés tisular (Manabe et al. 2002).

Debido a su permanente función contráctil (cerca de 100.000 contracciones/día), el corazón tiene un alto requerimiento energético equivalente a 6 Kg ATP/día, con un recambio completo del pool de ATP cada 10 segundos (Neely et al. 1974). Con el fin de suplir esta alta demanda energética, los cardiomiocitos utilizan una amplia variedad de sustratos metabólicos. Así, en el corazón adulto humano, la producción del ATP proviene tanto de ácidos grasos libres (en un 70%), como de glucosa y carbohidratos (30%) (Saks et al. 2006). Los metabolitos generados en la  $\beta$ -oxidación y en la glicólisis son incorporados al ciclo de Krebs, generando NADH y FADH<sub>2</sub>. Estas moléculas reductoras son posteriormente oxidadas en la mitocondria por la cadena transportadora de electrones (CTE), generando el 95% del ATP total mediante esta vía, mientras que el 5% remanente deriva de la glicólisis y del GTP formado en el ciclo de Krebs (Wallimann et al. 1992). Entre el 60 y el 70% del ATP es utilizado para sustentar la contracción y entre el 30-40% restante para el funcionamiento de bombas iónicas, especialmente la Ca<sup>2+</sup> ATPasa en el retículo sarcoplásmico (Doenst et al. 2013).

El pool de energía del cardiomiocito está constituido por ATP (aproximadamente 5  $\mu\text{mol/g}$ ) y fosfocreatina (aproximadamente 8  $\mu\text{mol/g}$ ), la cual funciona como un sistema de transporte y amortiguador de ATP, característico de tejidos con alta demanda energética. En la mitocondria la creatina quinasa cataliza la transferencia del enlace de alta energía del fosfato del ATP a la creatina para formar fosfocreatina y ADP. La fosfocreatina, una molécula más pequeña que el ATP, difunde rápidamente al citosol donde puede ser utilizada para generar ATP a partir de ADP por la creatina quinasa citosólica (Bittl et al. 1987). Esta reacción puede generar ATP diez veces más rápido en comparación con la fosforilación oxidativa (Nagoshi et al. 2011). Cuando la demanda energética supera el suministro, los niveles de fosfocreatina bajan, manteniendo el nivel normal de ATP pero a costa de un aumento del nivel de ADP y consecuentemente de AMP (Hardie et al. 2001). Éstos actúan como efectores alostéricos de enzimas que participan en vías que consumen ATP, afectando el funcionamiento contráctil del corazón (Brown 1992). Así, puede ocurrir un trastorno metabólico cuando el nivel de fosfocreatina baja y los niveles de ADP y AMP libres aumentan, incluso en el caso de que los niveles de ATP se mantengan sin cambio (Neubauer 2007).

Según lo expuesto anteriormente el metabolismo cardiaco es altamente eficaz en la producción y mantenimiento del suministro energético, donde las mitocondrias juegan un papel protagónico como punto de convergencia de todas las fuentes de energía y como generadoras de ATP y fosfocreatina, moléculas clave en la funcionamiento cardiaco.

## **1.2. NAD<sup>+</sup> y metabolismo energético.**

Con la CTE y la ATP sintasa ubicadas en su membrana interior, y las enzimas del ciclo de Krebs y de la oxidación de ácidos grasos en su matriz, la mitocondria es el organelo fundamental para el funcionamiento del metabolismo energético celular. La mitocondria también regula el catabolismo de aminoácidos, la formación de cuerpos cetónicos, la biosíntesis del grupo hemo, el ciclo de la urea y el almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  (Stein et al. 2012).

Tanto la producción de ATP mitocondrial como la mantención de su potencial de membrana requieren del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) (Pittelli et al. 2011).  $\text{NAD}^+$  es una coenzima conocida por su participación en el metabolismo redox como molécula transportadora de electrones en procesos como glicólisis,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. Dentro de la mitocondria,  $\text{NAD}^+$  obtiene dos electrones y un protón de diferentes sustratos en etapas del ciclo de Krebs y de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, siendo reducido a NADH. Posteriormente el NADH es oxidado luego de donar sus electrones al complejo I de la CTE. Estos electrones son secuencialmente transmitidos a la ubiquinona, el complejo III, citocromo c y complejo IV resultando en la reducción del oxígeno a agua. El flujo de electrones está acoplado al bombeo de protones por los complejos I, III y IV, a través de la membrana interna hacia el espacio intermembrana, generando una gradiente de protones, los cuales pueden reentrar a la matriz a través de la ATP sintasa, generando la síntesis de ATP (Wallace 2009).

$\text{NAD}^+$  actúa como señal del estado energético celular, sus niveles aumentan en respuesta a ejercicio (Costford et al. 2010), ayuno (Cantó et al. 2009) y restricción calórica (Chen et al. 2008), convirtiéndola en una molécula clave para la modulación del metabolismo ante estos estímulos.

Además de ser un co-factor fundamental para la producción de energía,  $\text{NAD}^+$  también es sustrato de numerosas enzimas que utilizan  $\text{NAD}^+$  como fuente de ADP-ribosa, como son la poli ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) e histona desacetilasas (HDACs) clase III. Entre las últimas se encuentran las proteínas sirtuinas, quienes actúan como sensores intracelulares de  $\text{NAD}^+$ , adaptando el metabolismo mediante la desacetilación de reguladores transcripcionales como PPAR $\gamma$  y FOXO, y también mediante la regulación directa de enzimas por desacetilación, como es el caso de la acetil-CoA sintetasa citoplasmática (Cantó et al. 2012a).

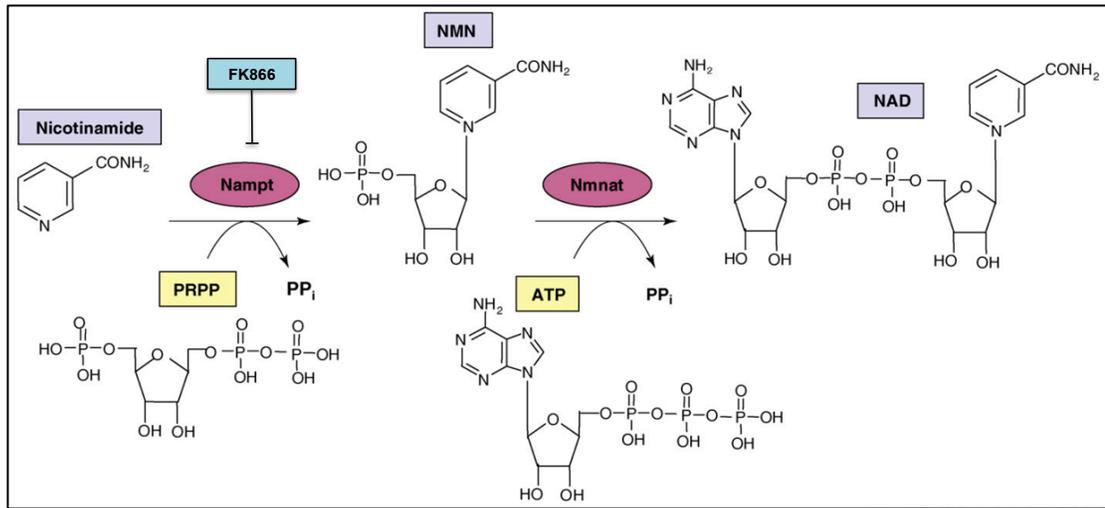
Finalmente,  $\text{NAD}^+$  es sustrato de CD38 para la generación de segundos mensajeros como ADP-ribosa cíclica (cADPR) (Lee et al. 1989) y ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP) (Calcraft et al. 2009) que regulan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Chini 2009).

### 1.3. NAD<sup>+</sup> como modulador del metabolismo cardiaco.

Considerando que NAD<sup>+</sup> es sustrato de varias enzimas, entre las cuales se encuentra la familia de las sirtuinas, la disponibilidad de NAD<sup>+</sup> afecta indirectamente la sobrevivencia, resistencia al estrés y la regulación del metabolismo en el cardiomiocito (C. Hsu et al. 2009). Las sirtuinas tienen la particularidad de que su Km para NAD<sup>+</sup> es alta, por lo que funcionan como sensores de los niveles de NAD<sup>+</sup> ya que es un sustrato limitante para su funcionamiento (Cantó et al. 2012a). De las 7 sirtuinas descritas en mamíferos, SIRT 1 y 3 son las más conservadas. SIRT1, localizada en el núcleo y citoplasma, se une a FOXO y PGC1 $\alpha$  (Haigis et al. 2010), siendo el último un potente inductor de la actividad transcripcional de PPARs y receptores relacionados a la familia de receptores de estrógeno (ERRs), los cuales en conjunto regulan el metabolismo cardiaco a largo plazo (Doenst et al. 2013). SIRT3, localizada en la mitocondria, interactúa con el complejo 1 de la cadena de electrones y con la acetil-CoA sintetasa 2, afectando la termogénesis, producción de ATP y utilización de carbonos de fuentes alternativas en condiciones de baja energía. Su expresión es mayor en tejidos metabólicamente activos como son el músculo esquelético, corazón y cerebro (Sato et al. 2011).

### 1.4. Síntesis de NAD<sup>+</sup>.

NAD<sup>+</sup> puede ser sintetizado *de novo* a partir de triptófano, o mediante la vía de rescate a partir de los metabolitos nicotinamida, nicotinamida ribósido y ácido nicotínico (Rongvaux et al. 2003). La utilización de estas diferentes vías es tejido-específica ya que está determinada por la expresión de las enzimas marcapaso en los diferentes tejidos. Mientras la síntesis de NAD<sup>+</sup> a partir de triptófano ocurre en el pulmón, placenta y en células del sistema inmune en respuesta a estímulos inflamatorios (Yamazaki et al. 1985), la vía de rescate actúa en la mayoría de los tejidos, siendo la principal fuente de NAD<sup>+</sup> celular (Houtkooper et al. 2010). En mamíferos, ésta ocurre principalmente a partir de nicotinamida (Collins et al. 1972), la cual es convertida a nicotinamida mononucleótido (NMN) por la nicotinamida fosforribosiltransferasa (Nampt), y luego a NAD<sup>+</sup> por la NMN adeniltransferasa (NMNAT) (**Figura 1**) (Olesen et al. 2010).



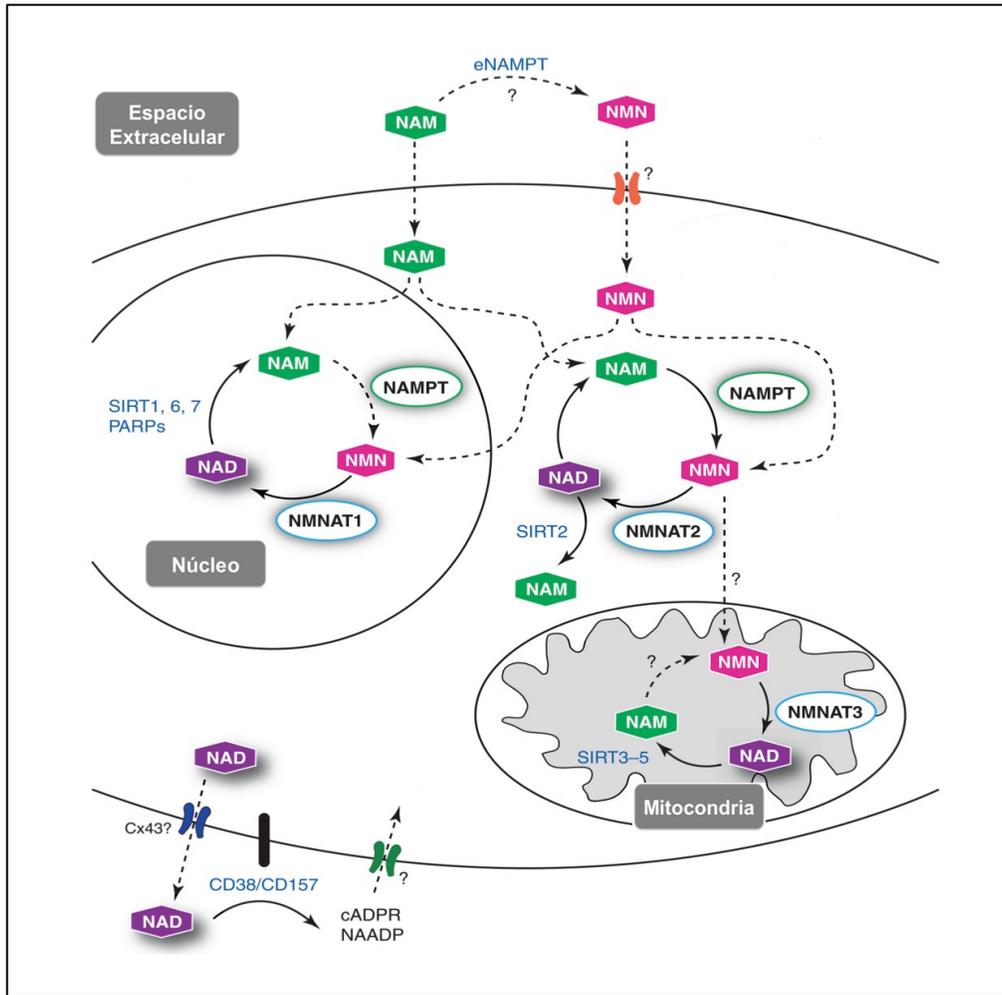
**Figura 1. Síntesis de NAD<sup>+</sup> a partir de nicotinamida.** En mamíferos, el paso limitante en la producción de NAD<sup>+</sup> es la transferencia del residuo fosforribosil desde el fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a la nicotinamida, reacción que es catalizada por la nicotinamida fosforribosiltransferasa (Nampt), para producir nicotinamida mononucleótido (NMN) que luego es convertida a NAD<sup>+</sup> por la nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa (Nmnat) utilizando ATP. FK866 es un inhibidor de la producción de NAD<sup>+</sup> que actúa sobre la Nampt, ya que compete con la nicotinamida por el sitio activo (adaptado de Garten et al. 2009).

Nampt es la enzima marcapaso de la vía de rescate de NAD<sup>+</sup> (Revollo et al. 2004), su relevancia es tal que ratones heterocigotos para Nampt muestran una disminución significativa en los niveles de NAD<sup>+</sup>, y los doble knock-out son inviables (Garten et al. 2009). Estudios en rata han mostrado que Nampt es una enzima de distribución ubicua en los tejidos, con una mayor expresión en hígado y corazón, y su ubicación celular es principalmente en el citoplasma y en menor concentración en el núcleo (Kitani et al. 2003). Además, se ha reportado la existencia de Nampt en plasma humano y de ratón (eNampt), y que éste es secretado por adipocitos (Revollo et al. 2007).

Por otra parte, a NMNAT se le han atribuido las diferencias en las concentraciones de  $\text{NAD}^+$  en compartimentos celulares, determinadas por la existencia de 3 isoenzimas que se expresan de forma específica en el núcleo, aparato de Golgi y mitocondria (Berger et al. 2005), ya que  $\text{NAD}^+$  no es capaz de traspasar las membranas mitocondriales (Ying 2008). Se ha postulado que  $\text{NAD}^+$  también es capaz de entrar a la célula desde el medio extracelular mediante el hemicanal conexina-43 (Bruzzone et al. 2001), así como también se ha comprobado que NMN y nicotinamida ribósido son capaces de entrar a la célula y aumentar la biosíntesis de  $\text{NAD}^+$ . Sin embargo aún no se han elucidado los transportadores para estas moléculas (**Figura 2**) (Cantó et al. 2012a).

### **1.5. Metabolismo en patologías cardiovasculares.**

La insuficiencia cardiaca (IC) está definida como la incapacidad del corazón para bombear sangre adecuadamente en respuesta a la demanda sistémica. La IC es inducida por diversos estímulos patológicos entre los cuales se encuentran: hipertensión arterial, infarto al miocardio o isquemia, insuficiencia valvular, estenosis, miocarditis, cardiomiopatía familiar hipertrófica y cardiomiopatía dilatada (Lips 2003). La mayoría de estos estímulos primero inducen hipertrofia cardiaca. Ésta es una respuesta adaptativa en que los cardiomiocitos aumentan su tamaño, aumentando la fracción de eyección y disminuyendo la tensión de la pared ventricular (Berenji et al. 2005). Sin embargo, a largo plazo produce un deterioro contráctil, lo que predispone a insuficiencia cardiaca, arritmia y muerte súbita (Haider et al. 1998).



**Figura 2. Compartimentalización de la síntesis, transporte y catabolismo de NAD<sup>+</sup> y sus intermediarios.** En el espacio extracelular, y principalmente en el citoplasma, la nicotinamida fosforribosiltransferasa transforma nicotinamida (NAM) en nicotinamida mononucleótido (NMN), un intermediario clave en la síntesis de NAD<sup>+</sup> que es capaz de entrar al núcleo y mitocondria para luego ser convertido a NAD<sup>+</sup> por una de las NMN adenilil transferasas (NMNAT 1-3). El NAD<sup>+</sup> celular es consumido principalmente por Sirtuinas y poli-ADP-ribosa polimerasas (PARPs) y también puede ser transportado fuera de la célula por el hemi-canal conexina 43 donde es utilizado por ectoenzimas como CD38 para producir segundos mensajeros como ADP-ribosa cíclica y ácido nicotínico adenosin dinucleótido fosfato (NAADP) que reingresan a la célula y movilizan Ca<sup>2+</sup> (adaptado de Stein et al. 2012).

La insuficiencia cardiaca se caracteriza por presentar una disminución en la producción de energía, atribuida a una deficiencia en el uso de sustratos y a la biogénesis y función mitocondrial (Doenst et al. 2013). La idea de que el corazón insuficiente es equivalente a un motor sin combustible fue acuñada por Hermann y Decherd en 1939, cuando describieron una caída en el nivel de creatina en miocardios insuficientes (Neubauer 2007). Desde entonces numerosos estudios han descrito importantes cambios en el metabolismo de ácidos grasos, de glucosa y en general del estado energético de los cardiomiocitos en el corazón insuficiente (Akki et al. 2008; Bugger et al. 2010; Christe et al. 1994; Dodd et al. 2012; Kato et al. 2010; Zhabyeyev et al. 2013; Doenst et al. 2013). En estas publicaciones se muestra que modelos de insuficiencia cardiaca como constricción aórtica en ratas y ratones, ratas Dahl sensibles a la sal y ratas con infarto al miocardio tienen como denominador común alteraciones mitocondriales como: disminución de proteínas de la CTE, disminución en la respiración y producción de ATP, menor expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial y disminución en la oxidación de ácidos grasos.

### **1.5. NAD<sup>+</sup> en patologías cardiovasculares.**

La importancia de NAD<sup>+</sup> en patologías cardiovasculares se refleja en el cambio de expresión de la enzima marcapaso de su síntesis, Nampt, en diferentes modelos de miocardiopatías, y en los efectos restaurativos de su sobreexpresión y de la adición directa de NAD<sup>+</sup>.

Se ha reportado una disminución de más del 50% de los niveles proteicos de Nampt en respuesta a estrés por isquemia, isquemia-reperfusión y constricción aórtica transversa (TAC) (Hsu et al. 2009b). Nampt también está disminuida en corazones estimulados con agonistas hipertróficos (Di-Lisa et al. 2001), dejando en evidencia una relación entre estos estímulos patológicos y la síntesis de NAD<sup>+</sup>. Por el contrario, los niveles de NAD<sup>+</sup> no se ven alterados en la hipertrofia fisiológica inducida por ejercicio (Pillai et al. 2010).

Por otra parte ratones que sobreexpresan Nampt de forma específica en el corazón sufren menor daño cardíaco por isquemia-reperfusión (Hsu et al. 2010a). Además, la adición exógena de NAD<sup>+</sup> disminuye la hipertrofia cardíaca inducida por angiotensina II y fenilefrina (Pillai et al. 2010). Estos efectos protectores parecen ser mediados principalmente por SIRT1, que ha mostrado ser indispensable para el pre-condicionamiento isquémico (Nadtochiy et al. 2011) mediante la regulación de genes cardioprotectores (Yamamoto et al. 2011).

### **1.6. NAD<sup>+</sup> y factores de riesgo cardiovascular.**

NAD<sup>+</sup> también ha mostrado ser relevante en procesos que se relacionan con el desarrollo de cardiomiopatías, como envejecimiento, dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Numerosos estudios sugieren que los beneficios de anti-envejecimiento y extensión del periodo de vida otorgados por la restricción calórica y el ejercicio ocurrirían mediante el aumento en la expresión de Nampt (Yang et al. 2007; Nakagawa et al. 2009; Rodgers et al. 2005; Hayashida et al. 2010) y la actividad de sirtuinas (Haigis et al. 2010; Mitchell et al. 2014). Concordantemente, se ha descrito que tanto Nampt como NAD<sup>+</sup> se encuentran disminuidas en músculo esquelético de ratas envejecidas y que sus niveles se recuperan con ejercicio (Koltai et al. 2010).

Por otra parte, tanto la disminución de Nampt como la inhibición de SIRT1 impiden la autofagia en cardiomiocitos sin sumar sus efectos, sugiriendo que actúan por la misma vía (Hsu et al. 2009a). Además, la sobreexpresión de SIRT1 produce un efecto protector frente al estrés oxidativo y retarda el envejecimiento de los cardiomiocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Alcendor et al. 2004; 2007).

Respecto a los trastornos metabólicos existen evidencias que la producción de NAD<sup>+</sup> se encuentra considerablemente disminuida en hígado y tejido adiposo de ratones con DM2 inducida por dieta alta en grasas (Stein et al. 2012). Además, la restitución de los niveles de NAD<sup>+</sup> mediante la administración de NMN, reduce la intolerancia a la glucosa y mejora la sensibilidad a insulina en ratones con DM2 inducida tanto por dieta alta en

grasas como por envejecimiento (Yoshino et al. 2011). En la misma línea, la suplementación de la dieta con nicotinamida ribósido, aumenta el metabolismo oxidativo en ratones, protegiéndolos de problemas metabólicos inducidos por dieta alta en grasas como insulino-resistencia y dislipidemia (Cantó et al. 2012a). Estos antecedentes en conjunto sugieren que  $\text{NAD}^+$  tendría un efecto cardioprotector y que su disminución podría estar asociada al desarrollo de patologías cardíacas.

### **1.7. Dependencia energética de las respuestas adaptativas.**

El corazón es un órgano altamente plástico, capaz de modificar su estructura en respuesta a cambios en la demanda, tanto por estímulos fisiológicos como patológicos. Cuando la carga de trabajo aumenta, el corazón compensa hipertrofiándose para incrementar el gasto cardíaco (Zhu et al. 2009). Si la hipertrofia es causada por ejercicio o embarazo, la estructura y función cardíaca siguen normales (Dorn et al. 2003; Lorell et al. 2000). Sin embargo, cuando la hipertrofia se genera producto de estímulos prolongados debido a condiciones patológicas como hipertensión, obesidad, infarto o enfermedad cardíaca valvular, se producen anomalías como desorganización de los sarcómeros, alteraciones en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , pérdida de cardiomiocitos y la transición hacia un metabolismo más glicolítico, entre otros (Hill et al. 2008; Zhu et al. 2009), provocando finalmente la falla cardíaca.

El crecimiento hipertrófico del corazón, sea fisiológico o patológico, ocurre por una extensión del tamaño celular, e implica un aumento de la síntesis de proteínas y la construcción y organización de nuevos sarcómeros, que son las unidades contráctiles del cardiomiocito (Chien 1999; Frey et al. 2004; Hill 2011). Los procesos anabólicos y en especial la síntesis de proteínas tienen una alta demanda de energía, lo cual se ve reflejado en la dependencia de nucleótidos trifosfato en la mayoría de sus etapas, desde el reciclaje de nucleótidos para la síntesis del mRNA y la carga del aminoacil-tARN, hasta la activación de factores traduccionales y la adición de un nuevo aminoácido a la cadena, además de chaperonas y otras enzimas que participan en el proceso (Jewett et al. 2009).

Además de la hipertrofia cardíaca, otros procesos que forman parte de la respuesta adaptativa como la autofagia (Cao et al. 2009), la respuesta a proteínas mal plegadas (Bravo et al. 2013), la respuesta de choque térmico (Knowlton 1995) y otros mecanismos de supervivencia también son altamente dependientes de energía. Esto nos hace pensar que un desbalance energético dejaría al corazón desprovisto de la protección que estos mecanismos le confieren frente estímulos estresores.

En síntesis, estos antecedentes muestran que las características intrínsecas del funcionamiento del corazón lo convierten en un tejido en que  $\text{NAD}^+$  cobra una gran importancia en la regulación transcripcional y metabólica, procesos esenciales para la plasticidad cardíaca, que permiten mantener la funcionalidad del corazón ante los cambios en la demanda.

Si bien queda en evidencia la asociación entre cardiomiopatías y valores disminuidos de  $\text{NAD}^+$ , los trabajos que abordan este tema son principalmente descriptivos de la disminución de  $\text{NAD}^+$  en estados ya consolidados de las patologías y los efectos positivos del suplemento de  $\text{NAD}^+$ . Sin embargo, dejan abierta la interrogante de si existe una relación causal entre la disminución de  $\text{NAD}^+$  y la pérdida de la función del cardiomiocito y/o el número de éstos, que llevarían finalmente al desarrollo de la patología cardíaca.

De acuerdo con lo anterior, se plantean algunas interrogantes aún no dilucidadas y que reflejan el estado en que se encuentra este campo de investigación en células cardíacas:

- ¿Se relaciona la disminución de  $\text{NAD}^+$  con alteraciones en el metabolismo y la función mitocondrial?
- ¿La alteración metabólica inducida por la disminución de  $\text{NAD}^+$  tiene algún efecto sobre la viabilidad del cardiomiocito o su capacidad de adaptarse a estímulos externos?

## 2. HIPÓTESIS.

“La reducción en los niveles de  $\text{NAD}^+$  produce una disminución del metabolismo y de la respuesta adaptativa en cardiomiocitos”.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

- *Objetivo específico 1.* Determinar si FK866 reduce los niveles de  $\text{NAD}^+$  en cultivos primarios de cardiomiocitos en forma dependiente de la concentración y tiempo de exposición.
- *Objetivo específico 2.* Evaluar si la disminución de  $\text{NAD}^+$  reduce la tasa metabólica de cultivos primarios de cardiomiocitos.
- *Objetivo específico 3.* Determinar si la disminución de  $\text{NAD}^+$  reduce la respuesta adaptativa a estímulos estresores como NE,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e insulina en cardiomiocitos.
- *Objetivo específico 4.* Evaluar si existe una relación de causalidad entre la disminución de los niveles de  $\text{NAD}^+$  y la disminución en el metabolismo y la respuesta adaptativa en cardiomiocitos.

Se eligió el modelo de cultivo primario de cardiomiocitos de rata neonata y el uso del inhibidor de Nampt, FK866, en la búsqueda de dilucidar estas interrogantes y como una primera aproximación de los efectos que podría tener la disminución en los niveles de  $\text{NAD}^+$  en el corazón.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. Reactivos.

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio Hank's, medio DME, medio 199, pancreatina, gelatina, 5-bromo-2'-deoxiuridina, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), anticuerpo anti GAPDH (G9545), insulina, norepinefrina (-) (A7257), hidrato clorhidrato de FK866 (F8557) y  $\beta$ -Nicotinamida Mononucleótido (N3501). El cocktail inhibidor de proteasas complete Mini (11 836 170 001) y el cocktail inhibidor de fosfatasas PhosSTOP (04 906 837 001) se adquirieron en Roche Applied Science (Penzberg, Alemania). El kit de detección EnzyChrom™ NAD<sup>+</sup>/NADH Assay Kit (E2ND-100) se obtuvo en BioAssay Systems (California, USA).

Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). En Cell Signaling (Danvers, MA, EEUU) se obtuvieron los anticuerpos anti Receptor de insulina  $\beta$  (3025), anti fosfo-receptor de insulina  $\beta$  (Tyr1150/1151)/ IGF-1 (Tyr 135/136; cat. 3024) y anti fosfo-Akt (Ser473; cat. 9271). El amortiguador de deshibridización Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer (48430) se adquirió en Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, EEUU) De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron: colagenasa tipo II, suero fetal bovino (SFB) y suero de ternera (SFT). Mitotracker Green-FM (M7514), Faloidina Rodamina (R415) y Hoechst (H3570) se compraron en Molecular Probes-Invitrogen (Eugene, OR, EEUU). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot EZ-ECL (20-500-1000) se adquirió en Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU). La albúmina de suero bovino (ASB) se adquirió en Winkler Ltda. (Santiago, Chile). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

## **4.2. Modelo experimental.**

Para la ejecución de esta tesis se utilizó como modelo experimental cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas. Estos se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los animales se trataron siguiendo las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de experimentación: Guide for The Use of Laboratory Animals (NIH, Publication No. 85-23, revised 1996), siendo los protocolos experimentales además aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## **4.3. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas.**

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, los corazones de ratas neonatas se removieron y lavaron en medio Hank's estéril a 37 °C. Las aurículas se eliminaron y los ventrículos se disgregaron mecánicamente para ser sometidos a digestiones enzimáticas sucesivas con colagenasa tipo II (0,02 g/100 mL Hank's) y pancreatina (0,06 g/100 mL Hank's). Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial a superficies plásticas que presentan los dos tipos celulares presentes en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos). El producto de la digestión enzimática se pre-plaqueó en placas de 100 mm durante 2 h a 37°C en medio DME:M199 (4:1) (Medio de mantención, MM) 10% v/v SFB. Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron, se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 5 min y se resuspendieron en 20 mL de MM 5% v/v SFB y 10% v/v SFT. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán, el cual permite visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer. Conocida su concentración, los cardiomiocitos se sembraron en MM 5% v/v SFB-10% v/v SFT a distintas densidades, según las necesidades experimentales, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina 100  $\mu$ M, sobre placas de cultivo cubiertas previamente con una monocapa de gelatina (2% p/v). Las células se mantuvieron en incubadores termorregulados a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% aire.

#### 4.4. Tratamientos.

Después de 24 h posteriores al sembrado, las células se lavaron 3 veces con amortiguador fosfato salino (PBS) estéril mantenido a 37°C para retirar los residuos propios del cultivo primario, y luego se dejaron por 2 h con medio DME:M199 (4:1) en ausencia de suero fetal. Transcurrido éste tiempo los cardiomiocitos se estimularon con:

- **FK866:** 0,1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  durante 24 y 48 h como estrategia para disminuir los niveles de  $\text{NAD}^+$ .
- **Norepinefrina (NE):** 10  $\mu\text{M}$  durante 48 h como modelo de hipertrofia (Pennanen et al. 2014).
- **Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):** 100  $\mu\text{M}$  durante 24 h para inducir muerte celular.
- **Insulina:** 100 nM durante 30 min para activar la vía clásica de señalización de insulina: IR/Akt.
- **NMN:** 1 mM durante 24 y 48 h como estrategia de restauración de los niveles de  $\text{NAD}^+$  frente al tratamiento con FK866. En este caso la NMN se agregó al medio tanto de forma independiente como en conjunto con FK866, NE y  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### 4.5. Preparación de extractos celulares totales.

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células/placa. Una vez finalizado el estímulo, las células se lavaron tres veces con solución de PBS fría y luego se lisaron con 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lisis NP40 (Tris-HCl 100 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; NP40 0,5% v/v ; NaF 20 mM; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1mM) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasas (Roche). El homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo y se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU). Finalmente, el extracto se desnaturó en tampón SDS 4x, para ser almacenado posteriormente a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### **4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas.**

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, se cargaron 30 µg de extracto proteico total. El gel concentrador se preparó al 5% y el separador al 8 y 12% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en amortiguador de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% p/v) a un voltaje constante de 80 V durante 30 min y luego a 100 V hasta el final de la corrida electroforética.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Macherey-Nagel GmbH & Co. Düren, Alemania) de 0,20 µm, a amperaje constante de 400 mA por 90 min en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% v/v).

#### **4.7. Western blot.**

Una vez realizada la electrotransferencia, las membranas se trataron con amortiguador de bloqueo (TSA 1x; Tween-20 0,1% p/v; leche descremada 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, a una dilución de 1:1000 en amortiguador de incubación (TSA 1x; Tween-20 0,1% v/v) toda la noche a 4°C y con agitación suave. Luego, las membranas se lavaron durante 15 min en TSA 1x; Tween-20 al 0,1% p/v, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanito a una dilución de 1:5.000 en amortiguador de incubación. Para la detección, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL y midió la luminiscencia en el detector Dyversity 4 System (Synoptics Ltd. Inglaterra), utilizando el software GeneSys. Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas se incubaron por 1 h en amortiguador de deshibridización para desprender los anticuerpos, y poder analizar los niveles de otras proteínas en la misma membrana, mediante reacciones de inmunodetección iguales a las descritas anteriormente.

#### **4.8. Microscopía de fluorescencia.**

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de  $0,25 \times 10^6$  células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2% p/v). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% v/v en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% v/v en PBS por 10 min y se bloquearon con ASB al 1% v/v en PBS (filtrado) durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron con la sonda faloidina-rodamina (dilución 1:500) para determinar el área y la sarcomerización celular y Hoechst (dilución 1:1000) para visualizar los núcleos, ambos en PBS-ASB 1% p/v durante 1 h en cámara húmeda a 4°C. Se lavaron nuevamente con PBS y protegidas de la luz las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje, el cual además retarda el decaimiento de la fluorescencia. Posteriormente, las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Axioskop 20 (Carl Zeiss Microscopy, LLC. Nueva York EEUU). El análisis de las imágenes para la determinación del área celular relativa se realizó utilizando el programa ImageJ (NIH, EEUU), trazando el contorno de cada célula en forma manual. Se analizaron al menos 100 células para cada condición, y utilizando las mismas muestras, se determinó perfil de fluorescencia a partir de una línea equivalente a 10  $\mu\text{m}$  trazada sobre una fibra de actina en cada imagen, para distinguir patrones de sarcomerización. (Munoz et al. 2010; Pennanen et al. 2014).

#### **4.9. Citometría de flujo.**

Para todos los experimentos en que se realizó citometría de flujo, se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo. Una vez finalizados los tratamientos y la carga de la sonda respectiva, se removió el medio y las células se soltaron utilizando 300  $\mu\text{L}$  de una solución de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS durante 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min de tripsinización, la reacción se detuvo utilizando SFB en una proporción 1:10. Posteriormente, las células ya cargadas se traspasaron a tubos BD para citometría y su fluorescencia se analizó en un citómetro de flujo FACS – SCAN (Becton, Dickinson and

Company, San Jose, CA, EEUU).

Esta técnica se utilizó para estudiar los siguientes parámetros:

- Niveles de ROS: se utilizó la sonda 1,2,3-dihidrorodamina (DHR) (excitación: 488 nm, emisión: 515 nm), y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM como control, ambos preincubados por 30 min antes de la determinación (Munoz et al. 2010).
- Viabilidad celular: se determinó mediante incorporación de yoduro de propidio (PI) (excitación: 493 nm, emisión: 630 nm). Como control se usó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM por 24 h (Parra et al. 2008).
- Masa mitocondrial total: Para evaluar este parámetro, los cardiomiocitos se incubaron por 30 min con la sonda Mitotracker Green FM (MTG) a una concentración de 400 nM. Como esta sonda se une específicamente a la mitocondria, cualquier cambio en el contenido mitocondrial de la célula, provocará variaciones en la fluorescencia medida por citometría (Hall et al. 2013).
- Potencial de membrana mitocondrial: para esta determinación se usó la sonda TMRM (excitación: 543 nm, emisión: sobre los 560 nm) a una concentración de 200 nM. Las células se preincubaron por 30 min y como control se utilizó el agente desacoplante CCCP 50 µM, el cual también se preincubó 30 min antes de la medición. En este caso, la disminución en la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la caída del potencial mitocondrial (Ardehali et al. 2005).

#### **4.10. Medición de los niveles intracelulares de ATP mediante luminometría.**

Para este ensayo se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Una vez finalizados los estímulos se removió el medio de la placa y se agregaron 20 µL de PBS y el amortiguador de lisis del kit Cell Titer-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) en una relación 1:1. Este método se basa en la

reacción catalizada por la enzima luciferasa, la cual utiliza ATP para adenilar luciferina, la cual al oxidarse emite luz. La placa se agitó durante 2 min con el fin de completar la reacción. Posteriormente, las células se traspasaron a una placa opaca de 96 pocillos y se analizaron en un luminómetro Glomax Multidetection System (Promega, Wisconsin, EEUU), siendo la luminiscencia estable por un período de hasta 4 h. Finalmente, los resultados se expresaron como los promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento o control (Marambio et al. 2010; Villena et al. 2008).

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

Para este tipo de ensayos se utilizaron placas de cultivo de 60 mm con una densidad celular de  $3 \times 10^6$  células/placa. Una vez finalizados los estímulos, se procedió a remover el medio y lavar las células tres veces con PBS. Posteriormente, las células se soltaron utilizando 1 mL de solución tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS, durante 5 min a 37°C. Esta reacción luego se detuvo con SFB en una proporción 1:10. Una vez finalizada la tripsinización, las células se traspasaron a un tubo Eppendorf y se centrifugaron por 4 min a 1500 rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 300  $\mu$ L de PBS, los cuales se traspasaron a una cámara (volumen final de 400  $\mu$ L) acoplada al sistema de electrodos. La velocidad del consumo de oxígeno se registró a 25°C en un electrodo de Clark 1032 acoplado a un sistema de registro digital (Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Scotland). Los datos se obtuvieron y analizaron utilizando el programa Strathkelvin respirometry/monitoring software. Una vez que se extrajeron las pendientes de las curvas obtenidas para cada condición, los resultados se expresaron como promedios de las mediciones normalizadas con respecto a las células control o sin tratamiento (Araya-Maturana et al. 2002).

#### **4.12. Medición de los niveles intracelulares de NAD<sup>+</sup> por espectrofotometría.**

Para estas mediciones se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de  $0,25 \times 10^6$  células/pocillo. Se utilizó el kit de detección EnzyChrom<sup>TM</sup> NAD/NADH Assay Kit. Este método se basa en la actividad de la lactato deshidrogenasa, la cual utiliza NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones para transformar el lactato a piruvato, y a su vez el NADH, en presencia de metosulfato de fenazina, reduce una sal de tetrazolio. La intensidad del color del producto reducido es proporcional a la concentración de NAD<sup>+</sup> contenida en la muestra. Este experimento permite medir NAD<sup>+</sup> y NADH a partir de duplicados de la muestra. Se realizó el siguiente protocolo siguiendo las recomendaciones del fabricante: Las células se lavaron con PBS 3 veces y se les agregó 300  $\mu$ L de una solución de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS durante 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min de tripsinización, la reacción se detuvo utilizando SFB en una proporción 1:10. Luego las células se traspasaron a tubos de 1,5 mL y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se homogenizó el sedimento con 100  $\mu$ L de amortiguador de extracción para NAD<sup>+</sup> (medio ácido) o para NADH (medio básico) según correspondiera. Luego se calentaron los tubos a 60°C durante 5 min. Se agregó amortiguador de reacción (Tris hidroximetil aminometano 3% p/v y ASB 0,1% p/v), se neutralizó la muestra con el amortiguador de extracción contrario al paso anterior y se centrifugaron los tubos a 14.000 rpm durante 5 min. Al sobrenadante se le agregó lactato, MTT, lactato deshidrogenasa y diaforasa. Se determinó la formación de formazán por absorbancia a 565 nm en el espectrofotómetro Glomax Multidetecion System (Promega, Wisconsin, EEUU) inmediatamente después de comenzar la reacción y luego de 15 min a temperatura ambiente. La diferencia de las absorbancias a tiempo cero y 15 min se compararon con la solución estándar para determinar la concentración de NAD<sup>+</sup>, que luego se relativizó a los  $\mu$ g de proteínas contenidas en la muestra, determinadas por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU). Los resultados se expresaron relativizados al control sin estímulos.

#### **4.13. Análisis estadístico.**

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedio  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett o Bonferroni, para determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS.

**5.1. Objetivo 1:** *Determinar si FK866 reduce los niveles de NAD<sup>+</sup> en cultivos primarios de cardiomiocitos en forma dependiente de la concentración y tiempo de exposición.*

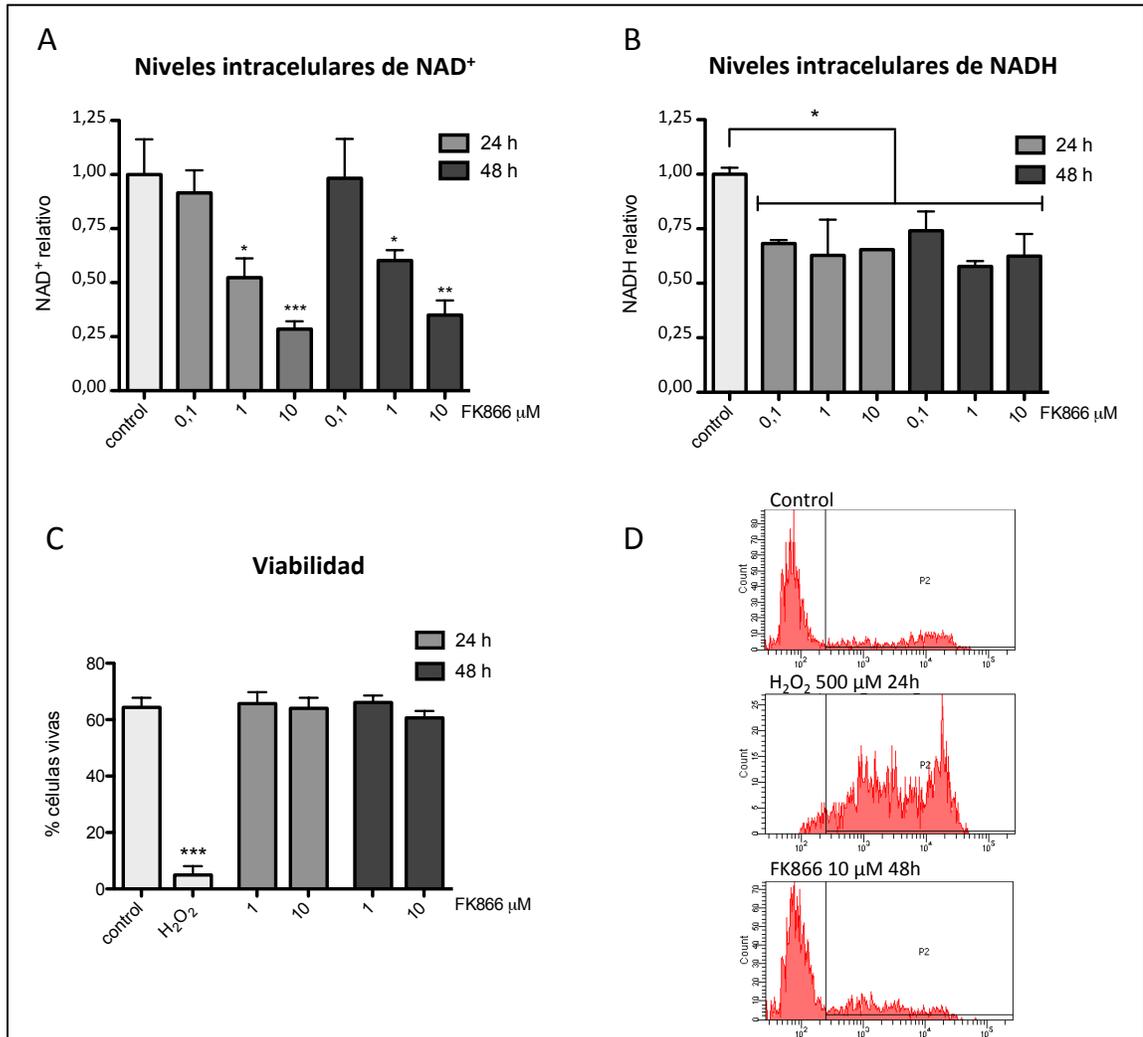
Los antecedentes que describen la importancia de NAD<sup>+</sup> en mamíferos son en su mayoría descriptivos respecto a los niveles de NAD<sup>+</sup> y de la enzima marcapaso de su síntesis, Nampt, en estados consolidados de diferentes patologías ó mediante el suplemento de NAD<sup>+</sup> y sus efectos. Sin embargo, pocos estudios abordan las consecuencias de su disminución.

Como estrategia para disminuir los niveles de NAD<sup>+</sup> en el cardiomiocito se utilizó FK866, un inhibidor que compite con nicotinamida por el sitio activo de Nampt con mucha mayor afinidad. Este objetivo busca evaluar esta estrategia en el modelo de cultivo primario de cardiomiocitos.

*a). Efecto de FK866 sobre los niveles intracelulares de NAD<sup>+</sup>.*

Para resolver el objetivo 1, el primer paso fue determinar la efectividad de FK866 para disminuir los niveles de NAD<sup>+</sup> en el cardiomiocito. Para este fin, cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas se trataron a distintos tiempos (24 y 48 h) con FK866 (0,1, 1 y 10  $\mu$ M) y se determinaron los niveles de NAD<sup>+</sup> y NADH mediante ensayo enzimático con el kit EnzyChrom<sup>TM</sup> NAD/NADH Assay Kit.

En la **figura 3A** se presenta la cuantificación de los niveles de NAD<sup>+</sup> y se puede observar que éstos disminuyen proporcionalmente a la concentración de FK866 a la que fueron expuestos los cardiomiocitos (N=3). A la concentración 0,1  $\mu$ M de FK866 no se observaron cambios en los niveles de NAD<sup>+</sup> a 24 ni a 48 h de exposición. Sin embargo, a las concentraciones 1 y 10  $\mu$ M se observó una disminución significativa, llegando a ser menos que el 50% del NAD<sup>+</sup> intracelular del control, en el caso de la concentración mayor. Los niveles de NAD<sup>+</sup> cambiaron de forma dependiente de la concentración, pero no del tiempo de exposición al inhibidor (**Figura 3A**).



**Figura 3. FK866 disminuye los niveles de NAD<sup>+</sup> en cardiomiocitos, sin afectar su viabilidad.** Se determinaron: A) Niveles de NAD<sup>+</sup> (N=3), B) Niveles de NADH (N=3) y C) Viabilidad celular (N=7) de cardiomiocitos incubados con FK866 a diferentes concentraciones (0,1, 1 y 10 μM) durante 24 y 48 h. Se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como control positivo de muerte. D) Histogramas representativos de las determinaciones de viabilidad por citometría de flujo. Los datos corresponden al promedio ± SEM con análisis mediante ANOVA de una vía con post-test de Dunnett \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 vs control.

En la **figura 3B** se muestra la cuantificación de NADH en las mismas condiciones. Los niveles de NADH disminuyeron en un 35% promedio, de forma independiente de la concentración o el tiempo de exposición a FK866 (N=3).

*b). Efecto de FK866 sobre la viabilidad de los cardiomiocitos.*

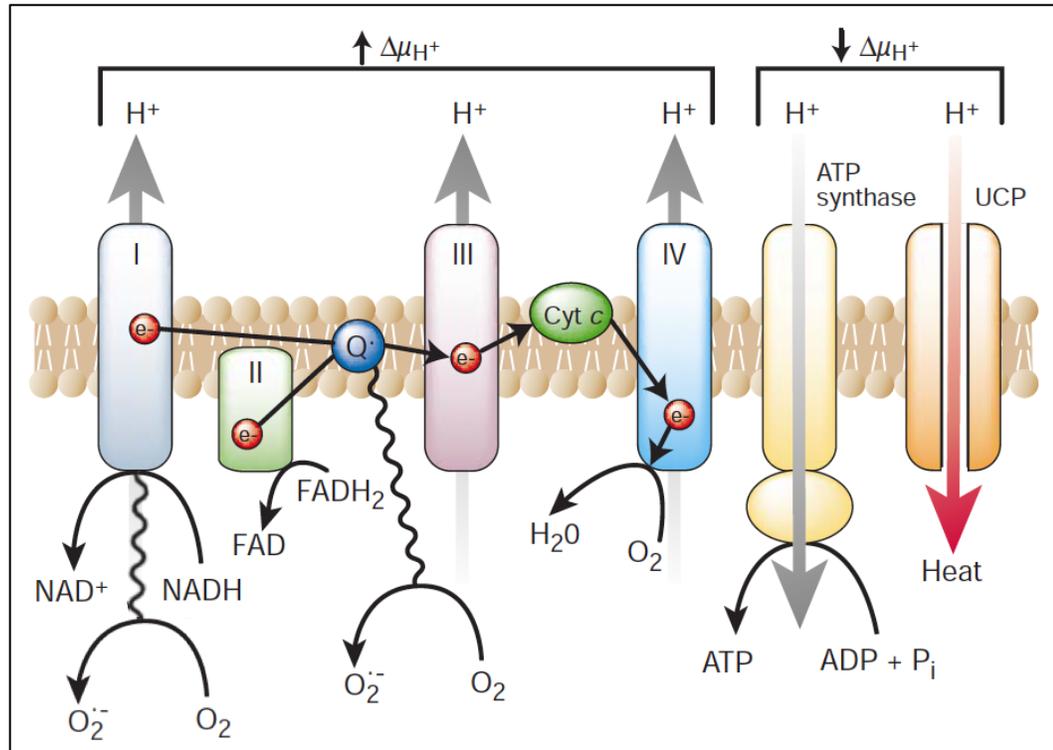
Para evaluar si la disminución en los niveles de  $\text{NAD}^+$  afectaba la viabilidad de los cardiomiocitos, se determinó el porcentaje de células vivas y muertas luego del tratamiento con FK866 a las concentraciones en que disminuyeron los niveles de  $\text{NAD}^+$  expuestas anteriormente, 1 y 10  $\mu\text{M}$ , a 24 y 48 h de exposición. Para esto se midió la incorporación de yoduro de propidio (PI) a las células por citometría de flujo.

En la **figura 3C** se observa que la disminución de  $\text{NAD}^+$  no produjo cambios en la viabilidad del cardiomiocito a ninguna de las concentraciones ni tiempos de exposición evaluadas (N=7). En la **figura 3D** se muestra un histograma representativo de la distribución de la población de células respecto a su fluorescencia por la incorporación de PI, determinada mediante citometría de flujo.

**5.2 Objetivo 2:** *Evaluar si la disminución de  $NAD^+$  reduce la tasa metabólica de cultivos primarios de cardiomiocitos.*

El corazón tiene una de las más altas velocidades de conversión energética en el organismo, la cual depende críticamente de la mitocondria (Covian et al. 2012). La función principal de la mitocondria es la producción de ATP, la cual ocurre mediante fosforilación oxidativa. En este proceso, electrones se transfieren desde los sustratos reducidos NADH y  $FADH_2$  al oxígeno a través de los complejos I, III y IV, que generan un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial. La energía electroquímica de este gradiente es utilizada por el complejo V para la síntesis de ATP mediante el acoplamiento del reingreso de protones a la matriz, con la fosforilación de ADP. Algunos de estos electrones pueden filtrarse desde la cadena transportadora y reaccionar con oxígeno para formar ROS, las cuales juegan un rol importante en señalización celular y también en la generación de estrés oxidativo (Feissner et al. 2009).

En este objetivo se determinó la función mitocondrial como indicador del estado metabólico del cardiomiocito. Para esto se evaluaron diferentes parámetros que dan cuenta del estado de la mitocondria y de su función en respuesta a la disminución de  $NAD^+$  en el cardiomiocito. En la **figura 4** se presentan los componentes de la CTE y los metabolitos involucrados en su funcionamiento, algunos de los cuales se evaluaron en este objetivo.



**Figura 4. Funcionamiento de la cadena transportadora de electrones mitocondrial.**

El NADH producto del ciclo de Krebs y la glicólisis dona electrones a la NADH ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), la cual los transfiere a la ubiquinona. La ubiquinona puede también ser reducida por electrones donados por deshidrogenasas contenedoras de FADH<sub>2</sub>, como la succinato deshidrogenasa (complejo II). Los electrones de la ubiquinona reducida son transferidos secuencialmente a la ubiquinol citocromo C oxidoreductasa (complejo III), luego al citocromo C, a la citocromo C oxidasa (complejo IV) y finalmente al oxígeno. La transferencia de electrones a través de los complejos I, III y IV, genera un gradiente de protones que activa la ATP sintasa. Termogenina, en menor medida, también cataliza la transferencia de protones desde el espacio intermembrana a la matriz, generando calor. Electrones pueden filtrarse desde la cadena transportadora y reaccionar con oxígeno para formar anión superóxido. (Modificado de Brownlee 2001).

*a). Efecto de la disminución de  $NAD^+$  sobre el potencial de membrana mitocondrial.*

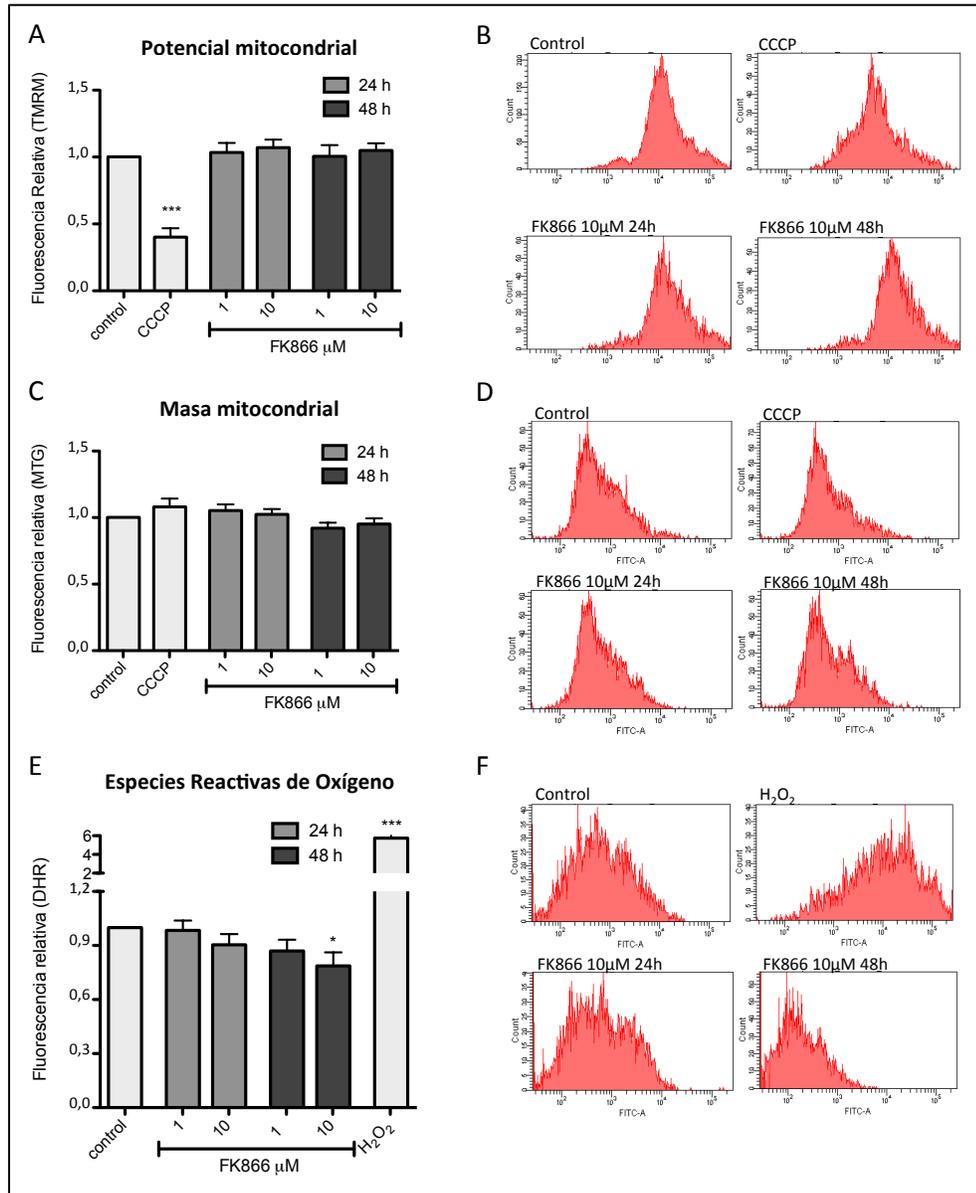
El potencial de membrana a través de la membrana interna es un parámetro esencial en el estudio de la función mitocondrial porque representa la fuerza motriz para la generación de ATP, la captura de  $Ca^{2+}$  y la mantención del poro de transición de permeabilidad (mPTP) cerrado. En otras palabras, se corresponde con la función y la integridad de la mitocondria.

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó mediante la sonda tetrametilrodamina (TMRM), la cual es un compuesto catiónico lipofílico que se acumula en la mitocondria de forma proporcional a la polaridad de la membrana. La **figura 5A** muestra la cuantificación de la fluorescencia promedio con TMRM de cardiomiocitos tratados con FK866 a 1 y 10  $\mu$ M durante 24 y 48 h (N=5). Se utilizó el desacoplante de la cadena de electrones CCCP como control positivo para la disminución del potencial. Se observa que la disminución de  $NAD^+$  no afectó el potencial de membrana mitocondrial. La **figura 5B** muestra histogramas representativos de las mediciones realizadas.

*b). Efecto de la disminución de  $NAD^+$  sobre la masa mitocondrial.*

Las mitocondrias forman una red que se encuentra en constante remodelación por los procesos de fusión/fisión mitocondrial, biogénesis y mitofagia (Verdejo et al. 2012). Con el fin de determinar si se está produciendo un cambio en la masa mitocondrial total, que podría estar enmascarando un cambio de potencial de membrana, se midió la incorporación de la sonda Mitotracker Green a los cardiomiocitos mediante citometría de flujo. Esta sonda se une de forma específica a la membrana mitocondrial independientemente de su potencial, indicando la masa mitocondrial total en la célula.

La **figura 5C** presenta la medición de la masa mitocondrial de cardiomiocitos tratados con FK866 en las condiciones ya mencionadas, y con CCCP (N=5). La disminución de  $NAD^+$  no alteró la masa mitocondrial



**Figura 5. Disminución de NAD<sup>+</sup> reduce niveles de ROS en cardiomiocitos, sin afectar su potencial o masa mitocondrial.** Las células se trataron con FK866 1 y 10  $\mu$ M durante 24 y 48 h. Se midió potencial mitocondrial (A) y masa mitocondrial (C), utilizando CCCP como control positivo para el potencial mitocondrial. En B) y D) se presentan histogramas representativos de las mediciones por citometría de flujo. E) ROS. Se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como control positivo. F) Histograma representativo de la medición de ROS. Los datos corresponden al promedio relativizados al control  $\pm$  SEM (N=5-6). Análisis mediante ANOVA de una vía con post-test de Dunnett \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 vs control.

total en el cardiomiocito. En la **figura 5D** se presentan histogramas representativos de las mediciones.

*c). Efecto de la disminución de  $NAD^+$  sobre los niveles de ROS.*

Dentro del sistema cardiovascular, existen dos fuentes principales de ROS: Enzimas citosólicas como NADPH oxidasa y xantina oxidasa, y la mitocondria (Verdejo et al. 2012). En varios puntos de la CTE ocurre filtración de electrones hacia el oxígeno, generando anión superóxido, el cual es altamente reactivo y es también responsable de la generación de otras especies oxidativas.

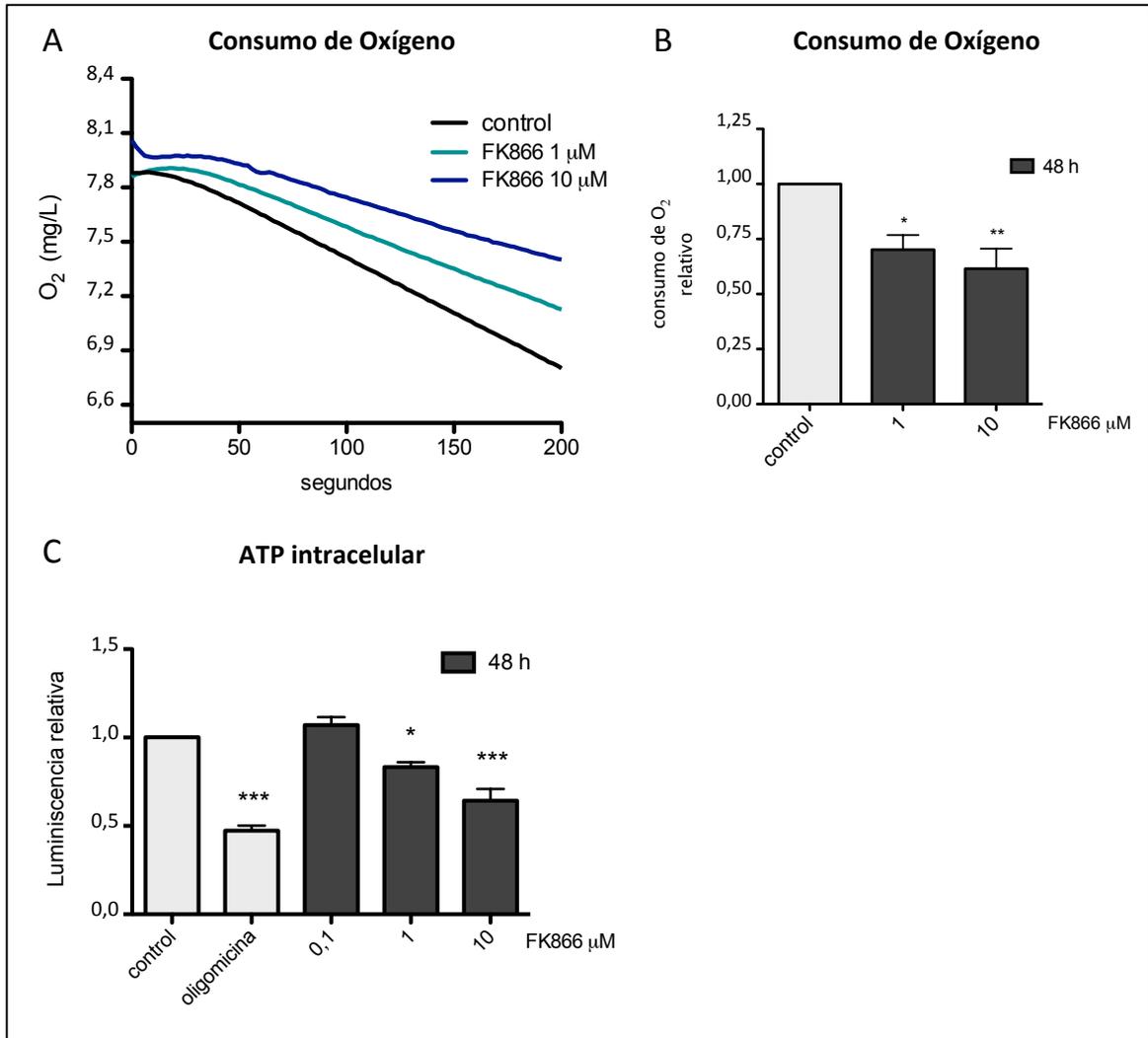
Las principales fuentes de ROS en el cardiomiocito, en condiciones fisiológicas normales, son los complejos I y II. Las membranas, proteínas y el ADN mitocondriales son particularmente sensibles al daño oxidativo (Dikalov 2011).

Se determinaron los niveles de ROS mediante la sonda 1,2,3-dihidrorodamina (DHR), la cual se vuelve fluorescente en su estado oxidado. En la **figura 5E** se muestra la medición de la fluorescencia de esta sonda en los cardiomiocitos expuestos a las diferentes concentraciones de FK866, con  $H_2O_2$  100  $\mu M$  incubado durante 30 min como control positivo (N=6). Las mediciones indican que hubo una disminución en los niveles de ROS producto de la disminución de  $NAD^+$  por FK866 a la concentración de 10  $\mu M$  durante 48 h. Histogramas representativos de las mediciones se muestran en la **figura 5F**.

*d). Efecto de la disminución de  $NAD^+$  sobre el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP.*

Con el objetivo de evaluar la fosforilación oxidativa en un ambiente metabólico con bajos niveles de  $NAD^+$ , se determinaron el consumo de oxígeno y la producción de ATP. En conjunto estos datos permiten evaluar la función mitocondrial en ambos extremos de la CTE: en la utilización de oxígeno como aceptor de electrones y en la síntesis ATP como producto final de este proceso.

Según los resultados presentados anteriormente, los efectos de la disminución de  $NAD^+$  se presentaron más claramente luego de 48 h de exposición a FK866, por lo cual en adelante se eligió trabajar a este tiempo de incubación. La velocidad de consumo de oxígeno se determinó mediante oxigrafía de Clark. Esta técnica permite determinar la respiración celular basal de células completas. En la **figura 6A** se muestra una representación de los datos obtenidos desde el oxígrafo en la medición del consumo de oxígeno de cardiomiocitos en suspensión, sin tratamiento o pre-incubados con FK866. A cada condición le corresponde una curva de concentración de oxígeno de la cámara en la que se encuentran las células, respecto al tiempo. El valor absoluto de la pendiente de estas curvas corresponde a la velocidad de consumo de oxígeno, que posteriormente se relativiza con respecto a las células control. En la **figura 6B** se presenta la cuantificación de la velocidad de consumo de oxígeno de cardiomiocitos tratados con FK866 1 y 10  $\mu M$  durante 48 h, respecto al control sin tratamiento (N=5). Los resultados muestran que la disminución de  $NAD^+$  intracelular redujo significativamente el consumo de oxígeno. Esta disminución ocurrió tanto en el tratamiento con 1 como con 10  $\mu M$  de FK866. En la **figura 6C** se exponen los niveles de ATP intracelular determinados por la medición de luminiscencia en un ensayo con luciferasa (N=6). Se utilizó Oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa, a concentración 5  $\mu M$  durante 3 h como control positivo de inhibición de la síntesis de ATP. El gráfico muestra que el nivel de ATP celular disminuyó conforme a la concentración de FK866 a la que fueron expuestos los cardiomiocitos, y por consecuencia, a la disminución de los niveles de  $NAD^+$  intracelulares.



**Figura 6. Disminución de NAD<sup>+</sup> reduce la función mitocondrial en cardiomiocitos.**

A) Gráfico representativo de la velocidad de consumo de oxígeno y B) cuantificación de consumo de oxígeno relativo al control, en cardiomiocitos incubados con FK866 (1 y 10 μM) durante 48 h (N=5). C) Niveles de ATP intracelular se determinaron luego de 48 h de exposición a FK866 0,1, 1 y 10 μM, utilizando Oligomicina 5 μM como control positivo (N=6). Los datos corresponden al promedio ± SEM de los experimentos relativizados al control. Análisis mediante ANOVA de una vía con post-test de Dunnett \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 vs control.

**5.3 Objetivo 3:** *Determinar si la disminución de  $NAD^+$  reduce la respuesta adaptativa a estímulos estresores como NE,  $H_2O_2$ , e insulina en cardiomiocitos.*

Las células continuamente necesitan integrar las señales externas de estrés y así adaptarse a los cambios en el medio, lo cual determinará su muerte o supervivencia. Los cardiomiocitos deben adaptarse a numerosos estímulos que permiten al corazón mantener la función en condiciones adversas y responder a los cambios en la demanda. Debido a que pierden casi completamente su capacidad proliferativa después del nacimiento, su supervivencia y capacidad adaptativa se vuelven especialmente relevantes ya que se traducen necesariamente en función cardíaca. Este objetivo busca evaluar si la respuesta del cardiomiocito a estímulos externos se ve afectada por la disminución en los niveles de  $NAD^+$ .

*a). Efecto de la disminución de  $NAD^+$  sobre la vía de señalización de insulina.*

La insulina favorece la entrada de glucosa a la célula, lo que es un paso clave en su uso como sustrato secundario de energía (después de los ácidos grasos) en el metabolismo del cardiomiocito. Además, la señalización de insulina contribuye a la regulación de la selección de sustratos para la producción de ATP en el corazón, ya que regula el balance energético mediante su acción en la glicólisis, la oxidación de piruvato y ácidos grasos, y el metabolismo del glicógeno.

Se ha reportado ampliamente que la supresión de la señalización de insulina es importante en estados patológicos (Brownsey et al. 1997). Al contrario, el incremento en la disponibilidad de glucosa aumenta la capacidad de trabajo y protege contra la insuficiencia cardíaca en corazones hipertróficos (Liao 2002).

Se evaluó el efecto de la disminución de  $NAD^+$  en la vía clásica de señalización de insulina mediante Western blot. Los cardiomiocitos se expusieron a FK866 1 y 10  $\mu M$  durante 48 h, luego de lo cual se estimularon con insulina 100 nM durante 30 min.

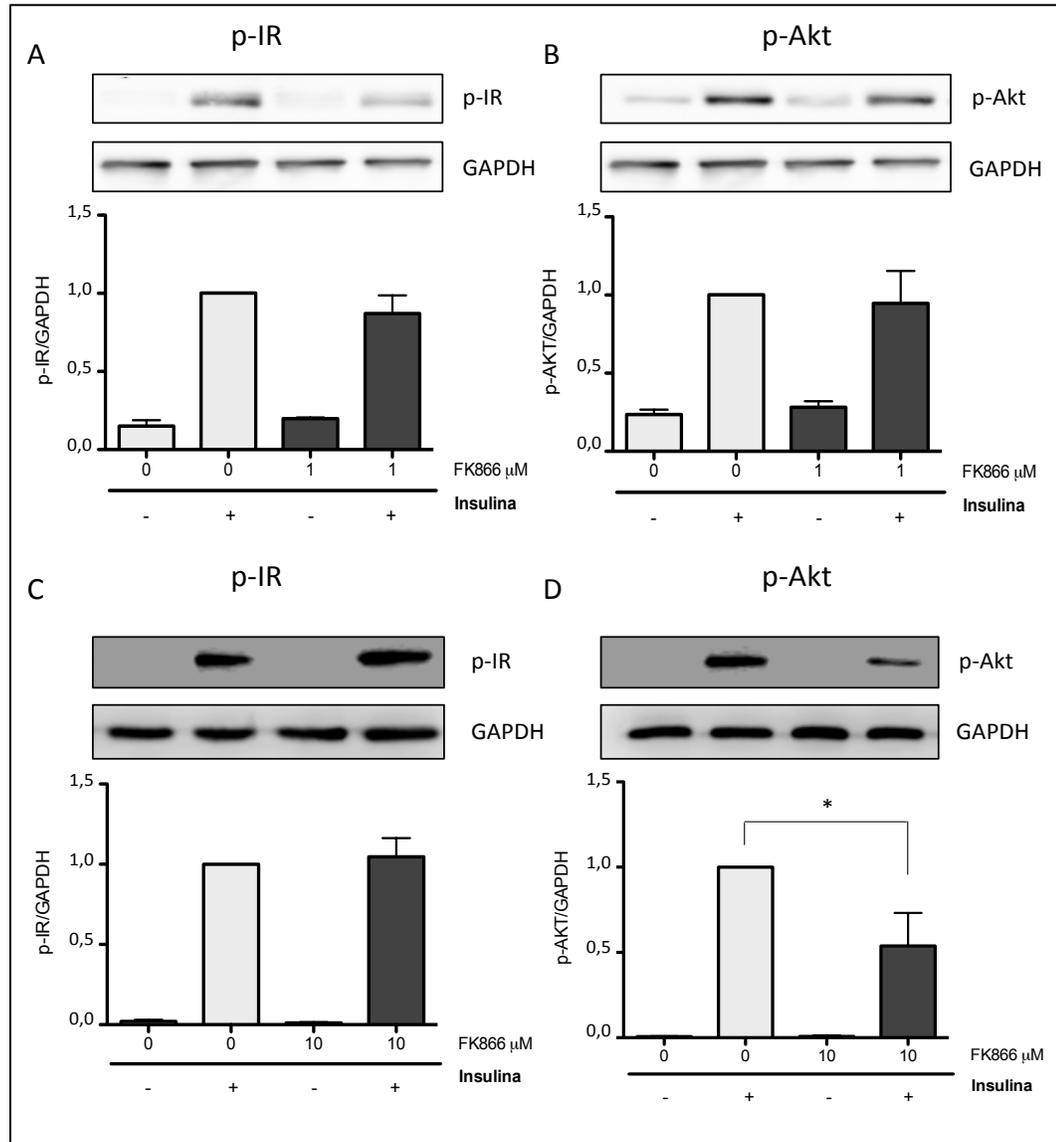
En la **figura 7** se muestran imágenes representativas y cuantificaciones de los Western blot para el receptor de insulina fosforilado (p-IR) y Akt fosforilada (p-Akt), utilizando GAPDH como control de carga (N=3). Los valores se relativizaron al control con insulina, al cual se le otorgó el valor 1.

En las **figuras 7A y B** se puede observar que la disminución de  $\text{NAD}^+$  dada por FK866 1  $\mu\text{M}$  no afectó la fosforilación de IR o Akt por efecto de la insulina. Sin embargo, al utilizar FK866 10  $\mu\text{M}$  se observó una disminución en la fosforilación de Akt en respuesta a insulina (**Figura 7D**) aún cuando a esta concentración de FK866 no se apreciaron cambios en la fosforilación del receptor (**Figura 7C**).

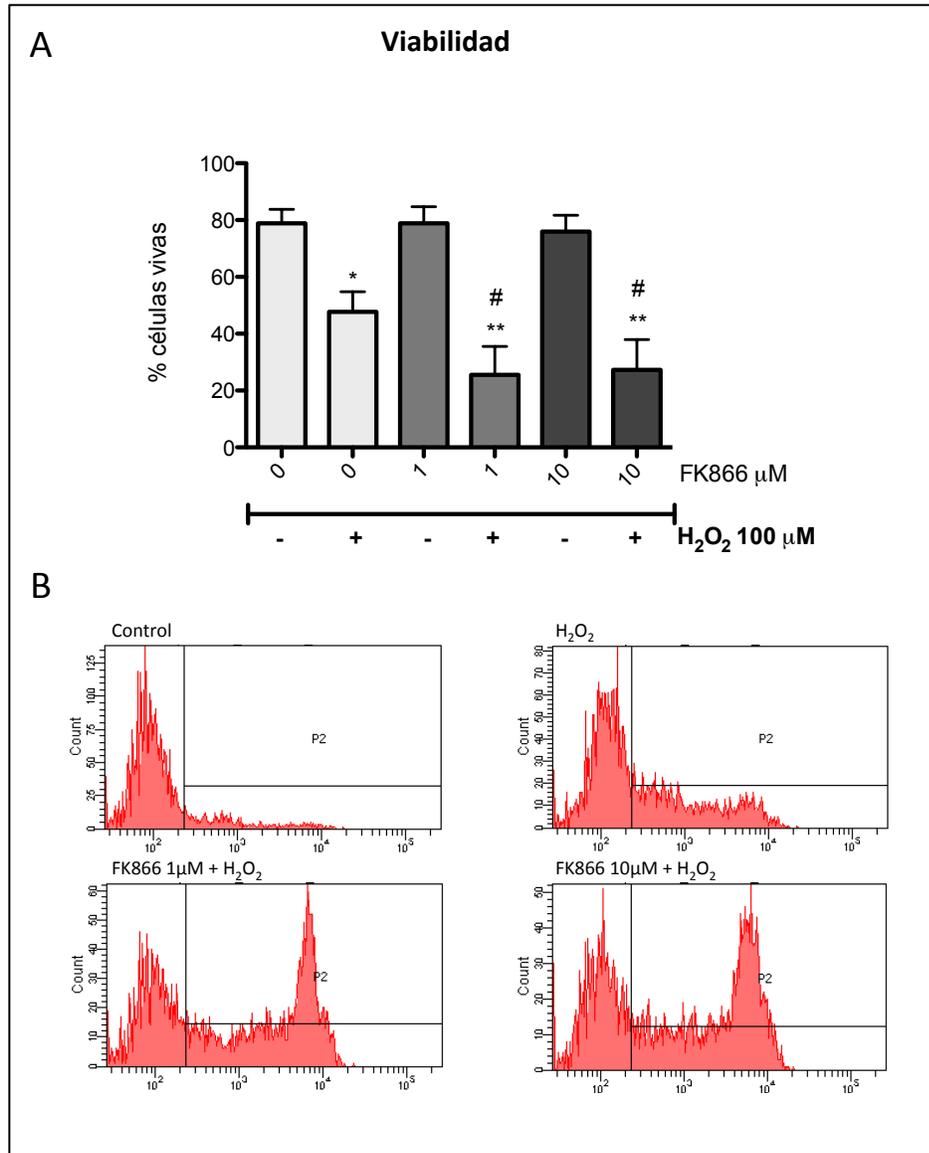
*b). Efecto de la disminución de  $\text{NAD}^+$  en la respuesta de sobrevida a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .*

La etiología de la insuficiencia cardiaca involucra múltiples agentes y condiciones patológicas, siendo la pérdida progresiva de cardiomiocitos uno de los componentes más importantes en su desarrollo (Hirota et al. 1999). Como son células altamente diferenciadas, con casi nula proliferación después del nacimiento, los cardiomiocitos activan vías de señalización para la supervivencia cuando son estresados, lo cual los hace altamente resistentes a la muerte.

Se evaluó la sobrevida de los cardiomiocitos a la exposición a peróxido de hidrógeno 100  $\mu\text{M}$  durante 24 h con y sin disminución en los niveles de  $\text{NAD}^+$ . Para esto se midió la incorporación de PI mediante citometría de flujo. En la **figura 8A** se presenta la viabilidad de cardiomiocitos incubados con FK866 1 y 10  $\mu\text{M}$  durante 48 h, y estimulados con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En el gráfico se observa que la disminución de  $\text{NAD}^+$  disminuye la viabilidad de los cardiomiocitos frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a ambas concentraciones de FK866. En la **figura 8B** se muestran histogramas representativos de las determinaciones.



**Figura 7. Disminución de  $\text{NAD}^+$  reduce la señalización de la vía clásica de insulina en cardiomiocitos.** Los niveles del receptor de insulina fosforilado (p-IR) en Tyr1150/1151 y de Akt fosforilada (p-Akt) en Ser473 se determinaron mediante Western blot. Se utilizaron extractos totales de proteínas de cardiomiocitos pre-tratados con FK866 1 y 10  $\mu\text{M}$  durante 48 h y luego sometidos a un pulso de insulina 10 nM de 30 min. Se observan imágenes representativas y las cuantificaciones de la relación A) p-IR/GAPDH, B) p-Akt/GAPDH ambas con tratamiento FK866 1  $\mu\text{M}$ , y C) p-IR/GAPDH, y D) p-Akt/GAPDH incubados con FK866 10  $\mu\text{M}$ , en estado basal y en respuesta a insulina para cada condición. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM de los experimentos relativizados a la condición con insulina. Análisis mediante ANOVA de una vía con post-test de Dunnett respecto a la condición con insulina. \* $p < 0,05$  vs insulina.



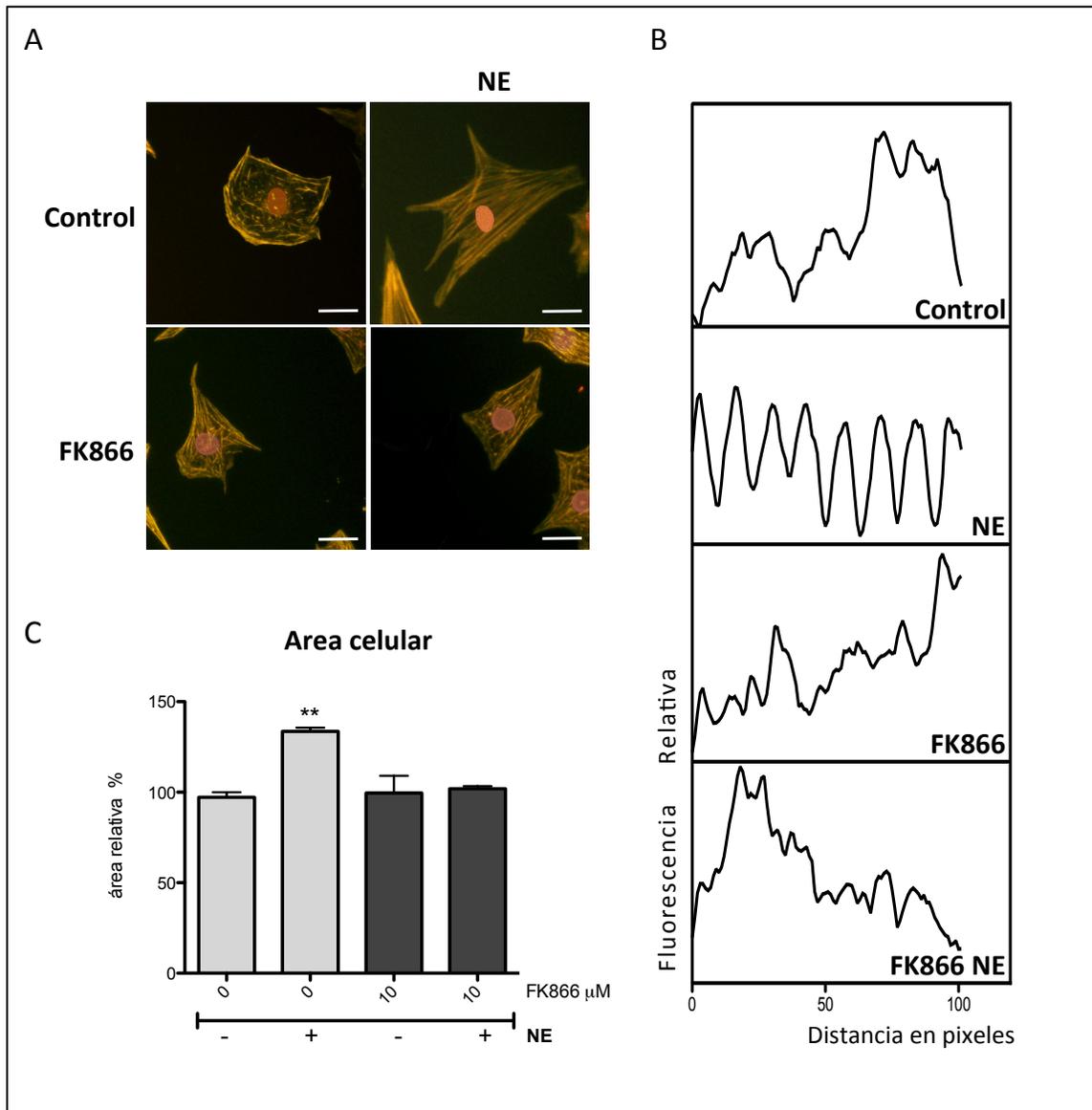
**Figura 8. Disminución en los niveles de NAD<sup>+</sup> sensibiliza los cardiomiocitos a la muerte por peróxido.** Cardiomiocitos se incubaron con FK866 1 y 10 μM durante 48 h y se estimularon con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM durante 24 h como inductor de muerte. Luego se determinó su viabilidad por incorporación de PI. A) Cuantificación del porcentaje de células viables (N=3). B) Histogramas representativos de las determinaciones de viabilidad por citometría de flujo. Los datos corresponden al promedio ± SEM con análisis mediante ANOVA de una vía con post-test de Dunnett respecto a la condición control (\*p<0,05, \*\*p<0,01) y respecto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#p<0,01).

*c). Efecto de la disminución de  $NAD^+$  en la respuesta hipertrófica a NE.*

Como respuesta a incrementos crónicos en la presión hemodinámica y sobrecarga de volumen, el corazón comienza una respuesta adaptativa de hipertrofia compensatoria que lleva a un aumento del tamaño del corazón, manteniendo la función cardíaca normal (Chien 1999).

Para determinar la importancia de  $NAD^+$  en este proceso, se evaluó el área celular y la sarcomerización de cardiomiocitos tratados con norepinefrina 10  $\mu$ M como inductor hipertrófico, y FK866 10  $\mu$ M para disminuir los niveles de  $NAD^+$ , ambos durante 48 h de exposición. En la **figura 9A** se exponen imágenes de microscopía de epifluorescencia de cardiomiocitos marcados con faloidina-rodamina, la cual se une a los filamentos de actina, para distinguir estructuras sarcoméricas y estimar el área celular. En la **figura 9B** se muestra el perfil de fluorescencia determinado a partir de una línea equivalente a 10  $\mu$ m, trazada sobre un filamento en cada imagen, para determinar patrones de sarcomerización. Se observa el patrón de sarcomerización característico de la respuesta hipertrófica en los cardiomiocitos estimulados con NE, y la ausencia de esta respuesta en las células tratadas con FK866.

En la **figura 9C** se presenta el promedio de la cuantificación del área de al menos 100 células por condición en cada experimento. Se puede observar que la NE produjo un aumento del área celular cercano al 30% en las células control, pero este aumento de tamaño no ocurrió cuando fueron también tratadas con FK866.



**Figura 9. Disminución en los niveles de  $\text{NAD}^+$  impide el desarrollo de la respuesta hipertrófica a NE en cardiomiocitos.** A) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia de cardiomiocitos tratados con FK866 10  $\mu\text{M}$  y estimulados con NE 10  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Marcaje de F-Actina con faloidina-rodamina (amarillo) y de núcleos con Hoechst (rojo). Escala gráfica 10  $\mu\text{m}$ . B) Perfil de fluorescencia relativa lineal equivalente a 10  $\mu\text{m}$ , trazada sobre una fibra de actina en cada imagen representativa, para mostrar patrones de sarcomerización. C) Cuantificación del área celular promedio de al menos 100 cardiomiocitos por condición en cada experimento, presentado como el promedio  $\pm$  SEM con análisis mediante ANOVA de una vía con post-test de Dunnett. \*\* $p < 0,01$  vs control.

**5.4 Objetivo 4:** *Evaluar si existe una relación de causalidad entre la disminución de los niveles de NAD<sup>+</sup> inducida por FK866, y la disminución en el metabolismo y la respuesta adaptativa en cardiomiocitos.*

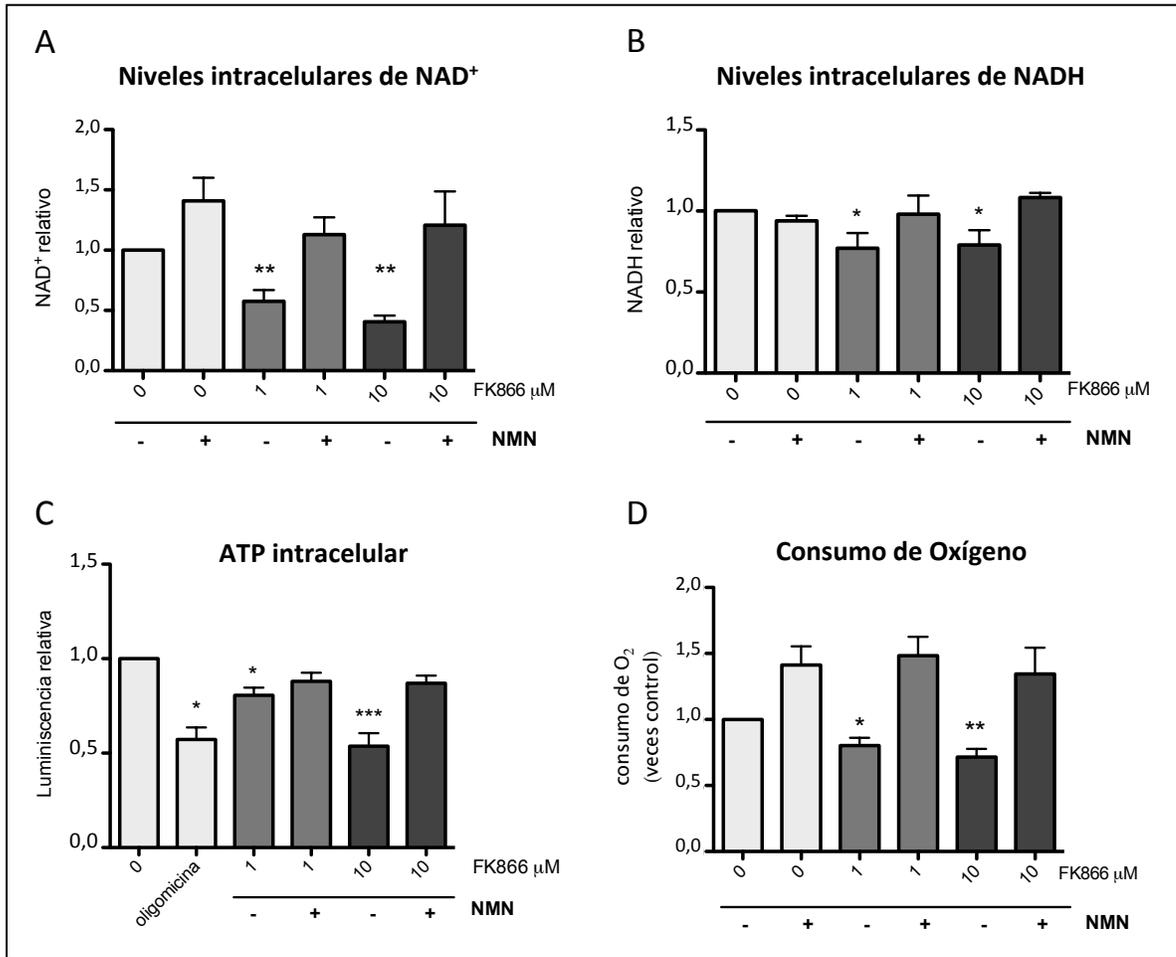
Este objetivo busca determinar si los efectos producidos por el inhibidor de Nampt, FK866, en el metabolismo y la respuesta adaptativa de los cardiomiocitos son causados efectivamente por la disminución de NAD<sup>+</sup>. Para esto se restauraron los niveles de NAD<sup>+</sup> en las células incubadas con FK866 mediante la administración de nicotinamida mononucleótido (NMN), que corresponde al producto de la enzima Nampt en la vía de síntesis de NAD<sup>+</sup>. Esta estrategia le otorga el sustrato a la siguiente enzima de la vía Nmnat, permitiendo la restauración de la síntesis de NAD<sup>+</sup> en el cardiomiocito.

Se evaluaron los efectos de la restauración de los niveles de NAD<sup>+</sup> en el metabolismo, y en dos de las tres respuestas adaptativas puestas a prueba en el objetivo anterior: La respuesta hipertrófica a NE y la respuesta de supervivencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*a). Recuperación de los niveles de NAD<sup>+</sup> en cardiomiocitos tratados con FK866, y su efecto en el metabolismo del cardiomiocito.*

En primer lugar se determinó el efecto de la administración de NMN en conjunto con FK866 en los niveles de NAD<sup>+</sup> y NADH. Para esto se midieron los niveles NAD y NADH mediante un kit de ensayo enzimático, como fue descrito en el objetivo 1. Los cardiomiocitos se expusieron a FK866 1 ó 10 µM y a NMN 1 mM, simultáneamente durante 48 h.

En la **figura 10A** se presenta la cuantificación de NAD<sup>+</sup>, y en la **figura 10B** la cuantificación de NADH, ambas relativizadas al control (N=3). Se observa que el tratamiento con NMN recuperó tanto los niveles de NAD<sup>+</sup> como de NADH, a ambas concentraciones de FK866.



**Figura 10. NMN restablece los niveles de NAD<sup>+</sup> y la función mitocondrial de cardiomiocitos tratados con FK866.** Cardiomiocitos se incubaron con FK866 1 o 10 μM, y NMN 1 mM durante 48 h. Se determinaron A) Niveles de NAD<sup>+</sup> (N=3), B) Niveles de NADH (N=3), C) Niveles de ATP intracelular (N=4) utilizando Oligomicina 5 μM como control positivo, y D) Consumo de oxígeno (N=5). Los datos corresponden al promedio ± SEM con análisis mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnett \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001 vs control.

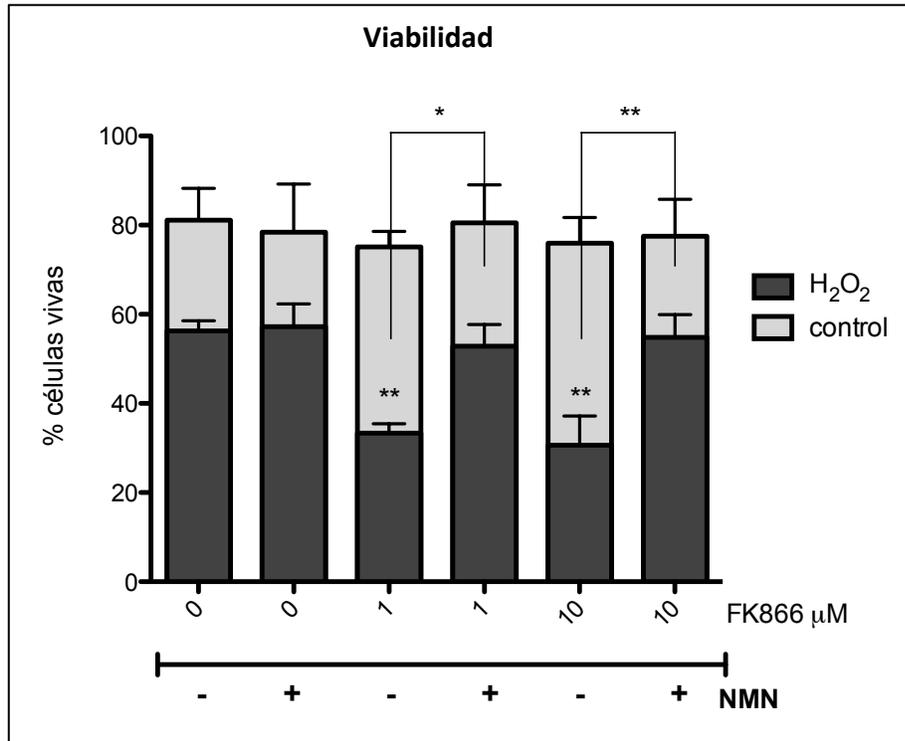
Luego se evaluó si NMN recuperaba la función mitocondrial en el cardiomiocito, como indicador de su estado metabólico. Se determinaron el consumo de oxígeno y la producción de ATP, mediante oxigrafía de Clark y ensayo enzimático con luciferasa, respectivamente.

En la **figura 10C** se muestran los resultados de el rescate de los niveles de ATP con NMN, y se puede apreciar que se restauran los valores de ATP a los niveles normales, tanto cuando son tratados con FK866 a 1 como a 10  $\mu\text{M}$  (N=4). Respecto al consumo de oxígeno, en la **figura 10D** se puede observar que también se restauran los niveles con la adición de NMN a ambas concentraciones de FK866, mostrando incluso una tendencia a aumentar los valores normales (N=5).

*b). Recuperación de los niveles de  $\text{NAD}^+$  en cardiomiocitos tratados con FK866, y su efecto en la respuesta de supervivencia a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .*

Se incubaron los cardiomiocitos con FK866 1 o 10  $\mu\text{M}$ , en conjunto con NMN 1 mM durante 48 h. Luego se midió su supervivencia frente a un estímulo con peróxido de hidrógeno 100  $\mu\text{M}$  durante las últimas 24 h en conjunto con los estímulos anteriores, por incorporación de PI mediante citometría de flujo.

Como se puede apreciar en la **figura 11**, la viabilidad de los cardiomiocitos expuestos a peróxido (barras oscuras) disminuye cuando son incubados con FK866 1 y 10  $\mu\text{M}$ , y se recupera a los valores normales cuando es co-incubado con NMN en ambos casos. Además, se observa que en los controles sin peróxido (barras claras), los estímulos con FK866, NMN o ambos, no producen cambios en la viabilidad de los cardiomiocitos (N=3).



**Figura 11. Rescate de los niveles de NAD<sup>+</sup> recupera la supervivencia a peróxido de cardiomiocitos tratados con FK866.** Cuantificación del porcentaje de viabilidad de cardiomiocitos incubados con FK866 1 y 10 μM, co-incubados con NMN durante 48 h y estimulados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM durante 24 h (N=3). Los datos corresponden al promedio ± SEM con análisis mediante ANOVA de una vía para cada grupo de datos, con post-test de Dunnett (sobre las barras) y de Bonferroni (sobre las líneas). \*p<0,05 y \*\*p<0,01 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

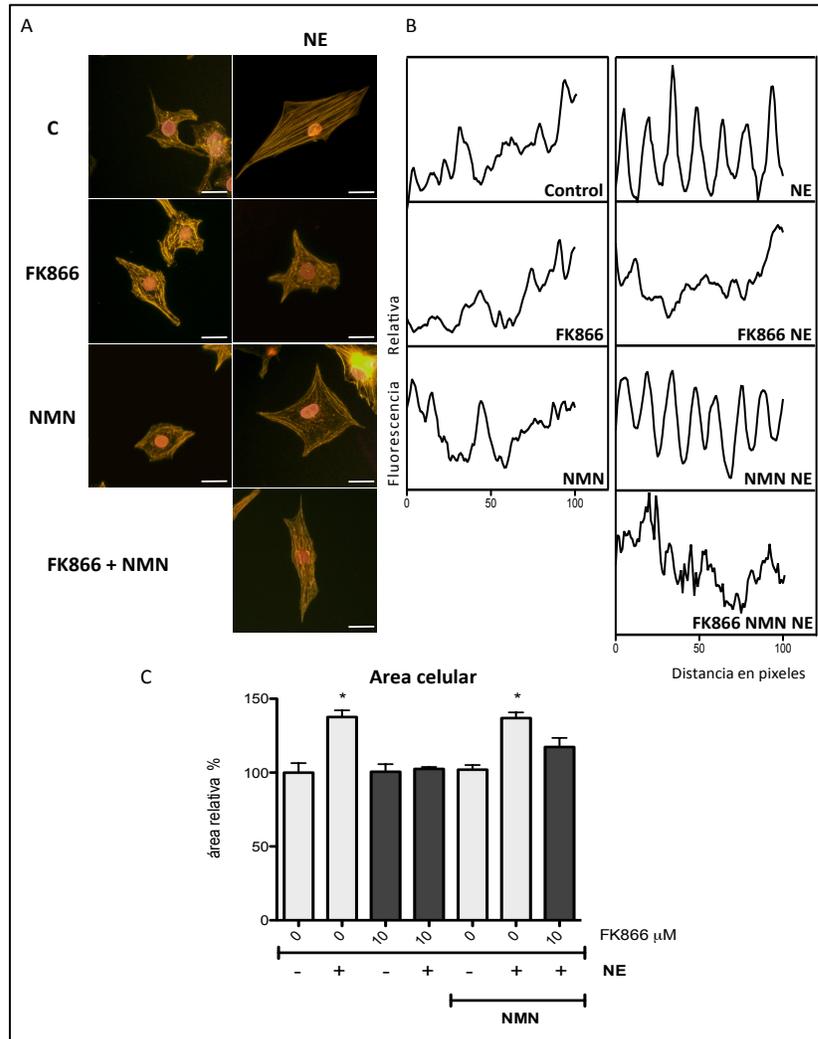
*c). Recuperación de los niveles de NAD<sup>+</sup> en cardiomiocitos tratados con FK866, y su efecto en la respuesta hipertrófica a NE.*

Cardiomiocitos tratados con FK866 1 o 10 μM para inhibir Nampt y con NMN para restablecer la producción de NAD<sup>+</sup>, se estimularon con NE para inducir hipertrofia. Estos estímulos se realizaron individualmente y en conjunto, durante 48 h de exposición. Se evaluaron el área celular y la sarcomerización mediante microscopía, como se realizó anteriormente en el objetivo 3.

En la **figura 12A** se presentan imágenes de cardiomiocitos marcados con faloidina-rodamina, representativas de las utilizadas para la cuantificación del área celular. Se puede observar el aumento de tamaño y la organización de los sarcómeros por efecto de la NE, y la ausencia de esta respuesta cuando los cardiomiocitos se incubaron con FK866, como se había presentado en el objetivo 3. Al rescatar los niveles de  $\text{NAD}^+$ , mediante la adición de NMN, las células con NE y FK866 no presentaron recuperación del fenotipo hipertrofiado.

En la **figura 12B** se muestran los perfiles de fluorescencia, que permiten establecer la presencia de estructuras sarcoméricas, características de la respuesta hipertrófica. Se observó un patrón de sarcomerización en los cardiomiocitos estimulados con NE, y la ausencia de esta respuesta en las células tratadas con FK866, incluso cuando éstas son co-estimuladas con NMN.

En la **figura 12C** se presenta el promedio de la cuantificación del área de al menos 100 células por condición en cada experimento. Se puede observar que el área promedio en las células control aumentó en respuesta a NE, y que este aumento de tamaño no ocurrió en presencia de FK866, aún cuando se rescataron los niveles de  $\text{NAD}^+$  con NMN. Además, el tratamiento con NMN por sí solo tampoco produjo ningún cambio en el área celular o en la respuesta hipertrófica a NE (N=3).



**Figura 12. Restitución de los niveles de  $\text{NAD}^+$  no recuperan la respuesta hipertrófica a NE en cardiomiocitos tratados con FK866.** Cardiomiocitos tratados con FK866 10  $\mu\text{M}$  y NMN 1 mM se estimularon con NE 10  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Se marcaron las fibras de actina con faloidina-rodamina (amarillo) y los núcleos con Hoechst (rojo). A) Imágenes representativas por microscopía de epifluorescencia. Escala gráfica 10  $\mu\text{m}$ . B) Perfil de fluorescencia lineal relativa, trazada sobre una fibra de actina en cada imagen representativa. C) Cuantificación del área celular promedio de al menos 100 cardiomiocitos por condición en cada experimento. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM con análisis mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnett. \* $p < 0,05$  vs control.

## 6. DISCUSIÓN.

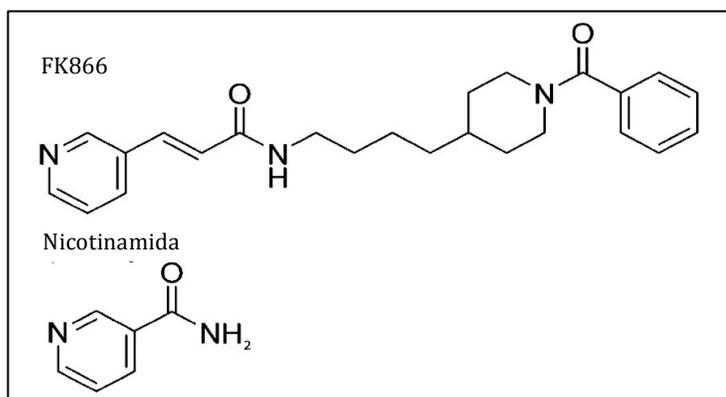
NAD<sup>+</sup> es una molécula clásicamente descrita como aceptor de electrones de enzimas que catalizan la oxidación de sustratos en el metabolismo energético. Como se descubrió recientemente, NAD<sup>+</sup> es también sustrato limitante de enzimas que regulan el envejecimiento (Sirtuinas), muerte celular por estrés oxidativo (PARP-1) y movilización de Ca<sup>+2</sup> (CD38) (Ying 2008). Además, diversos estudios muestran alteraciones en los niveles de NAD<sup>+</sup> y Nampt en patologías como obesidad y síndrome metabólico (Cantó et al. 2012a), enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Giblin et al. 2014) y presbiacusia (Kim et al. 2014), daño cerebral agudo (Owens et al. 2013), cáncer (Shackelford et al. 2013), trastornos mitocondriales (Cerutti et al. 2014; Gomes et al. 2013), enfermedades inflamatorias (Esposito et al. 2012) y cardiovasculares (Pillai et al. 2010).

Los estudios que han abordado el rol de NAD<sup>+</sup> en el organismo y a nivel celular, han utilizado diferentes estrategias para manipular las concentraciones de NAD<sup>+</sup> y así poder observar sus efectos. En estos trabajos los niveles de NAD<sup>+</sup> se incrementaron mediante el suplemento de sustratos de la vía de rescate como nicotinamida, ácido nicotínico, nicotinamida ribósido y nicotinamida mono nucleótido (Cantó et al. 2012b), también se sobreexpresó Nampt en líneas celulares (Yang et al. 2007) y en ratones transgénicos (Hsu et al. 2009b). Otra forma de aumentar el NAD<sup>+</sup> intracelular fue modulando su gasto por enzimas consumidoras de NAD<sup>+</sup> como son Sirtuinas, PARPs y CD38 (Houtkooper et al. 2010). Por último, se adicionó NAD<sup>+</sup> directamente, logrando un aumento intracelular de sus niveles gracias al hemicanal CX43 que permite su entrada a las células (Bruzzone et al. 2001).

Por otra parte, la disminución de NAD<sup>+</sup> no está descrita extensamente en la literatura, y se logró mediante ARN pequeño de interferencia contra Nampt en líneas celulares, y aumentando su consumo principalmente por sobreexpresión o activación de PARPs. Otra estrategia para disminuir NAD<sup>+</sup> es el uso de inhibidores farmacológicos de Nampt, como FK866 utilizado en este trabajo.

## 6.1. FK866.

En 1972 se intentó por primera vez inhibir Nampt mediante el uso de análogos de nicotinamida (Dietrich et al. 1972). Años más tarde se describió un inhibidor eficiente, capaz de disminuir la producción de  $\text{NAD}^+$  actuando a bajas concentraciones. Este inhibidor llamado FK866 (también WK175 y APO866 en otros estudios) mostró una alta actividad anticancerígena en estudios pre-clínicos con células derivadas de leucemias y tumores sólidos, y en numerosos xenoinjertos en ratones y ratas. FK866 actúa específicamente sobre Nampt como inhibidor competitivo, con una afinidad por el sitio activo incluso mayor que la nicotinamida, sustrato natural de la enzima (Kim et al. 2006) (*Figura 13*).



**Figura 13. Estructura de FK866 y Nicotinamida.** FK866 compite con nicotinamida por el sitio activo de la enzima Nampt. Todas las interacciones de Nampt con FK866 son contactos hidrofóbicos, sugiriendo que es la forma molecular antes que los grupos funcionales lo que le otorga efectividad como inhibidor (adaptado de Kim et al. 2006).

FK866 también ha mostrado un importante rol terapéutico en enfermedades inflamatorias. Se han descrito mejoras en modelos animales de encefalitis autoinmune, artritis reumatoide, sepsis y daño en la médula espinal (Bruzzone et al. 2009; Esposito et al. 2012). Sus efectos son de gran magnitud, comparables a antiinflamatorios de alta potencia, como etanercept, que son utilizados en enfermedades inflamatorias graves.

Actualmente, FK866 se encuentra en estudios fase II para diversos tipos de tumores. Además se están desarrollando otros inhibidores con el fin de ser utilizados como fármacos anticancerígenos y antiinflamatorios (Galli et al. 2013).

Aunque los modelos en que se ha utilizado FK866 son en su mayoría líneas celulares tumorales (Shackelford et al. 2013), existen algunos reportes en que se ha probado en otros tipos celulares, como hepatocitos primarios (Ramsey et al. 2009) y línea celular de riñón embrionario (HEK293) (Yang et al. 2007). En este trabajo se utilizó FK866 por primera vez en cardiomiocitos.

Nuestros resultados muestran que este inhibidor es altamente efectivo en la reducción de  $\text{NAD}^+$  intracelular, alcanzando una disminución de un 70%, y su efecto muestra ser directamente proporcional a la concentración utilizada. Esta disminución de  $\text{NAD}^+$  es mucho mayor que la alcanzada por el grupo de Chiao-Po Hsu (Hsu et al. 2009b). Ellos utilizaron un RNA interferente contra Nampt en cardiomiocitos, alcanzando una reducción de 33% de  $\text{NAD}^+$  respecto al valor control, aún cuando el interferente logró una caída de aproximadamente un 70% en la expresión de Nampt.

Respecto a los niveles de NADH se observó una disminución de aproximadamente un 30%, que no varió al cambiar la concentración ni el tiempo de exposición de FK866. Este resultado sugiere que el cardiomiocito se adapta para mantener el nivel de NADH estable. Los niveles de NADH pueden ser regulados por la conversión piruvato-lactato catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa, reacción que es reversible según la relación de concentraciones de sustratos y productos, además de la actividad de la ubiquinona oxidoreductasa y otras deshidrogenasas. Además, como la membrana mitocondrial interna es impermeable a NADH, los equivalentes reducidos de NADH citosólico pueden ser trasladados a la mitocondria por los sistemas de lanzadera malato-aspartato y glicerol 3-fosfato (McKenna et al. 2006).

Dentro del objetivo 1 también se evaluó el efecto de la disminución de  $\text{NAD}^+$  en la viabilidad de los cardiomiocitos y se

encontró que no hay cambios en la sobrevivencia luego de la exposición a FK866. En varias líneas celulares cancerígenas la disminución de  $\text{NAD}^+$  por FK866, estimula vías proapoptóticas, incluyendo la relocalización de AIF desde la membrana mitocondrial externa hacia el núcleo (Cea et al. 2012; Wosikowski et al. 2002; Hasmann et al. 2003) y autofagia en células de neuroblastoma (Billington et al. 2008). También se ha reportado que en otras líneas celulares no cancerígenas como HEK293 de riñón, no produce apoptosis (Yang et al. 2007). Si bien los cardiomiocitos se asemejan más a las células cancerígenas en su alto consumo de  $\text{NAD}^+$  por ser metabólicamente muy activas, los cardiomiocitos son también altamente resistentes a la muerte. Estas células son capaces de adaptar su metabolismo a cambios en los sustratos y cuentan con sistemas represores de apoptosis como FAT10 (Peng et al. 2013), miembros de la familia de inhibidores de apoptosis (IAPs) como survivina y XIAP (Schrickel et al. 2012), y el represor de apoptosis con dominio reclutador de caspasas (ARC) que se expresa exclusivamente en músculo esquelético y cardíaco (Koseki et al. 1998). Además de esto, los cardiomiocitos tienen muy disminuidos los niveles del factor activador de proteasa apoptótica-1, Apaf-1 (Potts et al. 2005), lo cual las convierte en células con la apoptosis en extremo regulada.

## **6.2. $\text{NAD}^+$ y metabolismo mitocondrial.**

El principal sustrato para la cadena respiratoria es NADH, y es suministrado por el metabolismo de ácidos grasos, glucosa, y aminoácidos, teniendo como producto final ATP (Brown 1992). El ATP a su vez es utilizado en numerosos procesos celulares como la síntesis de proteínas, la mantención del potencial de membrana celular y el volumen celular por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , el movimiento de motores celulares por la ATPasa actina-miosina, y la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa, siendo esta última la mayor consumidora de ATP en el corazón (Clausen et al. 1991).

La regulación de la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP es compleja e involucra numerosos factores, entre los cuales destacan la demanda energética de la célula y la disponibilidad de sustratos como NADH y oxígeno (Brown 1992). Tomando en cuenta lo anterior, no es

sorprendente que nuestros resultados muestren que la disminución de  $\text{NAD}^+$ , y por consecuencia  $\text{NADH}$ , desfavorezca el metabolismo mitocondrial. Como respuesta a la disminución de  $\text{NAD}^+$ , observamos un descenso tanto del consumo de oxígeno como la producción de ATP, y los niveles de ROS, acompañado de una mantención del potencial mitocondrial y la masa mitocondrial. Esta disminución en la producción de ATP sin pérdida de la integridad mitocondrial sugiere que la falta de oxidación o disponibilidad de sustrato sería responsable del descenso del metabolismo mitocondrial (Brand et al 2011). La mantención del potencial de membrana mitocondrial, además concuerda con que la viabilidad permanezca invariable, siendo la disrupción de este potencial el principal accionante de la activación de la vía intrínseca de apoptosis (Wadia et al. 1998).

### **6.3. $\text{NAD}^+$ y la respuesta adaptativa del cardiomiocito.**

Las células cardiacas sufren numerosas alteraciones en respuesta a estímulos estresores tanto fisiológicos como patológicos que evidencian en términos de remodelado ventricular. Cuando estas alteraciones son causadas por estrés fisiológico, como embarazo o ejercicio, son consideradas adaptativas y reversibles, mientras que los cambios producidos por estrés patofisiológico como infarto al miocardio, sobrecarga de presión, infecciones y agentes cardiotóxicos, se consideran como mal-adaptativas y dañinas. Aunque en un principio el remodelado fisiológico y patológico tienen características similares como la hipertrofia del cardiomiocito y la liberación de factores de crecimiento, las vías de señalización siguen diferentes patrones, derivando en una transición desde un mecanismo protector hacia uno perjudicial (Haghikia et al. 2014).

En este estudio analizamos tres tipos de respuesta adaptativa: respuesta de supervivencia a peróxido, activación de la vía clásica de señalización en respuesta a insulina y la respuesta hipertrófica a NE.

#### **6.4. NAD<sup>+</sup> y vía de señalización de insulina.**

La vía de señalización de insulina regula numerosos aspectos de la fisiología celular, incluyendo la captación de glucosa, su utilización, y el crecimiento celular. Además de esto, cumple el rol de coordinar la detección de la disponibilidad de nutrientes con la activación de procesos catabólicos, y por el contrario, en la ausencia de sustrato, mejorar la eficiencia y economía en los procesos energéticos (DeBosch et al. 2008). La glucosa es un sustrato importante para el corazón porque, a pesar de generar menos ATP por molécula, es más eficiente en términos de consumo de oxígeno y generación de NADH, en comparación con ácidos grasos. Además, tiene un rol anaplerótico, por ejemplo, provee oxaloacetato que es un intermediario necesario en el ciclo de Krebs (Paternostro et al. 1999).

Nuestros resultados muestran que la disminución de NAD<sup>+</sup> produce una desensibilización de la vía de señalización en respuesta a insulina. Observamos que aún cuando la fosforilación en Tyr1150/1151 del receptor de insulina ocurre de manera normal, la posterior fosforilación de Akt en Ser 473 se encuentra disminuida respecto al control.

La actividad de Akt es regulada por varios factores: SUMOilación (De la Cruz-Herrera et al. 2014), ubiquitinación (Yang et al. 2009), acetilación (Li et al. 2013) y fosforilación (Liao et al. 2010). La activación completa de Akt es un proceso de varias etapas, de las cuales la última consiste en la fosforilación de Thr308 y Ser473 (Liao et al. 2010). La fosforilación en Ser473, que se evaluó en este trabajo, requiere la unión de Akt a fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), que promueve su localización en membrana y fosforilación, la cual es realizada por la proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositol (PDK1).

Recientemente, se ha descrito que tanto Akt como PDK1 son acetiladas en residuos de lisina de su dominio con homología a pleckstrina (de unión a PIP<sub>3</sub>), previniendo su unión a membrana y consecuente activación. Estos residuos son blanco de la desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, SIRT1. En ese estudio, la sobreexpresión de

SIRT1 produjo una gran disminución de la acetilación de Akt, y un aumento en su fosforilación y actividad (Li et al. 2013). De lo anterior, nuestros resultados sugieren que la disminución de  $\text{NAD}^+$  por FK866 podría afectar la actividad de insulina sobre la activación de Akt, mediante una disminución de la actividad desacetilasa de SIRT1-dependiente de  $\text{NAD}^+$ .

En otro estudio se observó que la resistencia a la insulina en el corazón de ratones obesos está asociada a un aumento en la acetilación y una disminuida fosforilación de Akt, atribuida a una disminución en la expresión de SIRT3 (Alrob et al. 2014). Además, en ratones transgénicos con el fenotipo cardíaco SIRT-KO se reportó un fenotipo concordante con ratones deficientes de Akt, consistente en masa cardíaca disminuida, menor tamaño de los cardiomiocitos, aumento en la acetilación y menor fosforilación de Akt y GSK-3 $\beta$  (Sundaresan et al. 2011).

Nuestros resultados también concuerdan con la asociación que se ha reportado entre la disminución de los niveles de  $\text{NAD}^+$  y la actividad de Sirtuinas con sensibilidad a daño cardíaco (Yamamoto et al. 2011). Los múltiples sustratos de Akt influyen cada aspecto de las funciones celulares, incluyendo tanto el crecimiento, la supervivencia y proliferación celular, así como también el metabolismo, la captación de glucosa, la expresión génica y la comunicación célula-célula mediante la producción de factores autocrinos y paracrinos (Sussman et al. 2011). En la misma línea, la capacidad de capturar glucosa en respuesta a insulina está disminuida en el corazón hipertrofiado (Paternostro et al. 1999). La disminución en la utilización de glucosa como sustrato energético y la menor activación de Akt dependiente de insulina en el miocardio están asociados a factores de riesgo cardiovascular como diabetes, hipertensión arterial y arteriopatía coronaria (Sussman et al. 2011).

## **6.5. $\text{NAD}^+$ y respuesta de supervivencia al $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

Las ROS, según su cantidad y tipo, han mostrado causar múltiples cambios en la estructura y función celular de los cardiomiocitos (Sawyer et al. 2002). Por ejemplo, un aumento moderado de ROS causa

hipertrofia en cardiomiocitos de rata neonata, mientras que un aumento mayor produce apoptosis (Siwik et al. 1999) y necrosis (Chen et al. 2014).

Las ROS actúan como moléculas mensajeras que activan de forma diferencial múltiples vías de señalización de quinasas en respuesta a estímulos como estrés mecánico, citoquinas inflamatorias, estímulos neurohumorales (Kwon 2003), e isquemia reperusión entre otros (Tanaka et al. 2001).

Entre las vías que son activadas por aumentos importantes de los niveles de ROS (causales de muerte celular), se encuentran dos sub-familias de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) sensibles al estrés, las quinasas c-Jun N-terminales (JNKs) y p38-MAPK (Sugden et al. 1998). También activan a Akt (Wang et al. 2007), a PARP-1 (Pacher et al. 2007) y la autofagia, que en conjunto tienen un efecto cito-protector.

Al poner a prueba esta respuesta cito-protectora en cardiomiocitos con bajos niveles de  $\text{NAD}^+$  por tratamiento con FK866, pudimos observar una disminución significativa de la supervivencia frente a un estímulo con peróxido 100  $\mu\text{M}$ , que se ha reportado produce apoptosis y necrosis en cardiomiocitos (Kwon 2003). Además, la viabilidad celular vuelve a sus niveles normales cuando se rescata la síntesis de  $\text{NAD}^+$  mediante el suplemento de NMN.

Este resultado se corresponde con trabajos que relacionan la disminución de  $\text{NAD}^+$  con la inhibición de flujo autofágico (Hsu et al. 2009b). La autofagia es necesaria para el suministro de nutrientes y la eliminación de las moléculas dañadas por el estrés oxidativo (Chen et al. 2014), por lo que su inhibición contribuye a la muerte celular.

En segundo lugar, se ha reportado que en condiciones de estrés oxidativo ocurre la activación de SIRT1-dependiente de  $\text{NAD}^+$ , tanto por fosforilación por parte de JNK1 como por SUMOilación. La actividad de SIRT1 a su vez produce la desacetilación de proteínas citosólicas involucradas en cardioprotección (Nadtochiy et al. 2011). Además, la

sobreexpresión de SIRT1 aumenta la expresión de antioxidantes como manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), tioredoxina y catalasa (Yamamoto et al. 2011). Estos efectos protectores de SIRT1, activados por estrés oxidativo, se ven afectados por la disminución de  $\text{NAD}^+$  ya que es un metabolito limitante en su actividad. De forma similar, el daño en el ADN producto del estrés oxidativo activa PARP-1, la cual consume grandes cantidades de  $\text{NAD}^+$ , contribuyendo a su disminución (Pacher et al. 2007).

En tercer lugar, la activación de Akt es un punto de convergencia en la activación de agentes cardioprotectores como Hsp20 (Fan et al. 2009) y el bloqueo de la función de proteínas pro-apoptóticas (Sussman et al. 2011; DeBosch et al. 2006). Como se mostró en este trabajo, la activación de Akt se encuentra disminuída en condiciones de bajos niveles de  $\text{NAD}^+$  celular.

Finalmente los mecanismos citoprotectores frente al estrés por peróxido son principalmente reguladores de la transcripción y síntesis de proteínas. Ambos procesos que dependen de la disponibilidad de ATP, cuyos niveles se encuentran disminuidos por la falta  $\text{NAD}^+$ .

Este resultado además complementa la observación anterior en que los niveles basales de ROS disminuían por efecto de la caída en los niveles de  $\text{NAD}^+$ . Esto sugiere fuertemente que esta disminución de las ROS basales se debe a la menor producción de éstos por la mitocondria antes que a la mayor actividad o presencia de sistemas antioxidantes.

En resumen, la presencia de  $\text{NAD}^+$  en sus niveles normales otorga una ventaja adaptativa frente al estímulo de muerte por peróxido, ya que afecta la señalización de las vías de supervivencia como SIRT1 y Akt, procesos claves de la respuesta propiamente tal como la eliminación de moléculas dañadas mediante autofagia, y la fuente de energía para ejecutar todas estas funciones.

## 6.6. NAD<sup>+</sup> y respuesta hipertrófica a NE.

La hipertrofia cardiaca es una respuesta compleja de crecimiento de los cardiomiocitos, en la cual sufren un remodelado estructural, funcional y de expresión génica, en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y patológicos. La hipertrofia es una respuesta adaptativa del corazón al aumento de la carga del trabajo, que le permite aumentar el gasto cardiaco (Zhu et al. 2009) y así mantener su función ante el aumento de la demanda. Sin embargo, existe una transición temporal bajo condiciones de estimulación crónica, en que estos estímulos bio-mecánicos activan vías de señalización que llevan a la disfunción del músculo cardiaco, la pérdida de cardiomiocitos, fibrosis y finalmente IC congestiva (Chien 1999; Hirota et al. 1999).

Ambos tipos de hipertrofia se diferencian claramente en la alteración de la función cardiaca, siendo la hipertrofia fisiológica caracterizada por una función contráctil normal o aumentada, mientras que la hipertrofia patológica presenta una contractibilidad disminuida (Jianglong et al. 2012). A nivel celular, ambos tipos de hipertrofia se asemejan en el aumento del volumen celular, el contenido de proteínas contráctiles y organización de los sarcómeros. Sin embargo, la hipertrofia patológica además presenta fibrosis intersticial, apoptosis de los cardiomiocitos, expresión de genes fetales, disminución de la oxidación de ácidos grasos e insuficiente producción de ATP (Abel et al. 2011).

En este trabajo analizamos la hipertrofia inducida por NE, la cual corresponde al tipo de estímulo patológico. La NE actúa mediante vías de señalización que incluyen el aumento en los niveles de ROS (Sawyer et al. 2002) y la activación de la proteína fosfatasa activada por Ca<sup>2+</sup>, calcineurina (Pennanen et al. 2014).

Nuestros resultados muestran que los cardiomiocitos tratados con FK866 no presentan aumento de área celular característico de la respuesta hipertrófica, esperado frente a un estímulo con NE. Sorprendentemente, al rescatar la síntesis de NAD<sup>+</sup> mediante la adición de NMN no se recupera la respuesta hipertrófica normal a NE. Este resultado sugiere que el efecto anti-hipertrófico que ejerce FK866 es

mediante una vía distinta a los efectos en la disminución de  $\text{NAD}^+$ . Los mecanismos por los cuales FK866 podría afectar esta respuesta son mediante la inhibición directa de alguna vía de señalización o molécula efectora involucrada en esta respuesta, o indirectamente por la acumulación de nicotinamida, dada por la inhibición de Nampt para la cual es sustrato.

Nuestros datos sugieren que el efecto de FK866 sobre la respuesta a NE puede estar mediado por la inhibición de la ADP ribosil ciclasa CD38. CD38 es una proteína de membrana, la principal ADP-ribosil ciclasa en mamíferos, que cataliza la ciclación de  $\text{NAD}^+$  a adenosina difosfato ribosa cíclica (cADRP) y es inhibida por nicotinamida (Wei et al. 2014). Se ha reportado su presencia en el corazón (Wei et al. 2012) y que su activación por estímulos extracelulares produce la liberación o entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante la actividad de cADRP como segundo mensajero. La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es parte de la vía de señalización en respuesta a NE mediante la activación a la fosfatasa calcineurina, implicada en el desarrollo de la hipertrofia (Pennanen et al. 2014).

Si bien los mecanismos de señalización de cADRP aún no están completamente dilucidados, sí se ha reportado que participa en la respuesta hipertrófica a angiotensina II (Ang II). En esta vía de señalización se genera un aumento bifásico de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que incluye un aumento rápido y transitorio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  vía receptor de inositol trisfosfato (IP3) y un aumento sostenido por activación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y la apertura del receptor de rianodina (Gul et al. 2008). En su reporte Gul et al. utilizaron un antagonista de cADRP, el cual inhibió la respuesta hipertrófica a Ang II incluyendo la actividad de calcineurina, la translocación hacia el núcleo del factor nuclear de células T activadas 3 (NFAT3), la expresión del factor de crecimiento transformante beta1 (TGF- $\beta$ 1) y la incorporación de leucina tritiada en cardiomiocitos. Como NE, la Ang II también es un estímulo que genera hipertrofia de tipo patológica y se asemeja en las vías de señalización que median esta respuesta. Esto sugiere que de la misma forma en que la inhibición de la señalización por cADRP inhibe la hipertrofia por Ang II, la inhibición de

CD38, y por tanto de la síntesis de cADRP, por nicotinamida podría estar inhibiendo la hipertrofia por NE.

Aunque la ausencia de la respuesta hipertrófica a un estímulo patológico como NE podría parecer un efecto favorable, es importante recalcar que inicialmente la hipertrofia es beneficiosa ya que mejora o mantiene la función cardíaca en condiciones de mayor demanda. Las alteraciones perjudiciales en la matriz extracelular, el metabolismo, expresión genética y apoptosis surgen frente a una estimulación crónica, que deriva en este daño estructural y funcional (Bernardo et al. 2010).

## **7. PERSPECTIVAS.**

La manipulación de las concentraciones intracelulares de  $\text{NAD}^+$  se ha transformado en una herramienta ampliamente utilizada en modelos patológicos con fines terapéuticos.

Por un lado, el aumento en los niveles de  $\text{NAD}^+$  ha mostrado mejoras en anormalidades metabólicas por dieta alta en grasas (Cantó et al. 2012) y envejecimiento (Yoshino et al. 2011), hipertrofia patológica (Pillai et al., 2010), modelos de enfermedades mitocondriales (Cerutti et al. 2014) y enfermedades degenerativas (Koltai et al. 2010). Por el contrario, la disminución en los niveles de  $\text{NAD}^+$  se ha utilizado como estrategia para inducir apoptosis en células tumorales (Shackelford et al. 2013), modular la respuesta inmune en enfermedades como artritis (Busso et al. 2008), endotoxemia (Liu et al. 2013), lesión en la médula espinal (Esposito et al. 2012) y encefalitis autoinmune (Bruzzone et al. 2009).

Por lo anterior es esencial dilucidar el rol de  $\text{NAD}^+$  en cada una de estas patologías y los efectos que puede conllevar manipular sus concentraciones en los distintos tipos celulares.

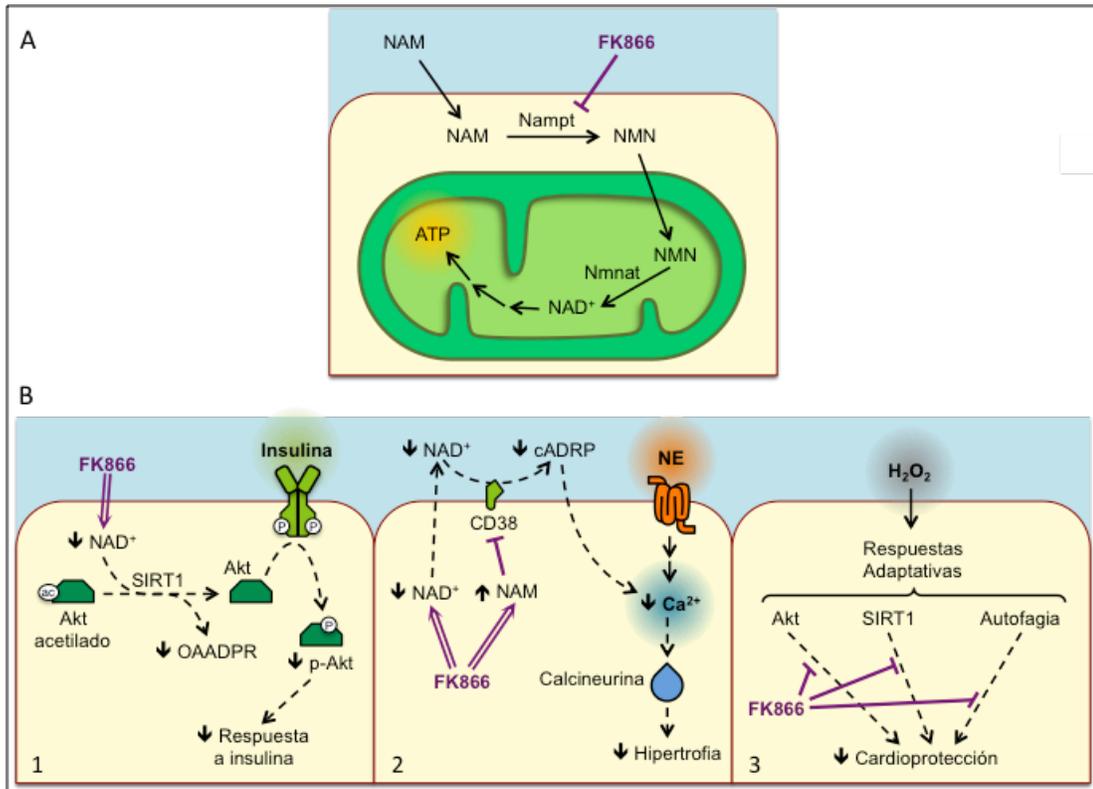
Este trabajo proporciona evidencias de los efectos perjudiciales que tiene la disminución de  $\text{NAD}^+$  en la respuesta adaptativa de los cardiomiocitos y en su metabolismo basal. Experimentos

complementarios podrían profundizar los hallazgos de este trabajo y resolver los mecanismos por los cuales  $\text{NAD}^+$  participa en la supervivencia de los cardiomiocitos a peróxido y en la señalización en respuesta a insulina. En esta última también queda por determinar como se ven afectados los efectores río debajo de Akt y si es posible recuperar su actividad mediante el rescate con NMN.

Además, por los efectos de FK866 observados en la respuesta a NE, este trabajo se pone en evidencia que la inhibición de Nampt puede traer otras consecuencias, además de disminuir los niveles de  $\text{NAD}^+$ . Estas serían la acumulación de nicotinamida y la depleción de NMN, que a su vez podrían causar otros efectos, marcando así una diferencia entre los estudios que, para manipular los niveles de  $\text{NAD}^+$ , afectan la vía de síntesis y los que afectan su consumo.

La dualidad de la manipulación de  $\text{NAD}^+$  se ve reflejada en un estudio en ratas a las que se les administró LPS en conjunto con FK866, para evaluar su capacidad antiinflamatoria en un intento por aminorar el daño cardíaco por endotoxemia. Si bien la disminución de  $\text{NAD}^+$  fue efectiva en disminuir la inflamación, también causó un aumento en la muerte de los cardiomiocitos, lo cual finalmente no mejoró la función cardíaca (Liu et al. 2013).

En la actualidad FK866 está en estudios fase II como anticancerígeno (Holen et al. 2008) y se están desarrollando otros análogos a nicotinamida para inhibir Nampt (Galli et al. 2013) Por otro lado, se están estudiando los efectos anti-envejecimiento y en el metabolismo de la suplementación de NMN en la dieta de ratas con proyecciones de utilizarlo como nutracéutico (Imai, 2010). Por lo anterior es esencial continuar avanzando en el conocimiento de la participación de  $\text{NAD}^+$  en diferentes mecanismos celulares y patologías.



**Figura 14. Modelo propuesto.**

- A) FK866 inhibe la vía de rescate de  $\text{NAD}^+$ , afectando el metabolismo mitocondrial y disminuyendo la síntesis de ATP en el cardiomiocito.
- B) 1. La disminución de  $\text{NAD}^+$  por FK866 reduciría la actividad de SIRT1 (para la cual es sustrato) promoviendo el estado acetilado de Akt, el cual no es susceptible a fosforilación en  $\text{Ser}^{473}$  e impidiendo así su activación en la cascada de señalización en respuesta a insulina. 2. FK866 además aumentaría las concentraciones de NAM. Ambos efectos aportarían en la disminución de la producción de la molécula movilizadora de  $\text{Ca}^{2+}$ , cADPR, la cual se ha reportado participa en el desarrollo de hipertrofia por Ang II, y que, nosotros postulamos, media la respuesta hipertrófica por NE. 3. La disminución de  $\text{NAD}^+$  por FK866 aumenta la sensibilidad a la muerte por  $\text{H}_2\text{O}_2$  del cardiomiocito. Esto puede deberse a la disminución en la activación de Akt, desde la cual divergen diferentes vías para la protección frente a este tipo de estrés. Además la disminución de  $\text{NAD}^+$  reduciría la actividad de SIRT1, la cual activa factores de transcripción que inducen la expresión de enzimas responsables de la defensa antioxidante. Finalmente la disminución de  $\text{NAD}^+$  afectaría el flujo autofágico (responsable de la eliminación de moléculas dañadas) resultando en una cardioprotección menor.

## 8. CONCLUSIONES.

- La inhibición de Nampt por FK866 es una forma eficiente de disminuir los niveles de  $\text{NAD}^+$  en los cardiomiocitos. Este es el primer reporte en que se utiliza este inhibidor en cultivo primario de cardiomiocitos.
- La disminución de  $\text{NAD}^+$  afecta negativamente el metabolismo mitocondrial de los cardiomiocitos, disminuyendo el consumo de oxígeno, la producción de ATP y generación de ROS. Estos efectos se presentan sin alteraciones en la masa mitocondrial total ni el potencial de membrana, resultados que dan cuenta de la mantención de la integridad de la membrana mitocondrial.
- La disminución de  $\text{NAD}^+$  no afecta la viabilidad de los cardiomiocitos. En conjunto estos datos evidencian la adaptabilidad metabólica del cardiomiocito frente a la disminución de  $\text{NAD}^+$  por FK866.
- $\text{NAD}^+$  es un metabolito necesario para activación de Akt en la vía de señalización en respuesta a insulina, pero no para la activación del receptor de insulina en el cardiomiocito, lo cual da cuenta de la participación de  $\text{NAD}^+$  en mecanismos regulatorios de la señalización dependiente de Akt.
- $\text{NAD}^+$  es necesario para el desarrollo de la respuesta de sobrevida a peróxido en el cardiomiocito.
- La respuesta hipertrófica a NE, determinada por el aumento del área celular y presencia de patrones de sarcomerización, es inhibida por FK866 pero no se recupera al restituir los niveles de  $\text{NAD}^+$  por adición de NMN. Esto señala que FK866 afecta el desarrollo de la hipertrofia cardíaca mediante una vía diferente a la disminución de  $\text{NAD}^+$ .
- $\text{NAD}^+$  es un metabolito importante para el metabolismo del cardiomiocito y su plasticidad frente a estímulos fisiológicos y patológicos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

- Abel, E.D. et al., 2011. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research*, 90(2), 234–42.
- Akki, A. et al., 2008. Compensated cardiac hypertrophy is characterised by a decline in palmitate oxidation. *Molecular and cellular biochemistry*, 311(1-2), 215–24.
- Alcendor, R.R. et al., 2004. Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circulation research*, 95(10), 971–80.
- Alcendor, R.R. et al., 2007. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation research*, 100(10), 1512–21.
- Alrob, O.A. et al., 2014. Obesity-induced lysine acetylation increases cardiac fatty acid oxidation and impairs insulin signalling. *Cardiovascular research*, 103(4), 485-97.
- Araya-Maturana, R. et al., 2002. Effects of 4,4-Dimethyl-5,8-dihydroxynaphthalene-1-one and 4,4-Dimethyl-5,8-dihydroxytetralone Derivates on Tumor Cell Respiration. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, 3057–60.
- Ardehali, H. et al., 2005. Cardioprotective role of the mitochondrial ATP-Binding Cassette Protein 1. *Circulation research*, 97(8), 740–42.
- Berenji, K. et al., 2005. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 289, 8–16.
- Berger, F. et al., 2005. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 280(43), 36334–41.
- Bernardo, B.C. et al., 2010. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & therapeutics*, 128(1), 191–227.
- Billington, R.A. et al., 2008. NAD depletion by FK866 induces autophagy. *Autophagy*, 4, 385–87.

- Bittl, J.A. et al., 1987. Rate equation for creatine kinase predicts the in vivo reaction velocity:  $^{31}\text{P}$  NMR surface coil studies in brain, heart, and skeletal muscle of the living rat. *Biochemistry*, 26(19), 6083–90.
- Brand, M.D. et al., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *The Biochemical Journal*, 435(2), 297–312.
- Bravo, R. et al., 2013. Endoplasmic reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. *International review of cell molecular biology*, 301, 215–90.
- Brown, G.C., 1992. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *The Biochemical journal*, 284, 1–13.
- Brownsey, R.W. et al., 1997. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovascular research*, 34(1), 3–24.
- Brownlee, M., 2001. biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813–820.
- Bruzzo, S. et al., 2009. Catastrophic  $\text{NAD}^+$  depletion in activated T lymphocytes through Nampt inhibition reduces demyelination and disability in EAE. *PloS one*, 4(11), e7897.
- Bruzzo, S. et al., 2001. Connexin 43 hemi channels mediate  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated transmembrane  $\text{NAD}^+$  fluxes in intact cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(1), 10–12.
- Bugger, H. et al., 2010. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovascular research*, 85(2), 376–84.
- Busso, N. et al., 2008. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PloS one*, 3(5), e2267.
- Calcraft, P. et al., 2009. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459(7246), 596–600.
- Cantó, C. et al., 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating  $\text{NAD}^+$  metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056–60.
- Cantó, C. et al., 2012a. The  $\text{NAD}^+$  Precursor Nicotinamide Riboside Enhances Oxidative Metabolism and Protects against High-Fat Diet-Induced Obesity. *Cell metabolism*, 15(6), 838–47.
- Cantó, C. et al 2012b. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is  $\text{NAD}^+$ ? *Pharmacological reviews*, 64(1), 166–87.

- Cao, D.J. et al., 2009. Cardiomyocyte Autophagy: Remodeling, Repairing, and Reconstructing the Heart. *Current hypertension reports*, 11(6), 406–11.
- Cea, M. et al., 2012. Targeting NAD<sup>+</sup> salvage pathway induces autophagy in multiple myeloma cells via mTORC1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) inhibition. *Blood*, 120(17), 3519–29.
- Cerutti, R. et al., 2014. NAD<sup>+</sup>-Dependent Activation of Sirt1 Corrects the Phenotype in a Mouse Model of Mitochondrial Disease. *Cell metabolism*, 19(6), 1042–49.
- Chen, C.-Y. et al., 2014. The reduced autophagic response by oxidative stress in angiotensin II-induced hypertrophic H9C2 cells causes more apoptotic cell death. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, (En prensa 2014).
- Chen, D. et al., 2008. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes & development*, 22(13), 1753–7.
- Chien, K.R., 1999. Stress Pathways and Heart Failure. *Cell*, 98, 555–58.
- Chini, E.N., 2009. CD38 as a Regulator of Cellular NAD: A Novel Potential Pharmacological Target for Metabolic Conditions. *Current pharmaceutical design*, 15(1), 57–63.
- Christe, M.E. et al., 1994. Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 26(10), 1371–5
- Clausen, T. et al., 1991. Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiological reviews*, 71(3), 733–74.
- Collins, P. et al., 1972. The management of nicotinamide and nicotinic acid in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 247(3), 778-83.
- Costford, S. et al., 2010. Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *American Journal of physiology Endocrinology and Metabolism*, 298(1), 117-26.
- Covian, R. et al., 2012. Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 303(8), 940–66.
- DeBosch, B. et al., 2006. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *The Journal of biological chemistry*, 281(43), 32841–51.
- DeBosch, B. et al., 2008. Insulin Signaling Pathways and Cardiac Growth. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 44(5), 855–64.

- De la Cruz-Herrera, C.F. et al., 2014. SUMOylation regulates AKT1 activity. *Oncogene*, (En prensa).
- Di-Lisa, F. et al., 2001. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *The Journal of biological chemistry*, 276(4), 2571–5.
- Dietrich, L.S. et al., 1972. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase by pyridine nucleotides. *Biochemistry*, 11(9), 1691–5.
- Dikalov, S., 2011. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free radical biology & medicine*, 51(7), 1289–301.
- Dodd, M.S. et al., 2012. In vivo alterations in cardiac metabolism and function in the spontaneously hypertensive rat heart. *Cardiovascular research*, 95(1), 69–76.
- Doenst, T. et al., 2013. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circulation research*, 113(6), 709–24.
- Dorn, G.W. et al., 2003. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circulation research*, 92(11), 1171–5.
- Esposito, E. et al., 2012. The NAMPT inhibitor FK866 reverts the damage in spinal cord injury. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), e66.
- Fan, G. et al., 2009. Hsp20 Interacting with Phosphorylated Akt Reduces Doxorubicin- Triggered Oxidative Stress and Cardiotoxicity. *Circulation research*, 103(11), 1270–9.
- Feissner, R. et al., 2009. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS. *Frontiers in bioscience*, 14, 1197–218.
- Frey, N. et al., 2004. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*, 109(13), 1580–9.
- Galli, U. et al., 2013. Medicinal chemistry of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 56(16), 6279–96.
- Garten, A. et al., 2009. Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends in endocrinology and metabolism*, 20(3), 130–8.
- Giblin, W. et al., 2014. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends in Genetics*, 30(7), 271–86.

- Gomes, A.P. et al., 2013. Declining NAD<sup>+</sup> Induces a Pseudohypoxic State Disrupting Nuclear-Mitochondrial Communication during Aging. *Cell*, 155(7), 1624–38.
- Gul, R. et al., 2008. A novel signaling pathway of ADP-ribosyl cyclase activation by angiotensin II in adult rat cardiomyocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 295, 77–88.
- Haghikia, A. et al., 2014. STAT3, a key regulator of cell-to-cell communication in the heart. *Cardiovascular research*, 102(2), 281–9.
- Haider, A.W. et al., 1998. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *Journal of the American College of Cardiology*, 32(5), 1454–9.
- Haigis, M.C. et al., 2010. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annual review of pathology*, 5, 253–95.
- Hall, A. et al., 2013. High resolution respirometry analysis of polyethylenimine-mediated mitochondrial energy crisis and cellular stress: Mitochondrial proton leak and inhibition of the electron transport system. *Biochimica et biophysica acta*, 1827(10), 1213–25.
- Hardie, D.G. et al., 2001. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23(12), 1112–9.
- Hasmann, M. et al., 2003. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer research*, 63, 7436–42.
- Hayashida, S. et al., 2010. Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice. *Molecular and cellular biochemistry*, 339, 285–92.
- Hill, J.A., 2011. Autophagy in cardiac plasticity and disease. *Pediatric cardiology*, 32(3), 282–9.
- Hill, J.A. et al., 2008. Cardiac Plasticity. *New England Journal of Medicine*, 358, 1370–80.
- Hirota, H. et al., 1999. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*, 97(2), 189–98.
- Houtkooper, R.H. et al., 2010. The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine reviews*, 31(2), 194–223.

- Hsu, C.P. et al., 2009a. Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD<sup>+</sup> synthesis in cardiac myocytes. *Autophagy*, 5(8), 1229–31.
- Hsu, C.P. et al., 2009b. Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD<sup>+</sup> synthesis in cardiac myocytes. *Circulation research*, 105(5), 481–91
- Hsu, C.P. et al., 2010. Sirt1 Protects the Heart from Ischemia Reperfusion. *Circulation*, 122(21), 2170–82.
- Jewett, M.C. et al., 2009. Continued protein synthesis at low [ATP] and [GTP] enables cell adaptation during energy limitation. *Journal of bacteriology*, 191(3), 1083–91.
- Jianglong, H. et al., 2012. Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets. *Pharmacology & therapeutics*, 135(3), 337–54.
- Kato, T. et al., 2010. Analysis of metabolic remodeling in compensated left ventricular hypertrophy and heart failure. *Circulation. Heart failure*, 3(3), 420–30.
- Kim, H. et al., 2014. NAD<sup>+</sup> Metabolism in Age-Related Hearing Loss. *Ageing and Disease*, 5(2), 150–9.
- Kim, M.K. et al., 2006. Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK866. *Journal of molecular biology*, 362(1), 66–77.
- Kitani, T. et al., 2003. Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor. *FEBS Letters*, 544(1-3), 74–8.
- Knowlton, A.A., 1995. The role of heat shock proteins in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 27(1), 121–31.
- Koltai, E. et al., 2010. Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD<sup>+</sup> and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mechanisms of ageing development*, 131(1), 21–8.
- Koseki, T. et al., 1998. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5156–60.

- Kwon, S., 2003. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(6), 615–21.
- Lee, H.C. et al., 1989. Structural determination of a cyclic metabolite of NAD<sup>+</sup> with intracellular Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity. *The Journal of biological chemistry*, 264(3), 1608–15.
- Li, X.H. et al., 2013. Sirt1 promotes axonogenesis by deacetylation of Akt and inactivation of GSK3. *Molecular neurobiology*, 48(3), 490–9.
- Liao, R., 2002. Cardiac-Specific Overexpression of GLUT1 Prevents the Development of Heart Failure Attributable to Pressure Overload in Mice. *Circulation*, 106(16), 2125–31.
- Liao, Y. et al., 2010. Physiological regulation of Akt activity and stability. *American Journal of Translational Research*, 2(1), 19–42.
- Lips, D., 2003. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *European Heart Journal*, 24(10), 883–96.
- Liu, L. et al., 2013. Distinct effects of Nampt inhibition on mild and severe models of lipopolysaccharide-induced myocardial impairment. *International immunopharmacology*, 17(2), 342–9.
- Lorell, B.H. et al., 2000. Left Ventricular Hypertrophy : Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation*, 102(4), 470–9.
- Manabe, I. et al., 2002. Gene Expression in Fibroblasts and Fibrosis: Involvement in Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*, 91(12), 1103–13.
- Marambio, P. et al., 2010. Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1802(6), 509–18.
- McKenna, M.C. et al., 2006. Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. *Biochemical pharmacology*, 71(4), 399–407.
- Mitchell, S.J. et al., 2014. The SIRT1 Activator SRT1720 Extends Lifespan and Improves Health of Mice Fed a Standard Diet. *Cell reports*, 6(5), 836–43.
- Munoz, J.P. et al., 2010. Iron induces protection and necrosis in cultured cardiomyocytes: Role of reactive oxygen species and nitric oxide. *Free radical biology & medicine*, 48(4), 526–34.

- Nadtochiy, S. et al., 2011. SIRT1-mediated acute cardioprotection. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301(4), 1506–12.
- Nagoshi, T. et al., 2011. Optimization of cardiac metabolism in heart failure. *Current pharmaceutical design*, 17(35), 3846–53.
- Nakagawa, T. et al., 2009. SIRT5 Deacetylates Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 and Regulates the Urea Cycle. *Cell*, 137(3), 560–70.
- Neely, J. et al., 1974. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual review of physiology*, 36, 413–59.
- Neubauer, S., 2007. The Failing Heart - An Engine Out of Fuel. *The New England journal of medicine*, 356(11), 1140–51.
- Olesen, U.H. et al., 2010. Target enzyme mutations are the molecular basis for resistance towards pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase. *BMC cancer*, 10, e677.
- Owens, K. et al., 2013. Mitochondrial dysfunction and NAD<sup>+</sup> metabolism alterations in the pathophysiology of acute brain injury. *Translational stroke research*, 4(6), 618–34.
- Pacher, P. et al., 2007. Role of Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in Cardiovascular Diseases: The Therapeutic Potential of PARP Inhibitors. *Cardiovascular Drug Reviews*, 25(3), 235–60.
- Parra, V. et al., 2008. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovascular research*, 77(2), 387–97.
- Paternostro, G. et al., 1999. Insulin resistance in patients with cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research*, 42(1), 246–53.
- Peng, X. et al., 2013. FAT10 protects cardiac myocytes against apoptosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 59, 1–10.
- Pennanen, C. et al., 2014. Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca<sup>2+</sup>-calcineurin signaling pathway. *Journal of cell science*, 127, 2659–71.
- Pillai, V.B. et al., 2010. Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*, 285(5), 3133–44.
- Pittelli, M. et al., 2011. Pharmacological effects of exogenous NAD on mitochondrial bioenergetics, DNA repair, and apoptosis. *Molecular Pharmacology*, 80(6), 1136–46.

- Potts, M.B. et al., 2005. Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *The Journal of cell biology*, 171(6), 925–30.
- Ramsey, K.M. et al., 2009. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science*, 324(5927), 651–4.
- Revollo, J.R. et al., 2007. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell metabolism*, 6(5), 363–75.
- Revollo, J.R. et al., 2004. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(49), 50754–63.
- Rodgers, J. et al., 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*, 434, 3–8.
- Rongvaux, A. et al., 2003. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 25(7), 683–90.
- Saks, V. et al., 2006. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *The Journal of physiology*, 577(3), 769–77.
- Satoh, A. et al., 2011. Role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging and longevity. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer Berlin Heidelberg. 206, 125–62.
- Sawyer, D.B. et al., 2002. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 34(4), 379–88.
- Schröckel, J.W. et al., 2012. Cardiomyocyte-specific deletion of survivin causes global cardiac conduction defects. *Basic research in cardiology*, 107(6), e299.
- Shackelford, R.E. et al., 2013. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Malignancy: A Review. *Genes & cancer*, 4(11-12), 447–56.
- Siwik, D.A. et al., 1999. Inhibition of Copper-Zinc Superoxide Dismutase Induces Cell Growth, Hypertrophic Phenotype, and Apoptosis in Neonatal Rat Cardiac Myocytes In Vitro. *Circulation Research*, 85(2), 147–53.
- Stein, L.R. et al., 2012. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in endocrinology and metabolism*, 23(9), 420–8.

- Sugden, P.H. et al., 1998. “Stress-Responsive” Mitogen-Activated Protein Kinases (c-Jun N-Terminal Kinases and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases) in the Myocardium. *Circulation Research*, 83(4), 345–52.
- Sundaresan, N.R. et al., 2011. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Science signaling*, 4(182), 46.
- Sussman, M.A. et al., 2011. Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiological reviews*, 91(3), 1023–70.
- Tanaka, K. et al., 2001. Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *Journal of the American College of Cardiology*, 37(2), 676–85.
- Verdejo, H.E. et al., 2012. Mitochondria, Myocardial Remodeling, and Cardiovascular Disease. *Current hypertension reports*, 14(6), 532-9.
- Villena, J. et al., 2008. Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free radical biology & medicine*, 44(6), 1146–60.
- Vliegen, H., 1991. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *European Heart Journal*, 12(4), 488–94.
- Wadia, J.S. et al., 1998. Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by serum and nerve growth factor withdrawal: time course and modification by (-)-deprenyl. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(3), 932–47.
- Wallace, D.C., 2009. Mitochondria, bioenergetics, and the epigenome in eukaryotic and human evolution. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 74, 383–93.
- Wallimann, T. et al., 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *The Biochemical Journal*, 281, 21–40.
- Van Wamel, A.J. et al., 2001. The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Molecular and cellular biochemistry*, 218(1-2), 113–24.

- Wang, Z. et al., 2007. Angiotensin-1 protects H9c2 cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through AKT signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 359(3), 685–90.
- Weber, K.T. et al., 1993. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clinical cardiology*, 16(2), 10–4.
- Wei, W.J. et al., 2014. Roles and mechanisms of the CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway. *World journal of biological chemistry*, 5(1), 58–67.
- Wei, W.J. et al., 2012. Inhibition of cardiomyocytes differentiation of mouse embryonic stem cells by CD38/cADPR/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*, 287(42), 35599–611.
- Wosikowski, K. et al., 2002. WK175, a novel antitumor agent, decreases the intracellular nicotinamide adenine dinucleotide concentration and induces the apoptotic cascade in human leukemia cells. *Cancer research*, 62(4), 1057–62.
- Yamamoto, T. et al., 2011. Protection of the heart against ischemia/reperfusion by silent information regulator 1. *Trends in cardiovascular medicine*, 21(1), 27–32.
- Yamazaki, F. et al., 1985. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical J*, 230, 635–38.
- Yang, H. et al., 2007. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival. *Cell*, 130(6), 1095–107.
- Yang, W.L. et al., 2009. The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science*, 325(5944), 1134–8.
- Ying, W., 2008. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants & redox signaling*, 10(2), 179–206.
- Yoshino, J. et al., 2011. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD<sup>+</sup> intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell metabolism*, 14(4), 528–36.
- Zhabyeyev, P. et al., 2013. Pressure-overload-induced heart failure induces a selective reduction in glucose oxidation at physiological afterload. *Cardiovascular research*, 97(4), 676–85.
- Zhu, H. et al., 2009. Chapter 17. Autophagy in load-induced heart disease. *Methods Enzymology*, Academic Press. 453, 343-63.