

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Policistina-1 regula mitofagia en cardiomiocitos en un mecanismo dependiente de FoxO1

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

ANDREA SOLEDAD RAMÍREZ SAGREDO

Directores de Tesis:

Dres. Sergio Lavandero González y Mario Chiong Lay

Santiago- Chile

Julio 2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado por la candidata

ANDREA SOLEDAD RAMÍREZ SAGREDO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero

Dr. Mario Chiong

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Ramón Rodrigo

Dr. Mauricio Boric

Dr. Rodrigo Alzamora

Dr. Claudio Cabello

Tabla de contenidos:

1. INTRODUCCIÓN	7
POLICISTINA-1:.....	16
POLICISTINA-1 Y CORAZÓN:	17
POLICISTINA-1 Y MITOCONDRIAS:	18
BIOLOGÍA MITOCONDRIAL E IMPORTANCIA EN LA HOMEOSTASIS DEL CARDIOMIOCITO: .	19
EJE PI3K - AKT - FOXO1 COMO REGULADOR DEL METABOLISMO CELULAR:.....	21
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVO GENERAL	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE CARDIOMIOCITOS DE RATA.....	24
SILENCIAMIENTO DE PC-1:	25
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES TOTALES:	26
WESTERN BLOT:.....	26
EXTRACCIÓN DE RNA.	27
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR).....	28
EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL.	30
ESTUDIO DE LA COLOCALIZACIÓN PARKIN-MITOCONDRIA MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.....	30
DETERMINACIÓN DE ÁREA Y PERÍMETRO DEL CARDIOMIOCITO.	30

6. RESULTADOS	32
6.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1. DETERMINAR EN UN MODELO CELULAR KNOCKDOWN POLICISTINA-1 EL ESTADO DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL.	32
6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2. EVALUAR CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA RED MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS CON LA EXPRESIÓN DE POLICISTINA-1 DISMINUIDA.	39
6.3 EVALUAR EN MODELO KNOCKDOWN POLICISTINA-1 LA DESREGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADA A MITOFAGIA PI3K/AKT/FOXO1.....	45
DISCUSIÓN	51
EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE POLICISTINA-1 SOBRE PARÁMETROS FUNCIONALES DEL METABOLISMO OXIDATIVO EN CARDIOMIOCITOS:.....	51
ALTERACIONES EN LA DINÁMICA MITOCONDRIAL INDUCIDA POR LA PÉRDIDA DE LA EXPRESIÓN DE POLICISTINA-1 EN CARDIOMIOCITOS:	52
EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE POLICISTINA-1 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE MITOFAGIA:.....	55
ROL DE LA POLICISTINA-1 EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA AKT-FOXO1:.....	56
8. CONCLUSIONES.....	58
9. REFERENCIAS	59

Tabla de Figuras:

Figura 1. Silenciamiento de policistina-1.....	32
Figura 2. Marcadores de metabolismo oxidativo.....	33
Figura 3. Niveles de expresión de proteínas mitocondriales constitutivas..	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Figura 4. Marcadores de biogénesis mitocondrial.	37
Figura 5. Niveles de expresión de proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial.....	39
Figura 6. Morfología de la red mitocondrial.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Figura 7. Niveles de expresión de proteínas marcadoras de mitofagia.. MARCADOR NO DEFINIDO.	¡ERROR!
Figura 8. Traslocación de parkin hacia la membrana mitocondrial como marcador de mitofagia.....	43
Figura 9. Marcadores de hipertrofia cardíaca.....	45
Figura 10. Niveles de expresión de Akt y FoxO1 y niveles de fosforilación de p- Akt y p-FoxO1.	46
Figura 11. Evaluación del silenciamiento de foxo1.....	47
Figura 12. Evaluación del rescate de la mitofagia a través de la inhibición de FoxO1.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Figura 13. Modelo propuesto. policistina-1 regula mitofagia en cardiomiocitos, a través de un mecanismo dependiente de Akt-FoxO1.....	57

***Dedicada a las mujeres científicas del mundo y a las
niñas que sueñan con serlo***

Esta tesis de Doctorado se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales, dirigido por los Dres. Sergio Lavandero y Mario Chiong, el cual pertenece al Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Esta tesis fue financiada por:

Proyectos Dr. Sergio Lavandero

FONDAP 15130011

FONDECYT 1161156 y 1200490

Proyecto Dr. Mario Chiong

FONDECYT 1180157

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Sergio Lavandero por haber creído en mi, haberme incorporado a su laboratorio y apoyarme con toda su confianza durante este trayecto, para usted nunca serán suficientes las palabras de agradecimiento, ha sido un honor trabajar con usted. Al Dr. Mario Chiong por haber sido el co-director de esta tesis y estar dispuesto siempre a resolver cualquier duda o darme un poco de entendimiento en los momentos más difíciles.

A la comisión evaluadora: Dr. Ramón Rodrigo, Dr. Mauricio Boric, Dr. Rodrigo Alzamora, Dr. Claudio Cabello por estar abiertos a todos los cambios que surgieron en el camino, gracias por su ayuda y consejos.

A mis compañeros del Laboratorio que luego se convirtieron en amigos que siempre llevaré en mi corazón a donde quiera que vaya: Jafet, Valeria, Camila, Mayarling, Ignacio, Pablo Morales, Pablo Sánchez, Matías, Jaime, Sebastián Leiva, Fernanda Sanhueza, Carolina Hernández. Gracias por siempre estar dispuestos a compartir un café y escucharme.

A mi país Venezuela y la Universidad de Los Andes cuna de mi formación como Bióloga. Gracias por darme las herramientas que me permitieron soñar y creer en mi capacidad para comenzar este trayecto.

A mis compadres y amigos Gaby y John, por siempre tener las palabras necesarias y exactas, por su apoyo e incondicionalidad constante, este sueño fue compartido y este logro también les pertenece. Gracias Gabita por embarcarte conmigo en esta aventura y por sostener nuestro anhelo impulsándome a no flaquear, gracias por tu ejemplo de constancia y fuerza.

A mi familia y la familia Súnico Lizcano por ser una fuente de bendiciones y ánimo para mi, por siempre estar allí para recordarme que soy capaz de cualquier cosa que me proponga y por ser mis más fieles animadores.

A mi abuelo Vicente por ser mi inspiración desde que tengo uso de razón, por ser el pilar fundamental de mi carrera científica y por siempre hacerme saber lo orgulloso que está de ser mi abuelo. Te admiro infinitamente abuelito, este logro te pertenece.

A mi mamá, por ser la mujer más fuerte y talentosa que conozco, por enseñarme resiliencia, valentía, determinación y disciplina, herramientas invaluable que me han servido en este transitar. Gracias por tu alegría, por tu amor desbordante y por recordarme siempre que “todo va a estar bien”.

A mi hija Patricia, llegaste en la mitad de este camino, pero desde el primer día te convertiste en mi motor y trajiste bajo el brazo diluvio de logros y satisfacciones. Eres mi motivo principal de lucha por un mundo más igualitario para las mujeres y con igualdad de oportunidades, este triunfo te pertenece hija mía y quiero que siempre te recuerde que “las niñas también pueden”

A mi esposo, amigo y compañero Eugenio, no me alcanzan las palabras para agradecerte tu apoyo durante cada una de las etapas de este doctorado. Me impulsaste a postularme porque creías fielmente en mis capacidades, me acompañaste todas y cada una de las madrugadas de estudio, me apoyaste sin cuestionar nunca cada llegada tarde a casa, cada fin de semana en el laboratorio, cada hora sentada frente al computador y cuando nos convertimos en padres te alineaste conmigo y hombro a hombro lo logramos, aún sabiendo que no sería fácil. Gracias por ser mi norte y cobijar mis miedos impulsándome a continuar,

gracias por cada uno de los sacrificios, no estaría acá en este momento sin mi otra mitad, y esa otra mitad eres tú.

Gracias a todos aquellos que de alguna forma han sido un aporte en este trabajo.

Y sobre todo gracias a la energía divina que mueve el universo.

La presente tesis de Doctorado y colaboraciones paralelas han dado origen a las siguientes actividades:

Presentaciones a congresos:

- **Ramírez-Sagredo A**, Ávalos Y, López-Crisosto C, Ortiz-Quintero J, Pedrozo Z, Chiong M, Lavandero S. Loss of function of polycystin-1 induces metabolic dysfunction and mitochondrial fission in cardiomyocytes. XLII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 2019.
- **Ramírez-Sagredo A**, López-Crisosto C, Ortiz-Quintero J, Pedrozo Z, Ocaranza MP, Chiong M, Lavandero S. Loss of function of polycystin-1 induces mitochondrial fission and increases cardiomyocyte death upon ischemia reperfusion. XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas & International Society for Heart Research, 2018
- **Ramírez-Sagredo A**, Alemán L, Ortiz-Quintero J, Chiong M, Lavandero S. Evaluation of the participation of polycystin-1 in the effects of angiotensin-(1-9) on the death of cardiomyocytes in ischemia /reperfusion model. XL Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM), 2017.

Publicaciones:

- **Ramírez-Sagredo A**, Ramírez-Reyes A, Ocaranza MP, Chiong M, Riquelme JA, Jalil JE, Lavandero S. Antihipertensivos en pacientes con COVID-19. Revista Chilena de Cardiología 39: 66-74, 2020.

- Bejarano J, Rojas A, **Ramírez-Sagredo A**, Riveros A, Morales F, Yvo Flores, Riquelme J, Guzman F, Araya E, Chiong M, Ocaranza MP, Morales Montecinos J, Sanchez G, Lavandero S, Kogan M. Light-induced release of the cardioprotective peptide angiotensin-(1-9) from thermosensitive liposomes with gold nanoclusters. *Journal of Controlled Release* 328: 859-872, 2020.
- **Ramírez-Sagredo A**, Quiroga C, Garrido-Moreno V, López-Crisosto C, Leiva-Navarrete S, Norambuena-Soto I, Ortiz-Quintero J, Parra V, Pedrozo Z, Altamirano F, Chiong M, Lavandero S. Polycystin-1 regulates cardiomyocyte mitophagy. *FASEB Journal* (en prensa, 2021). Doi: 10.1096/fj.202002598R

Otros:

- **Ramírez-Sagredo A**, Villa M, Olivares MJ, Chiong M, Lavandero S. Proyecto Asociativo Regional Región Metropolitana Norte. Explora-ANID. 2019 (Proyecto adjudicado al ACCDiS como unidad ejecutora)
- **Ramírez-Sagredo A**, Villamizar MG, Inostroza M. Proyecto financiado por la Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Universidad de Chile. “I Encuentro de Mujeres en Ciencia, derribando mitos”. 2019

Abreviaciones no estándar:

ADPKD: enfermedad renal poliquística autosómica dominante

ATP5A: subunidad alfa de ATP sintasa F1

CQ: cloroquina

MTCO1: citocromo c oxidasa I codificada mitocondrialmente

NDUFB8: subunidad 8 del subcomplejo beta de NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1

NRVM: miocitos ventriculares de rata neonatal

OXPPOS: fosforilación oxidativa

PC1: policistina-1

SDHB: subunidad B de azufre de hierro del complejo succinato deshidrogenasa

UQCRC2: subunidad 2 del complejo del citocromo b-c1

ANP: Péptido natriurético auricular

Resumen:

Antecedentes: La enfermedad renal poliquística autosomal dominante (ADPKD) es una patología derivada de la mutación del gen *pkd1* de la policistina-1 (PC1). Los pacientes con ADPKD presentan alteraciones metabólicas a nivel celular y la aparición de manifestaciones cardiovasculares en los estadios más tempranos de la enfermedad. En el tejido renal, se ha descrito una desregulación de la la función mitocondrial producto de la alterada expresión de la PC1. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si sucede lo mismo en el corazón y sus consecuencias en la función cardíaca, dada la alta dependencia de este organelo para la generación de energía en este tejido.

Objetivo: Dada la establecida dependencia bioenergética que tiene el corazón de las mitocondrias, se presumió que una alteración morfológica y funcional de las mitocondrias participaría en la patogénesis de esta enfermedad. Este trabajo tuvo por objetivo estudiar si PC1 participa en la regulación del funcionamiento y la conectividad de la red mitocondrial en el cardiomiocito.

Resultados: Los datos muestran que: a) PC1 es necesaria para mantener el estado funcional de la mitocondria así como también la conectividad de la red mitocondrial. b) La desregulación en la expresión de PC1 activa la mitofagia, mecanismo de control de calidad para la remoción de organelos defectuosos. c) La disminución de la expresión de PC1 inactiva la vía Akt-FoxO1, observándose una mayor actividad transcripcional de FoxO1 y de genes asociados a mitofagia.

Conclusión: PC1 es necesaria para la actividad de la vía de señalización Akt-FoxO1, así como también para la homeostasis mitocondrial en el cardiomiocito.

Summary:

Background: Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a disease produced by the mutation of the *Pdk1* gene encoding polycystin-1 (PC1). Patients with ADPKD present metabolic alterations at the cellular level and the appearance of cardiovascular manifestations in the earliest stages of the disease. In kidney tissue, a dysregulation of mitochondrial function has been described as a result of the altered expression of PC1. However, to date it is unknown whether the same happens in the heart and its consequences on cardiac function, given the high dependence of this organelle for energy generation in this tissue.

Objective: Given the established bioenergetic dependence of the heart on the mitochondria, it was presumed that a morphological and functional alteration of the mitochondria would participate in the pathogenesis of this disease. The objective of this work was to study whether PC1 participates in the regulation of the functioning and connectivity of the mitochondrial network in the cardiomyocyte.

Results: The data show that: a) PC1 is necessary to maintain the functional state of the mitochondria and the connectivity of the mitochondrial network. b) Dysregulation in the expression of PC1 activates mitophagy, a quality control mechanism for removing defective organelles. c) The decreased expression of PC1 inactivates the Akt-FoxO1 pathway, stimulating transcriptional activity of FoxO1 and genes associated with mitophagy.

Conclusion: PC1 is necessary for the activity of the Akt-FoxO1 signaling pathway and mitochondrial homeostasis in cardiomyocytes

1. Introducción

La enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD, Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease) es el trastorno renal hereditario más común y es causado por la mutación de los genes *Pdk1* o *Pdk2* que codifican para las policistinas (PCs). La mayoría de los casos de ADPKD son por mutaciones en el gen que codifica para la proteína policistina-1 (PC1) [1]. Esta patología se caracteriza por una expansión quística renal bilateral progresiva seguida de una pérdida gradual de la función renal. También en la progresión de esta enfermedad hay manifestaciones extrarrenales a nivel sistémico que suelen afectar al hígado y al sistema cardiovascular [2], observándose desarrollo de hipertensión arterial, hipertrofia e insuficiencia cardíaca [3].

El desarrollo de hipertrofia cardíaca en estos pacientes se asocia habitualmente a la presencia de daño renal e hipertensión arterial, pero se ha observado deterioro en la función contráctil del corazón en pacientes jóvenes que aún no presentan estas sintomatologías avanzadas de la ADPKD y en los que tampoco se observa una mayor activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona [4]. Estos antecedentes abrieron la posibilidad de que las policistinas *per se* regulen directamente el funcionamiento de las células del corazón.

Policistina-1 (PC1)

PC1 es una proteína de 4.303 aminoácidos, codificada por el gen *pkd1* y localizada en la membrana plasmática. Esta proteína se describió inicialmente en células de túbulo renales [5], sin embargo se expresa en diversos tipos celulares, entre ellos los cardiomiocitos. PC1 está compuesta de 11 dominios transmembrana, un gran dominio N-terminal extracelular que puede ser cortado y que participa en interacciones célula-célula y célula-matriz [6] y un C-terminal

citoplasmático de aproximadamente 200 aminoácidos que también puede ser clivado y así regular diversas vías intracelulares [7], tales como las vías JAK-STAT [8], AP-1 [9] y mTOR [10], entre otras.

PC1 y corazón

El mayor porcentaje de los trabajos que estudian PC1 se han realizado en las células de riñón. Sin embargo en los últimos años, diversas investigaciones han descrito la presencia de PC1 en el cardiomiocito y su desregulación asociada al desarrollo de patologías cardiovasculares [11,12,13]. Fernandez *et al.* mostraron que PC1 regula la hipertrofia del cardiomiocito inducida por IGF-1, ya que regula la fosforilación del receptor de IGF-1 y la activación de las proteínas quinasas ERK y Akt. PC1 ejerce esta regulación sobre el receptor de IGF-1 a través de la inhibición de la fosfatasa PTP1B, siendo esta fosfatasa clave en la desfosforilación e inactivación del receptor IGF-1 (Datos no publicados).

También está establecido que PC1 es una proteína clave para el desarrollo de hipertrofia cardíaca dependiente del estrés mecánico, ya que actúa como un mecanosensor que estabiliza a la sub-unidad $\alpha 1C$ de los canales de calcio tipo L (LTCC) necesaria para la activación de la respuesta hipertrófica. Dicha estabilización ocurre a través de la modulación directa de PC1 sobre Akt y la sub-unidad $\alpha 1C$ [11,12].

PC1 también puede interactuar y regular otras proteínas como los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) en el cardiomiocito, y así controlar la función contractil [13]. PC1 está estrechamente relacionada con la repolarización de las células cardíacas, ya que su menor expresión altera la duración de los potenciales de acción y la contractilidad del cardiomiocito [13].

PC1 y mitocondrias

Además de los tempranos trastornos cardiovasculares observados en pacientes con ADPKD, también se han descrito alteraciones metabólicas, cursando patologías tales como diabetes y obesidad [14]. Existe desregulación metabólica en células quísticas derivadas de pacientes con ADPKD y también en las vías de señalización asociadas a metabolismo energético, tales como mTOR y STAT [15-17]. Estos antecedentes condujeron a ampliar el estudio de la regulación de PC1 sobre otras proteínas involucradas en la vía de señalización del metabolismo energético, manejo de glucosa y lípidos, e incluso sobre la funcionalidad de la mitocondria [14]. Tanto las células derivadas de los quistes provenientes de pacientes con ADPKD como las líneas celulares de riñón que tienen silenciada la expresión de PC1 han mostrado menor conectividad de la red mitocondrial, un alterado recambio de mitocondrias y una desregulación en el metabolismo oxidativo [18,19]. Inclusive se propuso que el dominio C-terminal de PC1 puede ser clivado y migrar desde la membrana plasmática hasta la membrana mitocondrial para regular el funcionamiento energético de este organelo [20].

El intenso e incesante trabajo contráctil del corazón requiere 15 a 20 veces su propio peso en ATP, utilizando diferentes sustratos tales como lípidos, aminoácidos, cuerpos cetónicos y glucosa [21]. Sin embargo, la β -oxidación de ácidos grasos que tiene lugar en la mitocondria es la principal fuente del ATP utilizado por el cardiomiocito en condiciones fisiológicas. El proceso de glicólisis en el citoplasma es secundariamente utilizado para generar ATP a través del piruvato derivado de glucosa y lactato [22]. Estos sustratos proveen de acetilCoA, que en la matriz mitocondrial será el sustrato del ciclo de Krebs para la generación de las moléculas reductoras NADH y FADH₂, que a su vez suministran los electrones para el funcionamiento de la cadena transportadora y cuyos complejos se ubican en la membrana interna mitocondrial, y que junto al

O₂, proporcionan la fuerza electromotriz que la ATP sintasa usa para la formación de ATP a partir de ADP y pirofosfato (Pi) [23]; proceso conocido como fosforilación oxidativa. Dada la importancia energética que tiene la mitocondria en el funcionamiento del corazón es interesante pensar que si PC1 ejerce esta regulación sobre la morfología y función mitocondrial en el cardiomiocito y si podría tener relación con las alteraciones cardíacas observadas en algunos pacientes. Sin embargo previo a esta tesis ningún estudio abordó esta relación entre PC1 y las mitocondrias del cardiomiocito.

Biología mitocondrial y su importancia en la homeostasis del cardiomiocito

Las mitocondrias son organelos cruciales para funciones celulares tales como apoptosis, necrosis, autofagia, almacenamiento de Ca²⁺, manejo de glucosa y lípidos y respuesta a estrés celular [24]. Por lo tanto, una disfunción mitocondrial de carácter crónico o irreversible se asocia al desarrollo de diversas patologías. En el caso del tejido cardíaco, por su carácter altamente oxidativo, demanda un óptimo funcionamiento de sus mitocondrias [25, 26].

Las mitocondrias están expuestas a diversos eventos de daño. Sin embargo, estos organelos poseen mecanismos de reparación y recambio de mitocondrias envejecidas y/o defectuosas. Sus mecanismos de control de calidad activan estas respuestas frente al daño [27] e incluyen a la biogénesis y mitofagia para la formación y eliminación de mitocondrias, respectivamente [28, 29].

La red mitocondrial continuamente cambia su morfología y función en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos, proceso que se conoce como dinámica mitocondrial. Este involucra un constante y dinámico equilibrio entre mitocondrias menos conectadas o fisionadas, y aquellas más conectadas o fusionadas [30].

Este proceso es finamente regulado por proteínas mitocondriales específicas, en donde las GTPasas Mitofusinas 1 y 2 (Mfn), y Optic atrophy 1 (Opa1) regulan la fusión de la red mitocondrial [31], mientras que la proteína GTPasa Dynamin related protein-1 (Drp-1) controla la fisión mitocondrias [32]. A través de este proceso dinámico son reparadas aquellas mitocondrias defectuosas. Sin embargo, si el daño es irreparable, estos organelos son disfuncionales con alteraciones en la síntesis de ATP y superproductoras de ROS, causando daño celular y activando mecanismos de eliminación celular como macroautofagia y eliminación selectiva de mitocondrias a través de un proceso más específico conocido como mitofagia [32].

La macroautofagia se caracteriza por la formación de un autofagosoma, donde la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) genera fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP3) e induce la formación del fagoforo. Esta estructura es una membrana de aislamiento que progresivamente se expande hasta la formación de una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma. Posteriormente, los productos son secuestrados al interior del autofagosoma y degradados a través de los lisosomas [34]. La eliminación selectiva de mitocondrias defectuosas a través de mitofagia, de igual manera requiere la formación del autofagosoma. Existe un reconocimiento selectivo de los organelos a eliminar a través de la proteína LC3 que forma parte del autofagosoma y proteínas mitocondriales adaptadoras que funcionan como un puente entre el autofagosoma y las mitocondrias a eliminar [35].

Existen dos vías de eliminación selectiva de mitocondrias, una dependiente de ubiquitinas y otra vía alternativa que es independiente de ubiquitinas. En este trabajo de investigación enfocamos nuestro estudio en la activación de mitofagia dependiente de ubiquitinas a través de la vía PTEN-induced putative kinase 1 Pink1/Parkin, donde Parkin es una E3-Ubiquitina ligasa citosólica y Pink1 es una

serina/treonina quinasa mitocondrial. Bajo condiciones normales, Pink1 se degrada constantemente por peptidasas de la matriz mitocondrial (MPP) y proteosoma [36]. Ante un daño sostenido se activa la eliminación selectiva de mitocondrias ya que la despolarización de la membrana mitocondrial detiene la continua degradación de Pink1, permitiendo su acumulación en la membrana mitocondrial externa, autofosforilación de la Ser65 y subsecuente activación [36]. Esta activación produce el reclutamiento de la proteína Parkin en la membrana mitocondrial donde es fosforilada por Pink1 y permite la poliubiquitinación de diversos sustratos mitocondriales, tales como VDAC1, Mfn 1/2 y Miro1, los cuales inducen la eliminación selectiva de las mitocondrias [35,37,38].

Eje PI3K - Akt - FoxO1 regula metabolismo celular

El nombre de la familia de fosfoinositido 3-quinisas (PI3K) proviene de su capacidad para fosforilar el grupo 3-hidroxilo del anillo inositol de los fosfoinosítidos presente en las membranas celulares [39]. PI3K se activa mediante un amplio espectro de activadores de superficie celular. La PI3K activada genera PIP_3 , que media el reclutamiento de la membrana y el posterior activación de diversas proteínas de señalización que contienen dominios de homología de pleckstrina (PH) y que participan en la propagación de señales río abajo de PI3K [39, 40]. Uno de los efectores posteriores más importantes de PI3K es la proteína quinasa Akt (también conocida como PKB, proteína quinasa B). Akt juega un papel esencial en la proliferación celular, crecimiento, migración y metabolismo. Tras la activación de la vía PI3K/Akt, Akt puede regular positiva o negativamente distintos efectores, o incluso directamente a través de su traslocación al núcleo [41].

Este trabajo se focalizó en FoxO1, el cual es uno de los principales efectores de este eje de señalización. Akt fosforila a FoxO1 en residuos conservados,

promoviendo una interacción de FoxO1 con miembros de la familia de proteínas adaptadoras 14-3-3 y la subsiguiente exportación nuclear e inhibición de su actividad transcripcional [41]. El factor transcripcional FoxO1 se une en las regiones promotoras de diversos genes implicados en proliferación, supervivencia y metabolismo celular [42]. Dentro del marco de la función cardíaca, los FoxO están involucrados en el control del metabolismo [43], progresión del ciclo celular, apoptosis [44], y respuesta al estrés oxidativo [45]. En el corazón, FoxO-1 es principalmente responsable de la adaptación funcional de los cardiomiocitos a diversas condiciones de estrés tales como perturbaciones metabólicas o estrés oxidativo [46]. La actividad de FoxO1 en el corazón y otros órganos está principalmente regulada por la insulina y el factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1) a través de los sustratos 1 y 2 del receptor de insulina (IRS1 e IRS2) [44]. Desde el punto de vista metabólico, la regulación del eje PI3K-Akt-FoxO1 es crítico en el manejo del metabolismo energético, estructura y función del corazón [44, 46].

A partir de los antecedentes descritos es posible plantearse las siguientes preguntas:

- ¿Presentan disfunción mitocondrial y cambios morfológicos en la red mitocondrial los cardiomiocitos con una expresión disminuída de PC1?
- ¿La ausencia de PC1 desregula el eje Akt-FoxO1 y genera alteraciones metabólicas en el cardiomiocito?

Los trabajos previos han mostrado que las células renales quísticas de pacientes con ADPKD tienen alteraciones metabólicas, y desregulación negativa funcional y morfológicas en las mitocondrias [18-20]. Considerando la importancia de estos organelos en la generación de energía en el corazón resultaba interesante estudiar si existía alguna asociación entre la menor expresión de PC1 y cambios

metabólicos. Hasta la fecha no hay estudios que hayan abordado esta relación en el cardiomiocito.

2. Hipótesis

La disminución de la expresión de policistina-1 en el cardiomiocito genera fragmentación y disfunción de la red mitocondrial y activación de la mitofagia dependiente del factor de transcripción FoxO1.

3. Objetivo general

Estudiar el papel de Policistina-1 en la regulación del funcionamiento y la conectividad de la red mitocondrial en cardiomiocitos.

4. Objetivos específicos

- Determinar el estado del metabolismo energético mitocondrial en cardiomiocitos con expresión disminuida de policistina-1
- Evaluar la morfología de la red mitocondrial en cardiomiocitos con la expresión reducida de policistina-1.
- Evaluar si existe desregulación de la vía de señalización Akt/FoxO1 y su asociación con el desarrollo de mitofagia.

5. Materiales y métodos:

Reactivos:

Los anticuerpos anti-policistina-1 y anti-GAPDH se obtuvieron de Santa Cruz (Dallas, TX, EE. UU.), Mientras que los anticuerpos anti-mtHsp70, anti-PINK1, anti-Parkin, anti-LC3B y anti-OXPHOS total fueron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos anti-fosfo-Drp1, anti-Drp-1, anti-MFN2, anti-OPA1, anti-fosfo-AKT, anti-AKT, anti-fosfo-FoxO1 y anti-FoxO1 eran de Cell Signaling Technology (Danvers, MA , EE.UU). Anticuerpo anti-mtHsp70, éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM), mitotracker-green FM, CellROX Orange Reagent, suero fetal bovino (FBS), suero de ternero recién nacido (NBCS), anticuerpos secundarios de Alexa, RNAmix, Opti-MEM, Trizol, T- Los reactivos Ripa, PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix y DNazol eran de Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). El anticuerpo contra β tubulina, oligomicina, dihidrorrodamina-123, cianuro de carbonilo m clorofenilhidrazona (CCCP), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), M199, 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) y Mission® siRNA contra PC1 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EE. UU.). Los cócteles de inhibidores de proteasa y fosfatasa eran de Roche (Basilea, Suiza). El kit Cell Titer-Glo® se obtuvo de Promega Corporation (Madison, WI, EE. UU.). El ensayo de proteínas y los reactivos iScript se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules, CA, EE. UU.). Adenovirus FoxO1-GFP y FoxO1-CA-GFP fueron amablemente proporcionados por el Dr. Joseph A. Hill (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, los ácidos y los disolventes se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata

Las ratas neonatas Sprague-Dawley (2 días post-natal) fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo el número de protocolo de bioética . Para el aislamiento de

cardiomiocitos, se realizó procedimiento ya descrito [47] , se sumergieron en alcohol 70% hasta el cuello y sacrificadas por decapitación. Inmediatamente y de manera muy rápida se removieron los corazones y se mantuvieron en medio Hanks estéril a 37°C. Las aurículas fueron descartadas y los ventrículos se picaron para luego proceder con los ciclos de digestión enzimática usando colagenasa del tipo-II (0,02 g/100 mL Hanks) y pancreatina (0,06 g/100 mL Hanks).

Las células aisladas se pre plaquearon por 2 h a 37°C para remover los fibroblastos. Posteriormente los cardiomiocitos se recolectaron y resuspendieron en medio de mantención [7] (MM = DMEM:M199 4:1), suero fetal bovino (SFB 5%) y suero fetal caprino (SFC 10%). La cuantificación de células se determinó mediante microscopía y cámara de Neubauer. Para este procedimiento se utilizó el colorante azul de tripán para descartar células muertas en el conteo. Las células fueron sembradas sobre placas cubiertas de gelatina (2% p/v), según las necesidades experimentales en MM 5% SFB – 10% SFC, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina 100 µM, para impedir la proliferación de fibroblastos. Los cardiomiocitos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5% y 95% de aire por 24 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio DMEM:M199 (4:1) en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina por 24 h, luego de lo cual, las células se estimularon según la descripción de cada experimento.

Silenciamiento de PC1

Los cardiomiocitos, posterior al lavado, se transfectaron con 140 nM de siRNA contra PC1 (Sigma, número catálogo SASI_Rn_0100193562) o el grupo control fue transfectado con un siRNA Control (Sigma, número de catálogo SISC001). Ambos grupos fueron transfectados con medio Opti-MEM y como vehículo de transfección se utilizó Lipofectamina (Invitrogen) durante 12-14 h. Posteriormente

a las células se les realizó un lavado y un cambio a medio de mantención con 2% de SFB. La disminución de los niveles proteicos de PC1 se evaluaron a través de la técnica de electrotransferencia de proteínas y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Se aprecia que a las 24 h post-transfección, disminuciones de 50 y 60% de los niveles proteicos y de mRNA para PC1, respectivamente (Figura 1).

Preparación de extractos celulares totales

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células/placa. Luego de terminado los estímulos, las células se lavaron con PBS y se lisaron utilizando 50 μ L de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; Tritón X-100 1% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM). El lisado fue centrifugado a 5.000 r.f.c durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante con la fracción de proteínas para determinar su concentración utilizando el método de Bradford. Luego a las muestras se les agregó tampón SDS-PAGE 4X y se calentaron a 95°C por 5 min para su denaturación.

Western blot

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos las muestras se mezclaron con tampón de carga 4X y se hirvieron por 3 min. Se cargaron 30 μ g de extracto proteico. El gel concentrador se preparó al 4% y el gel separador al 8-12% según la masa de la proteína a separar. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis. Una vez terminada la electroforesis las proteínas se traspasaron a una membrana de PVDF utilizando electro-transferencia a 400 mA por 90 min en buffer de transferencia. Luego de ser transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, ésta se bloqueó con solución de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v)

por 1 h a temperatura ambiente, para luego ser incubada con anticuerpos primarios: anti-Polycystina-1 (1:500), anti-PINK1 (1:1000), anti-Parkin (1:1000), anti-LC3b (1:1000), anti- Total OXPHOS (1:500), anti-p-Drp1 (1:1000), anti-Drp-1 (1:1000), anti-Mfn2 (1:1000), anti-Opa1 (1:1000), anti-p-Akt (1:1000), anti-Akt (1:1000), anti-p-FoxO1 (1:1000), anti-FoxO1 (1:1000), anti β -tubulina (1:2000), and anti-GAPDH (1:5000). Se usó como control de carga anticuerpos contra GAPDH (1:5000) o β -tubulina (1:5000). Como tampón de incubación se usó TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v con agitación suave, 4 °C durante toda la noche. Posteriormente las membranas se lavaron por 30 min con TBS 1x Tween-20 al 0,1%, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón o conejo (1:5.000) conjugado con peroxidasa. Para la detección de las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot ECL y se revelaron usando el equipo Syngene del que se obtuvieron imágenes de las bandas de proteínas de interés para luego cuantificar la intensidad de la banda. El análisis de la densitometría de las bandas inmunoreactivas se realizó utilizando el programa ImageJ.

Extracción del RNA

Para la extracción de RNA, las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/placa. Posterior a la transfección, el medio de cultivo se removió, se lavaron las células con PBS y luego lisadas con 1 mL de Trizol. Este lisado fue almacenado a -20°C. Posteriormente fue descongelado y se le agregaron 200 μ L de cloroformo, mezclando por inversión e incubados a temperatura ambiente por 3 min para luego ser centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4°C. La fase superior acuosa que contiene el RNA se recuperó y se mezcló con 500 μ l de isopropanol para precipitarlo. Luego estas muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se reconstituyó con 1 ml de etanol 75% frío, para

luego centrifugar a 12.000 g por 5 min a 4°C. El sobrenadante, nuevamente se descartó y las muestras se dejaron secar al aire por 10 min para luego reconstituir en 20 µL de agua libre de RNasa. La concentración del RNA se midió usando nanodrop.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para la realización del qPCR se utilizaron los siguientes partidores:

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
18S	CCCTGCCCTTTGTACACACC	CGATCCGAGGGCCTCACTA
PC1	GCCATCCAGCACTTCCTAGT	GAAAAGCCGATCCACACGTC
Beta actin	GCGCTTTTGACTCAAGGATTTAA	GGGATGTTTGCTCCAACCAA
Cyt b	TGCCGAGACGTAAACTACGG	TAGTCCTCGTCCCACATGGA
FoxO1	AAACACCAGTCTAAATTCCC	AACTTGATTTGCTGTCCTG
Pabpn1	GTTGGCAATGTGGACTATGG	AACAGGGACTCATCTAAGGC

Para la reacción de amplificación las muestras de cDNA se diluyeron 1:5 de las que se tomaron 1 µL para mezclar con 5µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher) y 0,4 µL de partidore forward y reverse respectivamente ya sea de ANP 100 µM, GDF11 100 µM o Pabpn1 100 µM. El programa de amplificación usado para todos los transcritos fue 2 min 95°C seguidos de 40 ciclos de 3 s a 95°C y 30 s a 60°C. La fluorescencia se determinó al finalizar todos los ciclos para luego seguir con la curva de denaturación desde 72°C a 95°C para verificar la pureza del transcrito. Para el análisis de los datos se usó el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ [48]

Potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)

Ψ_m se midió después de cargar cardiomiocitos con éster metílico de tetrametilrodamina 200 nM durante 30 min (excitación: 543 nm, emisión: más de 560 nm). La fluorescencia celular se determinó mediante citometría de flujo utilizando un sistema FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.). Se utilizó 50 μ M de agente de desacoplamiento de cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP) como control 30 min antes de la medición.

Medida de ATP

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de gelatina y se determinó el contenido de ATP usando un ensayo basado en luciferina / luciferasa. Para la medición de los niveles relativos de ATP intracelular, se retiró el medio y se reemplazó por medio de Krebs con Ca^{2+} para luego utilizar el Kit Cell Titer-Glo®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como control, se utilizó oligomicina 200 nM. Posteriormente, los lisados celulares se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se analizaron en un In Vivo FX Pro (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.).

Determinación del consumo de oxígeno en células vivas

Los cardiomiocitos sembrados en placas recubiertas con gelatina de 60 mm se tripsinizaron y luego se resuspendieron en PBS. Las células se colocaron en una cámara sellada a 25 °C, acoplada a un electrodo Clark (Yellow Springs Instruments, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE. UU.). Para determinar la tasa máxima de consumo de oxígeno, se agregó CCCP 50 μ M al NRVM (21). El electrodo detecta la cantidad de oxígeno que queda en la cámara a tiempo. Las células se mantuvieron en la cámara durante 20 minutos para calcular la tasa de consumo de oxígeno. Los valores se promediaron y expresaron en relación con el consumo de oxígeno de los controles.

Evaluación de la morfología mitocondrial

Luego de finalizados los diferentes estímulos, los cardiomiocitos se incubaron con la sonda MTG preparada en tampón Krebs por 25 min a 37°C y a una concentración de 400 nM, posteriormente se realizó la adquisición de imágenes utilizando un microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5 para lo cual los cubreobjetos conteniendo los cardiomiocitos cargados con MTG se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 µL de solución.

Colocalización Parkin-mitocondria mediante inmunofluorescencia

Los cardiomiocitos sembrados en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos de 12 mm cubiertos con gelatina en una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por placa. Una vez finalizados los estímulos se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% por 20 min a 4°C se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1 % por 10 min a 4 °C y se realizó bloqueo de las proteínas con BSA 1%. Posteriormente se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios HSP70mt (1:100) Parkin (1:100). Luego se incubaron a temperatura ambiente por 1 h con anticuerpos secundarios asociados a sonda fluorescente Alexa 488 (verde) [49] y Alexa 568 (roja) respectivamente. Finalmente, los cubreobjetos con las células se montaron en portaobjetos usando medio de montaje DAKO. Las imágenes se tomaron con microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5. Para cuantificación digital de la colocalización entre mitocondria (HSP70mt) y Parkin, se utilizó el programa ImageJ y se calcularon los coeficientes de Manders entre ambas señales.

Determinación de área y perímetro del cardiomiocito

Para este ensayo, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de 18 mm cubiertos con gelatina en una densidad de $2,5 \times 10^5$

células por pocillo. Una vez finalizados los estímulos se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% por 20 min a 4°C se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1 % por 10 min a 4 °C y se realizó bloqueo de las proteínas con BSA 1%. Luego se incubaron con la sonda Rodamina-Faloidina (1:500) para visualizar los sarcómeros. Las imágenes se tomaron con microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5.

Análisis estadístico:

Los resultados se presentan como media \pm SEM, utilizando la prueba t de Student para comparaciones directas y el análisis de varianza de 1 o 2 vías con la prueba posterior de Tukey para comparaciones múltiples. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico de todos los experimentos se realizó utilizando GraphPad Prism 6 (GraphPad 182 Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.).

6. Resultados

6.1. Objetivo específico 1. Determinar el estado del metabolismo energético mitocondrial en cardiomiocitos con expresión disminuida de policistina 1

6.1.1. La disminución de la expresión de PC1 genera disfunción mitocondrial en el cardiomiocito. Dados los antecedentes de que la mutación de PDK1 altera el metabolismo en células renales [18, 19], se evaluó el estado funcional de las mitocondrias y el metabolismo oxidativo en cardiomiocitos con expresión reducida de PC1. Se utilizó un siRNA específico contra PC1, observando disminuciones del 60 y 50% en los niveles del mRNA y proteína de los cardiomiocitos, respectivamente (Figura 1).

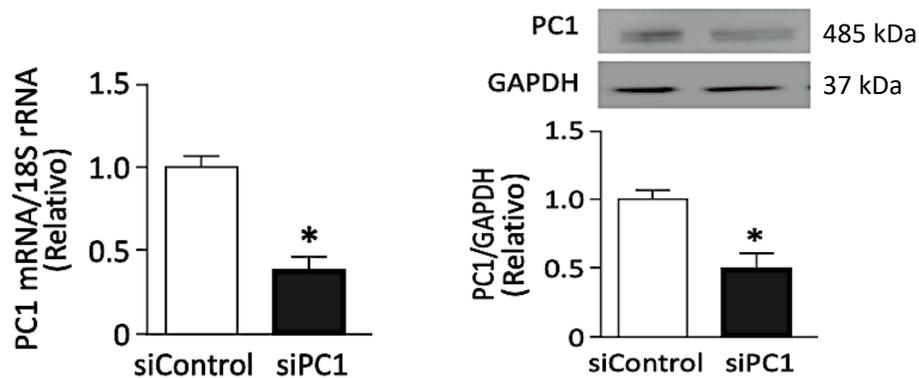


Figura 1. Silenciamiento de PC1. Los niveles de proteína y mRNA de PC1 post-silenciamiento (48 h) se determinaron por Western blot en extractos totales de cardiomiocitos y RT-PCR. Los valores de proteína PC1 son relativos a GAPDH (media \pm s.e.m; n = 3). Los valores del mRNA PC1 son relativos al gen 18S (media \pm s.e.m; n = 6).

Al evaluar los indicadores del estado del metabolismo oxidativo mitocondrial, se observó que el grupo siPC1 muestra que la reducción de PC1 disminuyó el potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) en un 75% respecto al control (Figura 2a). El estado de la fosforilación oxidativa se evaluó a través de la tasa de reducción de oxígeno (electrodo de Clark). El grupo PC1 tuvo un consumo de oxígeno basal (O.C.R.) significativamente menor que el grupo control siScr (Figura 2b). Los niveles de ATP total se usaron como marcador del producto final de la fosforilación oxidativa, observándose una disminución del 20% respecto al grupo control siScr (Figura 2c).

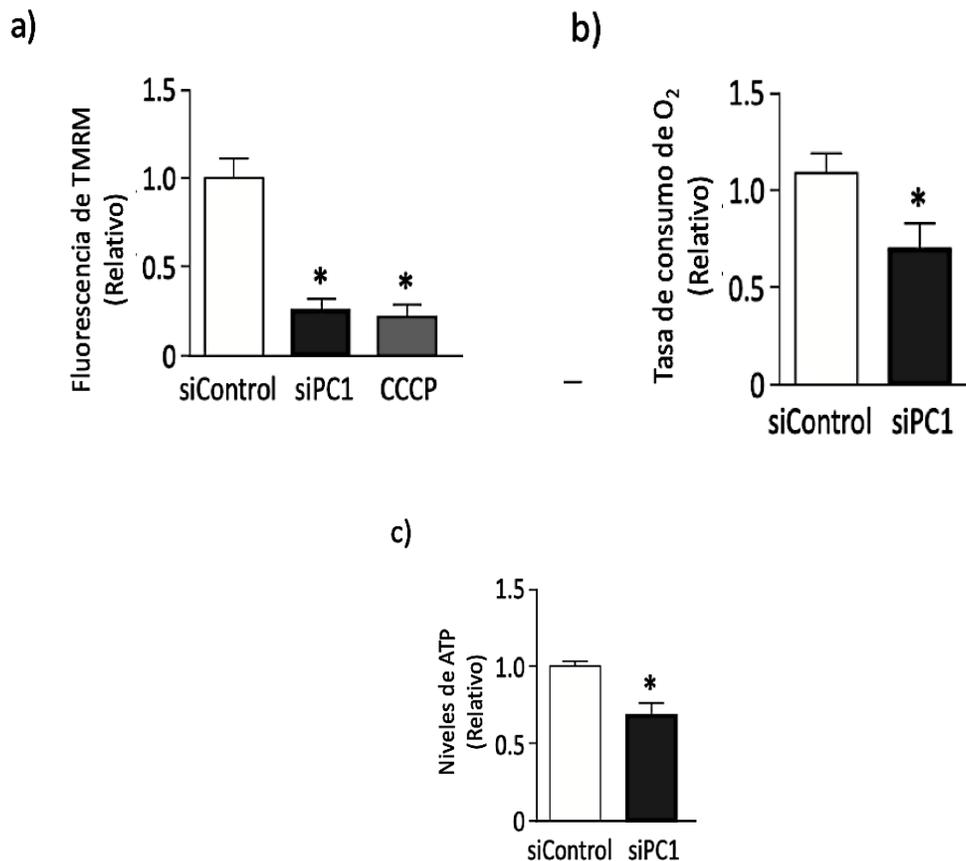
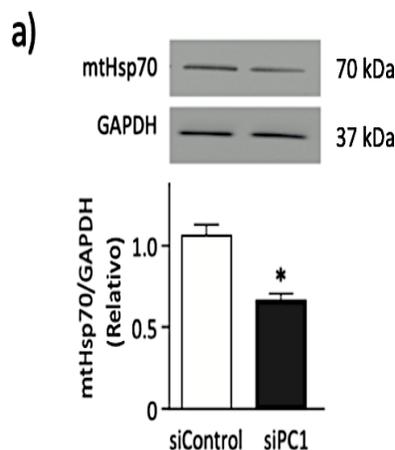


Figura 2. Marcadores de metabolismo oxidativo. a) Cardiomiocitos del grupo control y el grupo con expresión de PC1 silenciada se incubaron con tetrametilrodamina (TMRM) para estudiar el potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) a través de citometría de flujo. Se utilizó CCCP (10 μ M) como control positivo de la despolarización de la

membrana(media \pm s.e.m; n = 5). **b)** El consumo de oxígeno de el grupo control y el grupo siPC1 se evaluó con un electrodo Clark, y la tasa de respiración desacoplada se determinó agregando CCCP (200 nM) (media \pm s.e.m; n = 5). **c)** El contenido de ATP intracelular se determinó mediante un ensayo de luciferina-luciferasa (media \pm s.e.m; n = 5). Los valores son la media \pm SEM analizados por la prueba t de Student para datos no pareados, seguida de la prueba de Tukey. * P <0,05 frente al control.

6.1.2 La disminución de la expresión de PC1 disminuye la expresión de proteínas mitocondriales constitutivas en el cardiomiocito. Dada la evidente alteración en los parámetros que caracterizan el estado funcional de las mitocondrias en los cardiomiocitos siPC1, evaluamos si esta desregulación se relacionaba con disminución en el contenido de mitocondrias. La Figura 3a muestra que la disminución de la expresión de PC1 también reduce la expresión de la proteína mtHsp70, un residente mitocondrial constitutivo, y cuya reducción es indicativa de una caída en la masa total de mitocondrias [50]. Asimismo, evaluamos si existía una alteración en la expresión de OXPHOS a través de la detección de las subunidades NDUFB8-Complejo I, SDHB-Complejo II, UQCRC2-Complejo III, MTCO1-Complejo IV y ATP5A-Complejo V que podrían explicar la menor respiración mitocondrial y la disminución en los niveles de ATP determinados. La figura 3b muestra que la expresión de la subunidad CV-ATP5 permanece inalterada mientras que la expresión de CII-SDHB, CIII-UQCRC2 y CIV-MTCO1 disminuyó significativamente en cardiomiocitos siPC1.



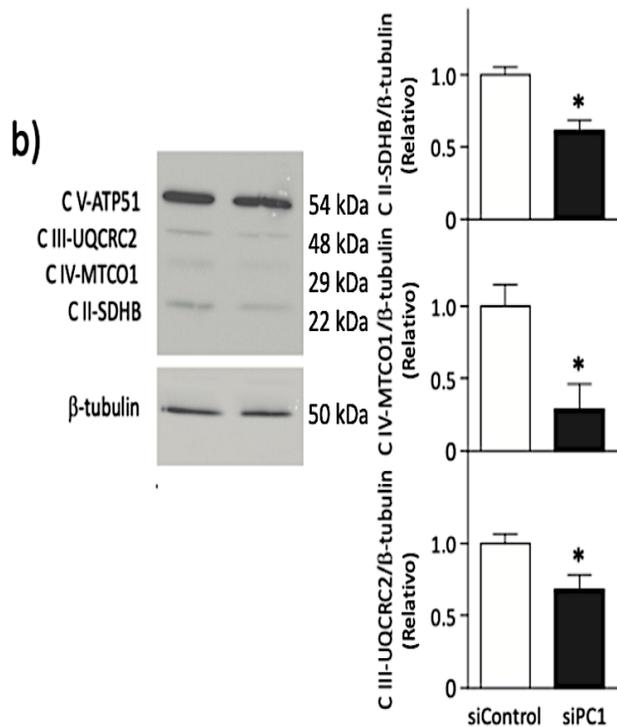


Figura 3. Niveles de expresión de proteínas mitocondriales constitutivas. **a)** Niveles de proteína marcadora de masa mitocondrial Hsp70 determinados por Western Blot en extractos de cardiomiocitos. Los valores son relativos a GAPDH (media \pm s.e.m; n = 5). **b)** Niveles de las proteínas SDHB-CII, UQCRC2-CIII y MTCO1-CIV que componen los complejos que llevan a cabo la fosforilación oxidativa determinada mediante Western blot en extractos de cardiomiocitos. Los valores son relativos a los de la β -tubulina (β -Tub) (media \pm s.e.m; n = 5). Los valores son la media \pm SEM analizados por la prueba t de Student para datos no pareados, seguida de la prueba de Tukey. * P <0,05 frente al control.

6.1.3 Cardiomiocitos con la expresión silenciada de PC1 no presentan alteración en la biogénesis mitocondrial. Luego para evaluar si esta menor expresión de las proteínas de la membrana mitocondrial estaba relacionada con un menor número de mitocondrias por una alteración de la biogénesis, evaluamos si la reducción de PC1 modificaba la proporción de DNA mitocondrial y nuclear y los niveles del regulador maestro de la biogénesis mitocondrial PGC-1 α [51]. La figura 4a muestra que no hubo diferencias significativas del DNA mitocondrial entre los grupos de estudio. También se observa en la figura 4b que no hubo cambios en la proteína usada como marcador de la biogénesis mitocondrial PGC-1 α (Co-activador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas) ; lo cual nos llevó a descartar la posibilidad que una desregulación en la biogénesis fuese la responsable de los cambios producidos por la ausencia de PC1 en los marcadores funcionales y en la disminución de las proteínas mitocondriales.

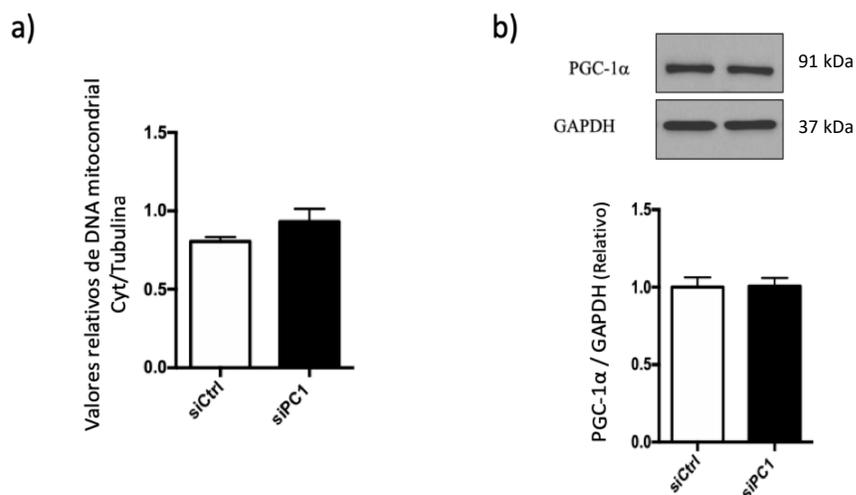
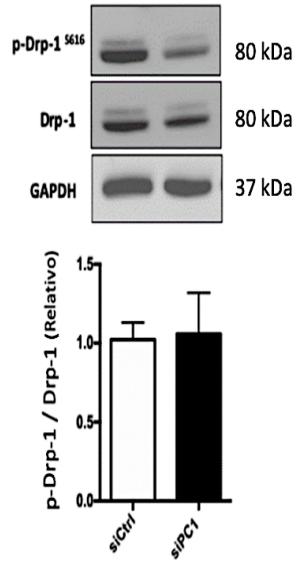


Figura 4. Marcadores de biogénesis mitocondrial. **a)** Valores relativos de DNA mitocondrial determinados mediante RT-PCR. Los valores son relativos al gen de control β -tubulina (media \pm s.e.m; n = 6). **b)** Niveles de proteína del marcador de biogénesis mitocondrial PGC-1 α determinado por transferencia Western en extractos totales de cardiomiocitos (media \pm s.e.m; n = 5). Los valores son la media \pm SEM analizados por la prueba t de Student para datos no pareados seguida de la prueba de Tukey.

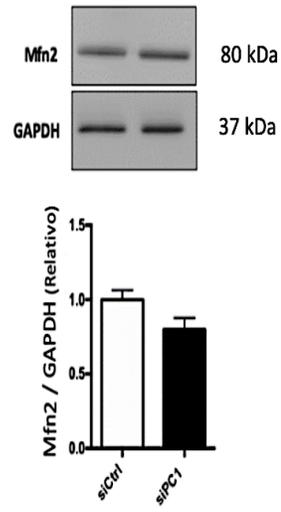
6.2 Objetivo específico 2. Evaluar la morfología de la red mitocondrial en cardiomiocitos con la expresión reducida de policistina-1.

6.2.1. La disminución de la expresión de PC1 induce pérdida en la conectividad de la red mitocondrial. La disfunción mitocondrial gatilla diversas respuestas de reparación y cambios en la expresión de genes que resultan en la alteración morfológica de la red mitocondrial de las células [36, 52] Para determinar si existía una relación entre las alteraciones metabólicas producidas por la reducción de PC1 y desregulación en la conectividad de la red mitocondrial, se estudió la morfología mitocondrial y la expresión de proteínas reguladoras de los procesos de fusión y fisión de la red, también se evaluó la fosforilación en la Serina 616 como modificación marcadora de fisión mitocondrial. La Figura 5 muestra que no hay cambios en la expresión de las proteínas MFN2, OPA1 y DRP1, ni tampoco hubo cambios significativos en la relación p-Drp-1/Drp-1.

a)



b)



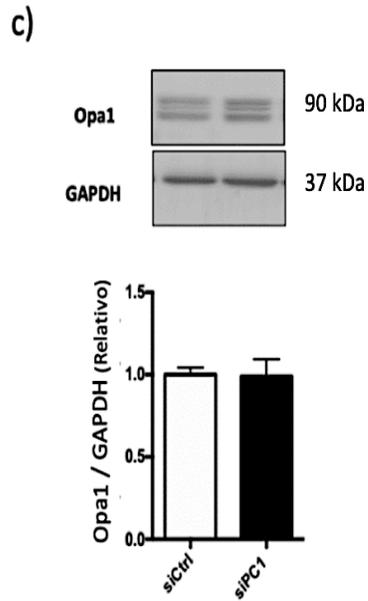


Figura 5. Niveles de expresión de proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial en cardiomiocitos con expresión reducida de PC1. Niveles de: a) fosforilación de (DRP-1) Ser616; (b) MFN2 y (c) (OPA-1) se determinaron mediante Western Blot en extractos totales de cardiomiocitos. Las imágenes son representativas de 5 experimentos independientes. Los gráficos representan la media \pm SEM. Los datos se normalizaron a GAPDH y se relativizaron al control. El análisis estadístico se calculó utilizando la prueba t de Student para datos no pareados seguida de la prueba de Tukey.

A través de microscopía confocal se analizó la conectividad de la red mitocondrial, observándose que la reducción de la expresión de PC1 condujo a una red mitocondrial menos conectada (Figura 6). El número de mitocondrias por cardiomiocitos aumentó junto con disminuir el volumen individual de mitocondrias (Figura 6), mostrando que la deficiencia de PC1 promueve la fisión mitocondrial y la reducción del volumen total de mitocondrias en los cardiomiocitos.

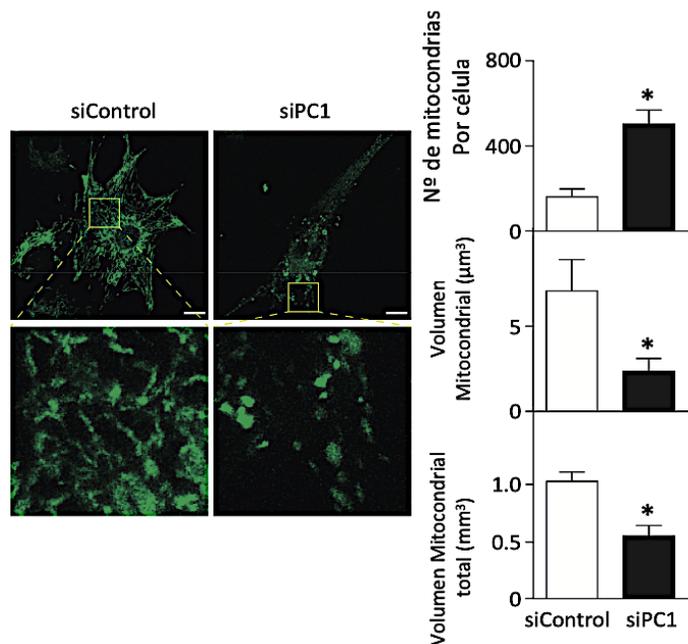
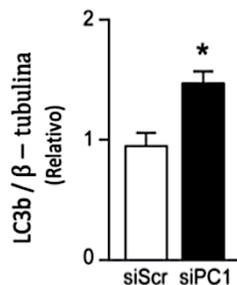
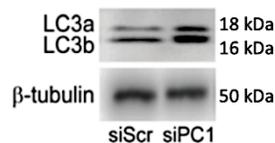


Figura 6. Morfología de la red mitocondrial en cardiomiocitos con expresión reducida de PC1. Imágenes confocales de la red mitocondrial teñidas con verde Mitotracker (barra de escala: 20 µm). Los paneles de la derecha muestran ampliación y reconstrucción 3D para determinar el número y volumen de partículas mitocondriales. El análisis cuantitativo del número de mitocondrias por célula y el volumen mitocondrial se determinaron con el software ImageJ. Los gráficos representan la media ± SEM de 5 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t de Student para datos no pareados, seguida de la prueba de Tukey. * p < 0,05 frente a siScr

6.2.2 Cardiomiocitos con la expresión de PC1 silenciada muestran sobreactivación de la mitofagia.

La mitofagia controla la calidad y el número de mitocondrias, eliminando organelos disfuncionales o un exceso de mitocondrias que puedan generar un gran número de especies reactivas de oxígeno y causar la muerte celular [53]. Dado que se observó un gran número de mitocondrias disfuncionales y poco conectadas en los cardiomiocitos tratados con siPC1 se evaluó si existía activación de la mitofagia como mecanismo compensatorio. Al evaluar los niveles de proteínas marcadoras de mitofagia se observó que los cardiomiocitos siPC1 presentan aumento en los niveles de la proteína adaptadora de autofagosomas LC3b (Figura 7a).

También se evaluó la activación de la mitofagia mediada por Pink1 y Parkin, a través de la determinación de los niveles de ambas proteínas. La Figura 7c muestra los niveles de Pink1 aumentan en los cardiomiocitos tratados con siPC1, efecto indicativo de su acumulación en la membrana mitocondrial como inicio de la mitofagia [36]. Los niveles de Parkin no cambiaron entre ambos grupos (Figura 7b).



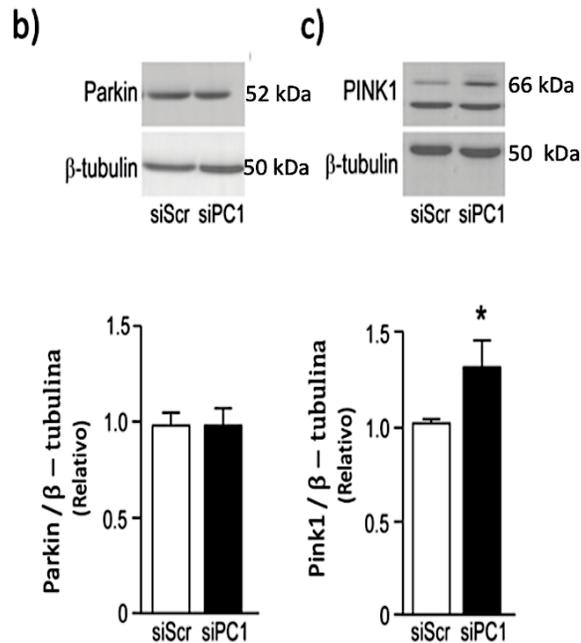


Figura 7. Niveles de expresión de proteínas marcadoras de mitofagia en cardiomiocitos con expresión reducida de PC1. a) Niveles de proteína adaptadora de autofagosoma LC3b determinados por Western blot en extractos de cardiomiocitos. Los valores se normalizan fueron normalizados contra β -tubulina b) Niveles de proteína de Parkin c) Niveles de proteína Pink1. Estos niveles se determinaron mediante Western blot en extractos de cardiomiocitos totales. Los valores se normalizan contra los niveles de β -tubulina. Los gráficos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t de Student para datos no pareados, seguida de la prueba de Tukey. * $p < 0,05$ frente a siScr.

Posterior a la activación de Pink1 ocurre el reclutamiento de Parkin desde el citosol hacia la membrana mitocondrial para ser fosforilado y activado [36]. Para investigar si esta traslocación estaba ocurriendo, se evaluó la distribución subcelular de Parkin mediante ensayos de inmunofluorescencia. La Figura 8 muestra un incremento significativo en la superposición de Parkin sobre la red mitocondrial en cardiomiocitos siPC1. Estos resultados sugieren que la mitofagia

dependiente de Pink1/Parkin podría estar involucrada en la reducción de la eliminación de mitocondrias disfuncionales en cardiomiocitos siPC1.

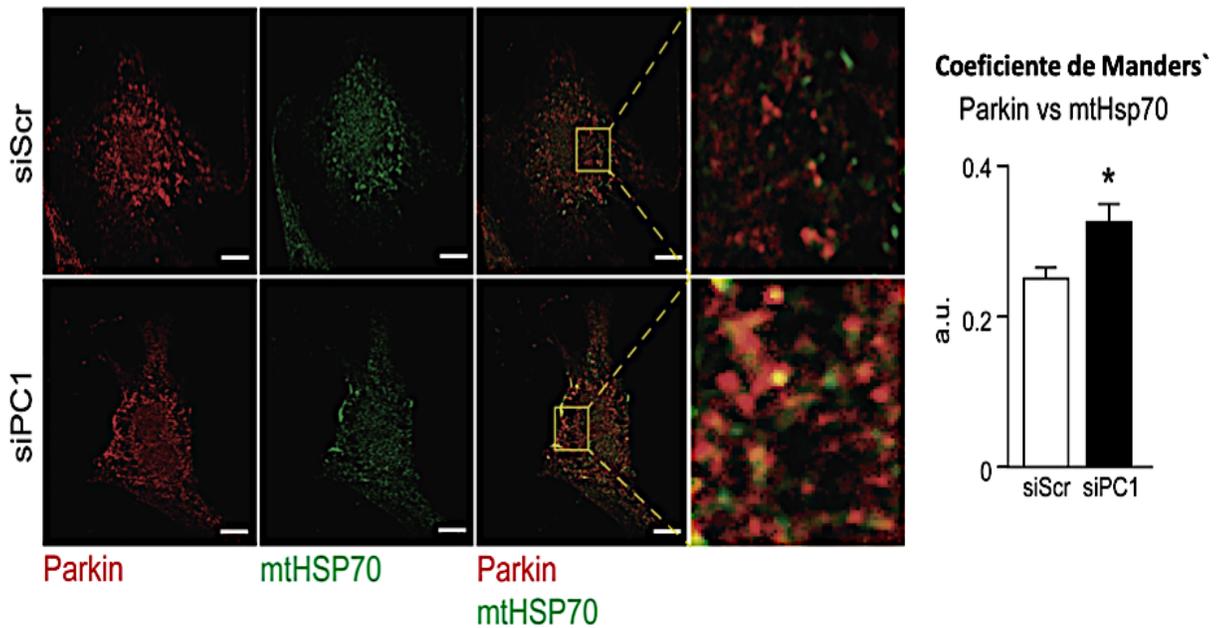
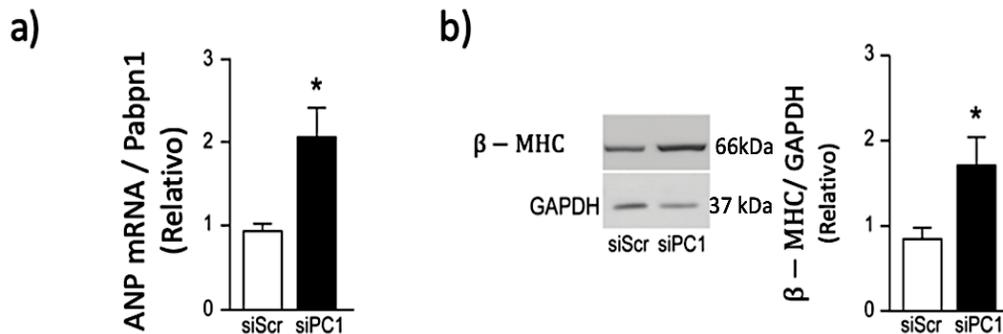


Figura 8. Traslocación de Parkin hacia la membrana mitocondrial como marcador de mitofagia en cardiomiocitos con expresión reducida de PC1. Imágenes confocales de inmunodetección y fluorescencia de Parkin (rojo) y mtHsp70 (verde) en cardiomiocitos. Barra de escala: 20 μ m. Las imágenes de la derecha muestran una ampliación de la colocalización. La colocalización de Parkin y mtHsp70 se calculó como el coeficiente de Manders (panel derecho). Los gráficos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t de Student para datos no pareados, seguida de la prueba de Tukey. * P <0,05 frente a siScr.

6.2.3. Pérdida de la conectividad de la red mitocondrial incrementa marcadores hipertróficos en cardiomiocitos con expresión reducida de PC1. Nuestro Laboratorio estableció que los cardiomiocitos con pérdida de la conectividad de la red mitocondrial y disfunción en parámetros metabólicos se modificaba la expresión de genes fetales marcadores de hipertrofia, así como también un aumento en el área celular y número de sarcómeros [54]. Dado que estos resultados mostraron aumento en la fisión de la red mitocondrial y disfunción en el metabolismo oxidativo, en esta tesis se evaluó si también había una asociación con la aparición de parámetros marcadores de hipertrofia cardíaca. Las Figuras 9a y 9b muestran que en los cardiomiocitos con disminución de la expresión de PC1 aumentan los niveles de expresión de ANP y β -MHC, característico de cardiomiocitos que han comenzado a hipertrofiarse [55]. También se observó que el grupo de estudio siPC1 tenía un mayor porcentaje de cardiomiocitos sarcomerizados, característico del rearrreglo estructural que ocurre en la hipertrofia (Figura 9c) [55]. Sin embargo no hubo un aumento significativo en el área celular (Figura 9d).



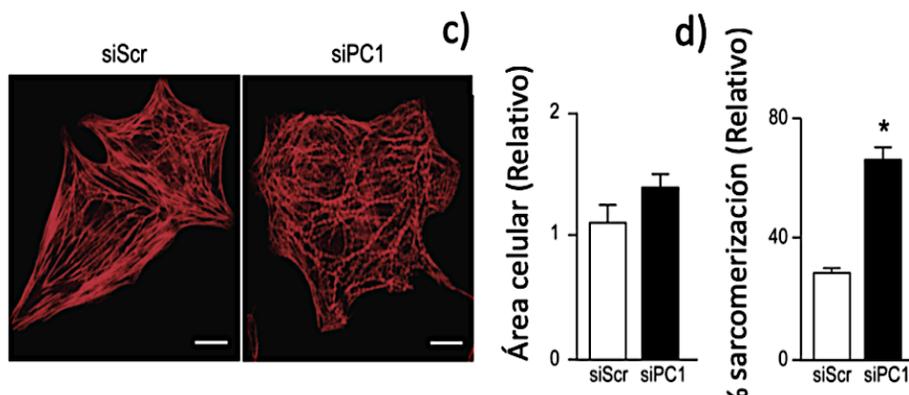


Figura 9. Marcadores de hipertrofia cardíaca en cardiomiocitos con expresión reducida de PC1. **a)** Los niveles de mRNA del péptido natriurético auricular (ANP) se determinaron mediante RT-PCR en extractos de RNA total. Los datos se normalizaron mediante el mRNA endógeno Pabpn1 (n = 6). **b)** Los niveles proteicos de β -MHC en los cardiomiocitos se determinaron por Western blot. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes que se normalizaron contra GAPDH y se relativizaron al control siScr. **c)** Imágenes confocales representativas de cardiomiocitos teñidos con rodamina-faloídina para detectar estructuras sarcoméricas. Escala de barra 20 μ m. El área celular y el porcentaje de sarcomerización se determinaron en, al menos, 40 células usando el software ImageJ (n = 4). Los gráficos representan la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante la prueba t de Student para datos no apareados, seguida de la prueba de Tukey. * p < 0,05 frente a siScr.

6.3. Objetivo 3: Evaluar si existe desregulación de la vía de señalización Akt/FoxO1 y su asociación con el desarrollo de mitofagia

6.3.1. La disminución de la expresión de PC1 en el cardiomiocito desregula la vía Akt/FoxO1. Estudios previos en cardiomiocitos mostraron que la fosforilación de Akt en Ser473 depende de la expresión de PC1 [11] y su efector descendente FoxO1 [41], que también regula la mitofagia dependiente de Pink1/Parkin [56, 57]. Con base en estos antecedentes, se investigó si la reducción de PC1 afecta la fosforilación de Akt y FoxO1. Nuestros resultados muestran una disminución en la fosforilación de Ser473-Akt sin cambios en los

niveles totales de FoxO1 (Figura 10a), pero con una disminución significativa en la fosforilación de Ser256-FoxO1 (Figura 10b).

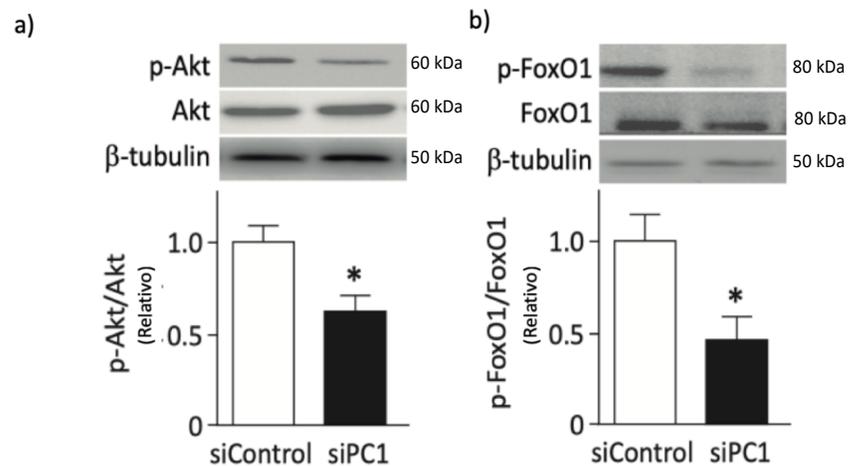


Figura 10. Niveles proteicos de las formas totales y fosforiladas de Akt y FoxO1 en cardiomiocitos con expresión reducida de PC1. a) Determinación de la activación de Akt a través de los niveles de phospho-Ser473-Akt y Akt total mediante Western blot. (b) La activación de FoxO1 se determinó mediante fosforilación en Ser256-FoxO1. Los datos son relativos al total de FoxO1. Los gráficos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t de Student para datos no pareados, seguida de la prueba de Tukey. * $p < 0,05$ frente a siScr.

6.3.2 La ausencia de PC1 en cardiomiocitos activa mitofagia de manera dependiente de FoxO1. Como se mencionó en el párrafo anterior, se ha establecido la activación de la vía Pink1/Parkin por parte FoxO1 en los cardiomiocitos [56, 57], basándonos en estos antecedentes se determinó si la activación de la mitofagia ocurre en respuesta a la disminución de la fosforilación de FoxO1 en los cardiomiocitos con expresión de PC1 disminuida; para ello se realizó un doble silenciamiento contra PC1 y FoxO1 (Figura 11) y se evaluaron los cambios en la ubicación subcelular de Parkin y en la morfología mitocondrial.

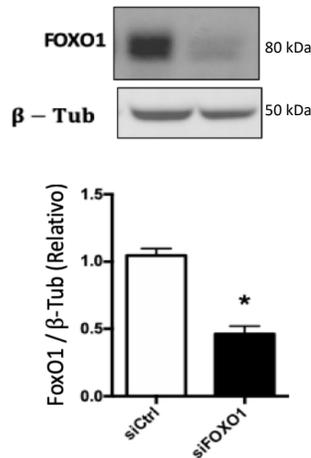
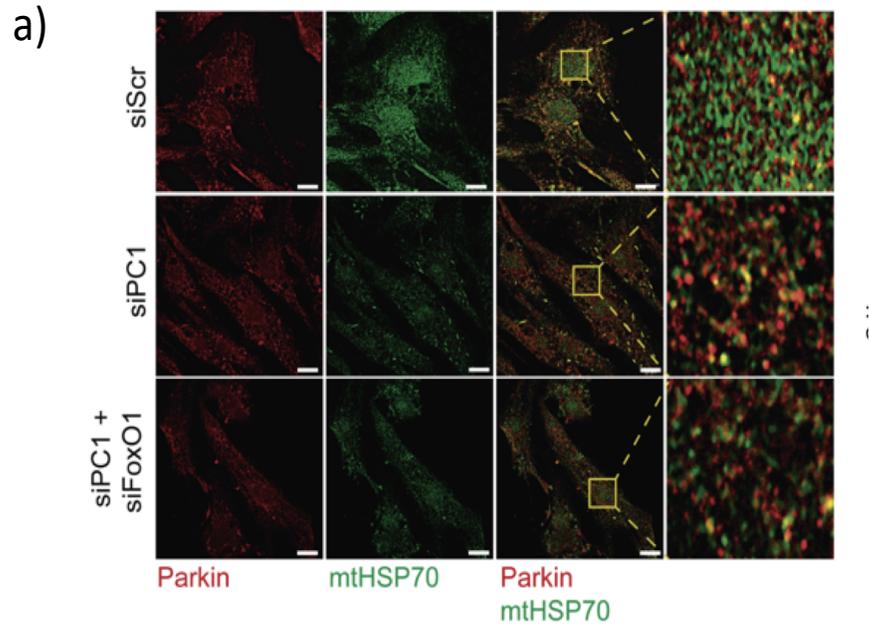


Figura 11. Evaluación del silenciamiento de FoxO1 en el cardiomiocito. 24 h después del silenciamiento, se determinaron los niveles de FoxO1 mediante transferencia Western en extractos totales de cardiomiocitos. La cuantificación de densitometría se relativizó a los niveles de β -tubulina y se normalizó mediante siScr. El gráfico representa la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó mediante la prueba t de Student para datos no pareados, seguida de la prueba de Tukey. * $p < 0,05$ frente a siScr.

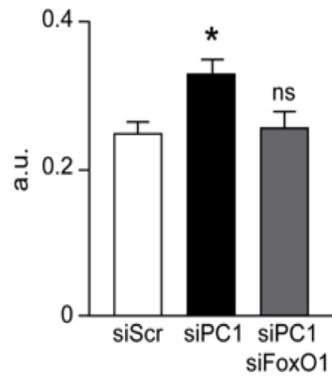
A través de microscopía confocal y mediante el análisis del coeficiente de Mander's utilizado para cuantificar el grado de colocalización de Parkin y mtHsp70, se determinó que la reducción de la expresión de FoxO1 evitaba el reclutamiento de Parkin hacia la mitocondria (Fig.12a). También se determinó que la inhibición de FoxO1, a través del silenciamiento de su expresión, se inhibe esta pérdida de la conectividad de la red mitocondrial reportada (Figura 12b). Esta figura muestra una disminución significativa en el número de mitocondrias por célula, además de una recuperación en el volumen de estas mitocondrias. Estos resultados sugieren que en cardiomiocitos, la pérdida de PC1 conduce a la eliminación de mitocondrias disfuncionales, proceso que podría estar relacionado con la reducción de la fosforilación de Akt seguida de una

disminución de los niveles de fosforilación de FoxO1 y la activación de la mitofagia dependiente de Pink1/Parkin a continuación.

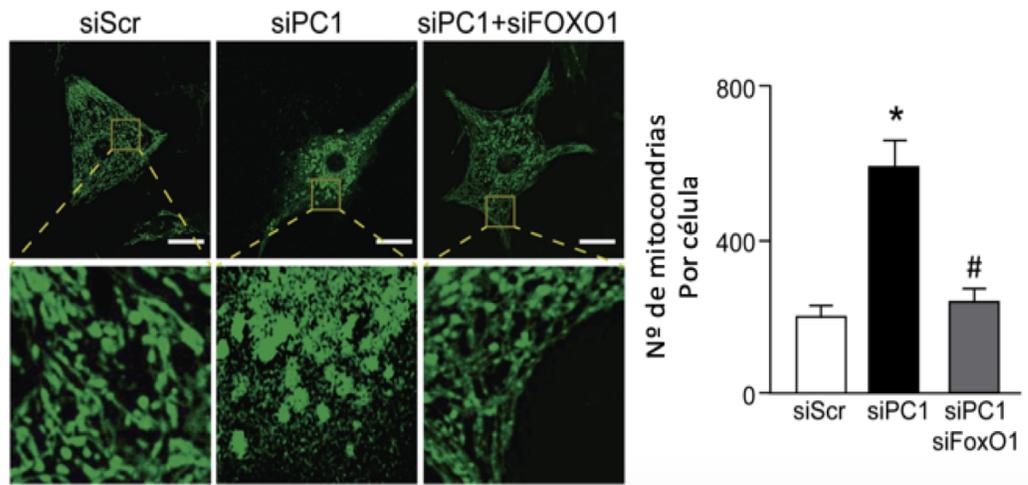


Coefficiente de Manders`

Parkin vs mtHsp70



b)



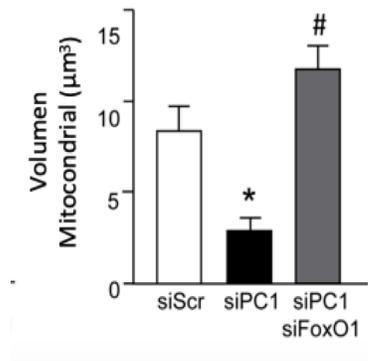


Figura 12. Evaluación del rescate de la mitofagia a través de la inhibición de FoxO1. **a)** Imágenes confocales representativas de inmunodetección y fluorescencia de Parkin (rojo), mtHsp70 (verde) (escala: 20 µm). Las imágenes de la derecha muestran una ampliación de la colocalización. La colocalización de Parkin y mtHSP70 se calculó localmente como el coeficiente de Manders (panel derecho). **b)** Imágenes confocales representativas de la red mitocondrial en cardiomiocitos teñidos con la sonda Mitotracker verde (escala: 20 µm). Las imágenes inferiores de cada figura muestra la ampliación de la sección cuadrada seleccionada. Los gráficos representan la media ± SEM de 5 experimentos independientes. La significancia estadística se calculó usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. * p <0,05 frente a siScr, # p <0,05 frente a siPC1

DISCUSIÓN

Los altos requerimientos de energía de los cardiomiocitos, hacen a estas células muy sensibles a los cambios en el metabolismo intracelular [21]. Las mitocondrias son cruciales para la producción de ATP, y la regulación de su biología está dada por los procesos dinámicos de fusión, fisión, biogénesis y degradación [32, 33]. Los estudios sugieren que la PC1 tiene un papel vital en la contractilidad del corazón, modulando directamente la estabilización del canal de calcio tipo L [11] y el potencial de acción en los cardiomiocitos [13]. Sin embargo hasta ahora, se desconocía su papel en la regulación del metabolismo y la dinámica mitocondrial. Los resultados permiten validar la hipótesis propuesta en esta tesis que PC1 modula la dinámica y funcionalidad de las mitocondrias a través de la activación de la vía Akt/FoxO1 en el cardiomiocito.

Efecto del silenciamiento de la expresión de PC1 sobre los parámetros funcionales del metabolismo oxidativo en cardiomiocitos. Una posible relación entre PC1 y la mitocondria surgió a partir de observaciones en pacientes con manifestaciones extra-renales tempranas, tales como desregulaciones metabólicas y manejo de la glucosa defectuoso [14,17]. Además se describió que pacientes con ADPKD con función renal preservada tenían elevados niveles de estrés oxidativo [19]. Otro estudio mostró que PC1 se expresa en la membrana celular de los riñones en diferentes modelos de esta enfermedad. Sin embargo, el dominio C-terminal de PC1 se puede auto-clivar y migrar hacia la membrana mitocondrial, donde desde allí regula la función de la mitocondria, entre los que se cuentan el manejo de los lípidos, glicólisis y fosforilación oxidativa [20]. Estos trabajos enfocados en células renales mostraron que la alteración en la expresión de PC1 disminuye la tasa de consumo de oxígeno, también produce una despolarización en la membrana mitocondrial y una caída en los niveles de ATP [18-20], todos marcadores del metabolismo oxidativo llevado a cabo por la

mitocondria. El presente trabajo muestra datos similares en cardiomiocitos, en donde se observó disfunción mitocondrial a través de los mismos parámetros descritos por estos autores. Es importante destacar el compromiso energético que significa una fosforilación oxidativa deficiente para el corazón ya que compromete la contractilidad de este órgano y, por lo tanto, podría guardar relación la disfunción energética oxidativa producida por una reducción de la expresión de PC1 con las alteraciones cardiovasculares tempranas que muestran algunos pacientes.

En concordancia con los resultados descritos, se observó disminución de la expresión de proteínas mitocondriales constitutivas en los cardiomiocitos con expresión reducida de PC1, por ejemplo Hsp70, proteína chaperona esencial para el correcto plegamiento de proteínas que conforman la matriz mitocondrial [58]. Esta proteína se usa como marcadora de masa mitocondrial, por tanto una disminución de sus niveles es indicativo de una disminución del número de mitocondrias en los cardiomiocitos [24]. También en el presente estudio se observó disminución de los niveles de algunas sub-unidades SDHB, UQCRC2, MTCO1 de los complejos II, III y IV, respectivamente, que conforman la cadena transportadora de electrones. Estos complejos se encuentran en la membrana mitocondrial y también pueden usarse como marcadores de la abundancia mitocondrial, sin embargo también es importante destacar que desde el punto de vista funcional tiene relevancia, ya que al estar disminuidos los niveles de expresión de ciertas sub-unidades probablemente también las otras sub-unidades también se encuentren disminuidas. Además solo el hecho de encontrarse alteradas algunas representan una pérdida de la estabilidad y estructura del complejo en total y por tanto una pérdida de funcionalidad [59].

Alteraciones en la dinámica mitocondrial inducida por la expresión disminuida de PC1 en el cardiomiocito. Se conoce en diferentes tipos celulares

que la pérdida de funcionalidad de las mitocondrias se acompaña de una desregulación en la dinámica que se encarga del balance entre fusión y fisión de la red de mitocondrias para reparar organelos defectuosos o dar origen a mitocondrias nuevas a través del proceso de biogénesis [60, 61]. Nuestros resultados mostraron alteraciones en la dinámica mitocondrial en los cardiomiocitos silenciados con el siRNA para PC1, produciéndose un desbalance hacia una pérdida de la conectividad de la red mitocondrial. La disfunción observada en nuestro modelo sugiere que este aumento en la fisión de la red se debe a la activación de mecanismos de control de calidad que buscan separar las mitocondrias defectuosas, repararlas y/o eliminarlas [36], lo cual es coherente con la disminución en la masa mitocondrial observada en los resultados mostrados en el punto anterior.

En las imágenes de microscopia confocal analizadas se registró un aumento en el número de mitocondrias con una concomitante disminución del volumen de las mismas, característico de una pérdida de la conectividad de la red con el objeto de aislar las mitocondrias defectuosas [36, 49]. Sin embargo al evaluar cambios en la expresión y fosforilación de las proteínas reguladoras de los procesos fusión/fisión no hubo cambios en ninguna de ellas. Estas observaciones son concordantes con datos reportados, en los que usan otro tipo de aproximaciones para determinar un estado alterado de la dinámica mitocondrial tales como el reclutamiento y translocación de la GTPasa Drp-1 hacia la membrana mitocondrial como mecanismo gatillante de la fisión mitocondrial [62, 63] en vez de la determinación de los niveles de expresión y modificaciones post traduccionales en las proteínas de la maquinaria fisión/fusión.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de dinámica mitocondrial también comprende la incorporación de mitocondrias nuevas para reemplazar a las mitocondrias defectuosas [36]. Por ello luego de detectar una menor masa

mitocondrial en los cardiomiocitos se investigó la biogénesis mitocondrial usando dos marcadores de este proceso: PGC-1 α y el DNA mitocondrial. No se observaron cambios significativos en las células con la expresión disminuida de PC1. Estos datos permiten sugerir que en nuestro modelo no hay activación de un mecanismo compensatorio como la biogénesis mitocondrial que reemplace las mitocondrias disfuncionales de estos cardiomiocitos. Existe otro mecanismo de control de calidad que elimina selectivamente estas mitocondrias y que podría estar sobreactivado [35], dando cuenta de la disminución de la masa mitocondrial observada en nuestro modelo.

La desregulación mitocondrial en cardiomiocitos se asocia con la fisión de la red mitocondrial, disminución de parámetros funcionales y aparición de marcadores hipertróficos [54]. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Pennanen y cols, quienes observaron asociación entre la disminución del consumo de oxígeno, caída del potencial de la membrana mitocondrial y bajos niveles de ATP bajo, aumento de la fisión mitocondrial y aumento en los niveles de expresión de las proteínas marcadoras de la hipertrofia del cardiomiocito: ANP y β -MHC y de la sarcomerización. Estos resultados referentes a la aparición de marcadores hipertróficos en los cardiomiocitos con expresión disminuida de PC1 son contrarios a lo descrito por Pedrozo y cols. Estos investigadores mostraron que PC1 es necesaria para el desarrollo de hipertrofia inducida por estrés mecánico [11]. Sin embargo nuestro modelo comprende condiciones experimentales diferentes como el uso de suero fetal bovino en el cultivo celular para evitar la activación de la autofagia, y también se debe considerar la variedad de estímulos que desencadenan la hipertrofia. En el modelo de cardiomiocitos con expresión de PC1 silenciada del trabajo de Pedrozo y col se usó como estímulo hipertrófico el estrés mecánico inducido por estrés osmótico, contrario a lo observado en el desarrollo de hipertrofia inducida por estimulación adrenérgica [11]. Nuestro trabajo no consideraba ningún modelo patológico por tanto es necesario evaluar

otros parámetros que permitan hacer una mejor caracterización del tipo de hipertrofia que se estaría desarrollando en los cardiomiocitos de nuestro modelo, e incluso sería interesante escalar estos estudios y evaluar la función contráctil en animales que tengan una alteración en la expresión de PC1.

Efecto del silenciamiento de la expresión de PC1 en mitofagia. La maquinaria fusión/fisión trabajan en conjunto con la mitofagia para mantener la homeostasis mitocondrial y celular [32]. Además previamente se ha asociado una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, disminución de niveles de ATP, y pérdida de masa mitocondrial con sobreactivación de la mitofagia [34, 64, 65]; nuestros resultados con células con expresión de PC1 disminuida muestran este mismo comportamiento, en dónde asociado a la disfunción metabólica, pérdida de conectividad de la red mitocondrial y disminución de la masa mitocondrial se observó que el proceso de eliminación selectiva de mitocondrias estaba activado. Estos datos muestran que existe una asociación directa entre PC1 y mitofagia, además de que la sobreactivación de este proceso se vería asociado al desarrollo de diferentes patologías cardiovasculares [66], y esto resultaría una interesante proyección para abordar los síntomas cardiovasculares tempranos que presentan los pacientes con ADPKD.

Rol de la PC1 en la activación de la vía Akt-FoxO1. La vía Akt-FoxO1 está relacionada con procesos celulares vitales como la proliferación, ciclo celular, apoptosis, entre otros. Además existen estudios previos que han determinado que PC1 puede regular la fosforilación de Akt [11,12], por ello evaluamos si esta vía podría estar relacionada con los resultados obtenidos de función mitocondrial y cambios morfológicos asociados. En este trabajo mostramos que la pérdida de expresión de PC1 modula la activación de la vía Akt-FoxO1, disminuyendo la fosforilación de ambas proteínas cuando se encuentra disminuida la expresión de PC1. En el tejido cardíaco, Akt en su forma activa o fosforilada, promueve la fusión mitocondrial [67,68]. Nuestros resultados mostraron la reducción de la fosforilación de Akt en Ser473 y FoxO1 en Ser256, lo que podría explicar el aumento de la fisión mitocondrial y la activación de mitofagia; también esta pérdida de la fosforilación de Akt puede relacionarse con la sobreactivación de la mitofagia ya que la activación de Akt se ha relacionado con la fosforilación de miembros de la familia Bcl-2 pro-supervivencia que induce la salida de contenido mitocondrial y la activación de la vía de mitofagia PINK1/Parkin [67, 69].

También se ha descrito que la activación de FoxO1 induce mitofagia a través de la activación de E3-ubiquitina ligasa Mul1 y la vía PINK1/Parkin [56, 70, 71]. Nuestros resultados mostraron que la mitofagia producida en cardiomiocitos al disminuir la expresión de PC1 podría ser modulada por FoxO1 a través de la vía Pink1/Parkin. El silenciamiento de FoxO1 revierte el reclutamiento de Parkin a las mitocondrias incluso recuperando, en parte, la morfología de la red mitocondrial. Este rescate y recuperación de la morfología mitocondrial es fundamental, considerando que un aumento de la mitofagia se ha relacionado con el desarrollo de diversas patologías cardíacas [66, 72].

El mecanismo por el cual PC1 regula el metabolismo no está completamente claro hasta ahora. Este trabajo fue principalmente descriptivo, sin embargo

representa un aporte en el conocimiento de las funciones del PC1 en el corazón. La Figura 13 muestra una recapitulación de lo determinado en este trabajo y una propuesta de modelo en el que muestra que en el cardiomiocito la disminución de la expresión de PC1 genera una pérdida de la fosforilación de Akt, así como también la de uno de sus principales efectores aguas abajo FoxO1. La disminución de la fosforilación de FoxO1 representa la pérdida de la inhibición a nivel citoplasmático y traslocación al núcleo, donde estará más activo como factor de transcripción; como factor de transcripción regula la transcripción de genes asociados a la activación de mitofagia, y esta sobreactivación de mitofagia genera un aumento en la fisión mitocondrial y disfunción metabólica. Estos eventos se asocian además a la aparición de marcadores hipertróficos. Este trabajo proporcionaría información valiosa sobre los síntomas extrarrenales reportados en pacientes con ADPKD, y aparecen algunas nuevas posibilidades de intervención terapéutica.

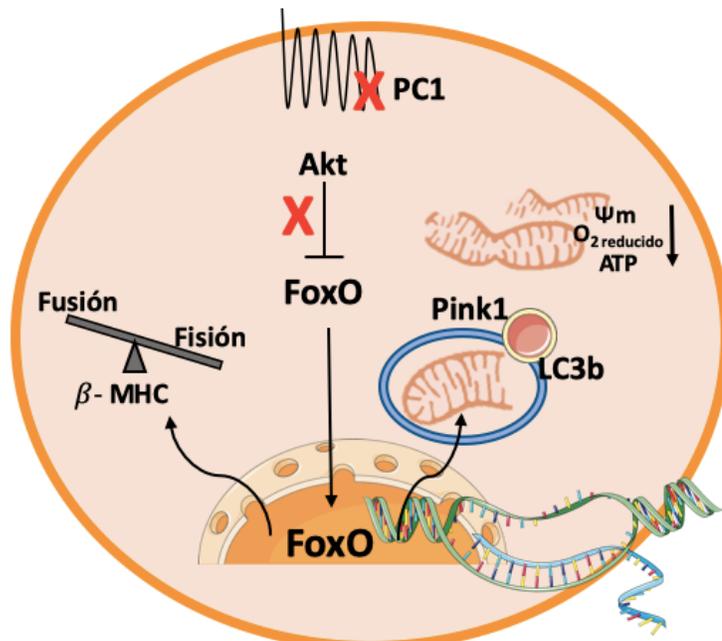


Figura 13. Modelo propuesto. PC1 regula mitofagia en cardiomiocitos, a través de un mecanismo dependiente de Akt-FoxO1

8. CONCLUSIONES

- PC1 es un mecanosensor que regula función contráctil cardíaca y la contracción depende del metabolismo oxidativo mitocondrial; si este organelo es disfuncional podría estar relacionado con patologías cardíacas y metabólicas, características de pacientes con ADPKD.
- Este trabajo establece relación entre PC1 y mitocondrias en el cardiomiocito. Si bien se estudiaron algunos marcadores de hipertrofia cardíaca, próximas investigaciones requieren ensayos en modelo animal que valide esta relación PC1 – mitocondria – función cardíaca.
- La menor expresión de PC1 desregula la dinámica mitocondrial y exagera la mitofagia.
- La pérdida de la inhibición de Akt sobre FoxO1, implica un aumento de su actividad transcripcional. FoxO1 puede activar transcripción génica de proteínas reguladoras de mitofagia. Este aumento de mitofagia mediado por FoxO1 sería el mecanismo responsable de la disfunción metabólica y morfológica de las mitocondrias en el modelo de cardiomiocitos con expresion disminuida de PC1.

9. Referencias:

1. Su, Q., et al., Structure of the human PKD1-PKD2 complex. *Science*, 2018. **361**(6406): p. eaat9819.
2. Yu, S., et al., Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(47): p. 18688.
3. Chapman, A.B., K. Stepniakowski, and F. Rahbari-Oskoui, Hypertension in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2010. **17**(2): p. 153-163.
4. Kuo, I.Y. and A.B. Chapman, Polycystins, ADPKD, and Cardiovascular Disease. *Kidney International Reports*, 2020. **5**(4): p. 396-406.
5. Delmas, P., et al., Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 11276-83.
6. Dalagiorgou, G., E.K. Basdra, and A.G. Papavassiliou, Polycystin-1: function as a mechanosensor. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(10): p. 1610-3.
7. Chauvet, V., et al., Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest*, 2004. **114**(10): p. 1433-43.
8. Talbot, J.J., et al., Polycystin-1 regulates STAT activity by a dual mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(19): p. 7985-90.
9. Arnould, T., et al., The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J Biol Chem*, 1998. **273**(11): p. 6013-8.
10. Dere, R., et al., Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9239.
11. Pedrozo, Z., et al., Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca²⁺ Channel Protein Stability. *Circulation*, 2015. **131**(24): p. 2131-2142.
12. Córdova-Casanova, A., et al., Mechanical stretch increases L-type calcium channel stability in cardiomyocytes through a polycystin-1/AKT-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2018. **1865**(2): p. 289-296.

13. Altamirano, F., et al., Polycystin-1 Assembles With Kv Channels to Govern Cardiomyocyte Repolarization and Contractility. *Circulation*, 2019. **140**(11): p. 921-936.
14. Torres, J.A., et al., Ketosis Ameliorates Renal Cyst Growth in Polycystic Kidney Disease. *Cell Metabolism*, 2019. **30**(6): p. 1007-1023.e5.
15. Shillingford, J.M., et al., The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(14): p. 5466-71.
16. Chiaravalli, M., et al., 2-Deoxy-d-Glucose Ameliorates PKD Progression. *J Am Soc Nephrol*, 2016. **27**(7): p. 1958-69.
17. Magistroni, R. and A. Boletta, Defective glycolysis and the use of 2-deoxy-d-glucose in polycystic kidney disease: from animal models to humans. *Journal of Nephrology*, 2017. **30**(4): p. 511-519.
18. Di Mise, A., et al., Activation of the Calcium-Sensing Receptor Corrects the Impaired Mitochondrial Energy Status Observed in Renal Polycystin-1 Knockdown Cells Modeling Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2018. **5**(77).
19. Ishimoto, Y., et al., Mitochondrial Abnormality Facilitates Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mol Cell Biol*, 2017. **37**(24).
20. Lin, C.-C., et al., A cleavage product of Polycystin-1 is a mitochondrial matrix protein that affects mitochondria morphology and function when heterologously expressed. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 2743.
21. Kolwicz, S.C., et al., Abstract 16484: Maintaining Cardiac Fatty Acid Oxidation in Pressure-Overload Hypertrophy Preserves Function and Energetics. *Circulation*, 2011. **124**(suppl_21): p. A16484-A16484.
22. Peterzan, M.A., et al., Metabolic remodeling in hypertrophied and failing myocardium: a review. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2017. **313**(3): p. H597-H616.
23. Aronsen, J.M., W.E. Louch, and I. Sjaastad, Cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics: clinical perspectives. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 2016. **50**(2): p. 65-77.

24. Galluzzi, L., et al., Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res*, 2012. **111**(9): p. 1198-207.
25. Cloonan, S.M. and A.M. Choi, Mitochondria in lung disease. *J Clin Invest*, 2016. **126**(3): p. 809-20.
26. Drake, L.E., et al., Expanding perspectives on the significance of mitophagy in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2017. **47**: p. 110-124.
27. Pernas, L. and L. Scorrano, Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual Review of Physiology*, 2016. **78**(1): p. 505-531.
28. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, Cell death: critical control points. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 205-19.
29. Kuznetsov, A.V. and R. Margreiter, Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *International journal of molecular sciences*, 2009. **10**(4): p. 1911-1929.
30. Cipolat, S., et al., OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(45): p. 15927.
31. Delettre, C., et al., Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, 2000. **26**(2): p. 207-10.
32. Twig, G., et al., Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo j*, 2008. **27**(2): p. 433-46.
33. Chan, D.C., Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet*, 2012. **46**: p. 265-87.
34. Yoo, S.-M. and Y.-K. Jung, A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Molecules and cells*, 2018. **41**.
35. Bragoszewski, P., M. Turek, and A. Chacinska, Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system. *Open Biol*, 2017. **7**(4).
36. Vásquez-Trincado, C., et al., Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *The Journal of Physiology*, 2016. **594**(3): p. 509-525.

37. Gao, F., et al., The mitochondrial protein BNIP3L is the substrate of PARK2 and mediates mitophagy in PINK1/PARK2 pathway. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(9): p. 2528-38.
38. Shirihai, O.S., M. Song, and G.W. Dorn, 2nd, How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circulation research*, 2015. **116**(11): p. 1835-1849.
39. Szydłowski, M., E. Jabłońska, and P. Juszczynski, FOXO1 transcription factor: a critical effector of the PI3K-AKT axis in B-cell development. *Int Rev Immunol*, 2014. **33**(2): p. 146-57.
40. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(11): p. 657-64.
41. Brunet, A., et al., Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
42. Kousteni, S., FoxO1: A molecule for all seasons. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011. **26**(5): p. 912-917.
43. Ni, Y.G., et al., FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(51): p. 20517-22.
44. Bugger, H. and E.D. Abel, Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, 2014. **57**(4): p. 660-671.
45. Ning, Y., Z. Li, and Z. Qiu, FOXO1 silence aggravates oxidative stress-promoted apoptosis in cardiomyocytes by reducing autophagy. *J Toxicol Sci*, 2015. **40**(5): p. 637-45.
46. Chistiakov, D.A., A.N. Orekhov, and Y.V. Bobryshev, The impact of FOXO-1 to cardiac pathology in diabetes mellitus and diabetes-related metabolic abnormalities. *International Journal of Cardiology*, 2017. **245**: p. 236-244.
47. Chlopcíková, S., J. Psotová, and P. Míketová, Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2001. **145**(2): p. 49-55.
48. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 2008. **3**(6): p. 1101-1108.

49. Parra, V., et al., Inhibition of mitochondrial fission prevents hypoxia-induced metabolic shift and cellular proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. **1863**(11): p. 2891-2903.
50. Dutkiewicz, R. and M. Nowak, Molecular chaperones involved in mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Inorg Chem*, 2018. **23**(4): p. 569-579.
51. Scarpulla, R.C., Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(7): p. 1269-78.
52. Srinivasan, S., et al., Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2017. **1858**(8): p. 602-614.
53. Guan, R., et al., Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke. *J Biomed Sci*, 2018. **25**(1): p. 87.
54. Pennanen, C., et al., Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca²⁺-calcineurin signaling pathway. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 12): p. 2659-71.
55. Molkentin, J.D., et al., A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 215-28.
56. Li, W., et al., FoxO1 Promotes Mitophagy in the Podocytes of Diabetic Male Mice via the PINK1/Parkin Pathway. *Endocrinology*, 2017. **158**(7): p. 2155-2167.
57. Sengupta, A., J.D. Molkentin, and K.E. Yutzey, FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 2009. **284**(41): p. 28319-31.
58. Becker, D., et al., Impaired interdomain communication in mitochondrial Hsp70 results in the loss of inward-directed translocation force. *J Biol Chem*, 2009. **284**(5): p. 2934-46.
59. Ugalde, C., et al., Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(6): p. 659-67.
60. Wai, T. and T. Langer, Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 2016. **27**(2): p. 105-117.
61. El-Hattab, A.W., et al., Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Mol Genet Metab*, 2018. **125**(4): p. 315-321.
62. Marsboom, G., et al., Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a

- novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circ Res*, 2012. **110**(11): p. 1484-97.
63. Hu, C., Y. Huang, and L. Li, Drp1-Dependent Mitochondrial Fission Plays Critical Roles in Physiological and Pathological Progresses in Mammals. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(1).
 64. Osellame, L.D., T.S. Blacker, and M.R. Duchon, Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 2012. **26**(6): p. 711-723.
 65. Tronstad, K.J., et al., Regulation and quantification of cellular mitochondrial morphology and content. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(35): p. 5634-52.
 66. Lavadero, S., et al., Autophagy in cardiovascular biology. *J Clin Invest*, 2015. **125**(1): p. 55-64.
 67. Datta, S.R., et al., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997. **91**(2): p. 231-41.
 68. Stiles, B.L., PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(14): p. 1276-82.
 69. Nechushtan, A., et al., Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO journal*, 1999. **18**(9): p. 2330-2341.
 70. Rabinowitz, J.D. and E. White, Autophagy and metabolism. *Science*, 2010. **330**(6009): p. 1344-8.
 71. Puri, R., et al., Mul1 restrains Parkin-mediated mitophagy in mature neurons by maintaining ER-mitochondrial contacts. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 3645.
 72. Yang, M., et al., Mitophagy and mitochondrial integrity in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019. **1865**(9): p. 2293-2302.