

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**FACTOR DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN-11
PREVIENE DISFUNCION MITOCONDRIAL
EN LA HIPERTROFIA CARDIACA**

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

VALERIA SORAYA GARRIDO MORENO

Director de Tesis: Dr. Sergio Lavandero González

Santiago, Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

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

VALERIA SORAYA GARRIDO MORENO

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

Directores de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero _____

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Hernán Lara (Presidente) _____

Dra. María Paz Ocaranza _____

Dr. Ramón Sotomayor _____

Dr. Carlos Figueroa _____

***Dedicada a mi familia,
en especial a mi mamá y papá
por su amor incondicional.***

Esta tesis de Doctorado se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, el cual pertenece al Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), 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 becas y proyectos:

- Beca Conicyt para Estudios de Doctorado en Chile 2014 #21140239 (VG)
- Proyecto FONDAP 15130011 (Dr. Sergio Lavandero)
- Proyecto FONDECYT 1161156 (Dr. Sergio Lavandero)

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

a) Presentaciones a congresos

- **Garrido V**, Ibarra C, Lavandero S. “Growth/differentiation factor 11 increased energetic metabolism in cardiomyocytes treated with norepinephrine”. XXXVIII Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 22-27 de septiembre del 2015, Puerto Varas, Chile.
- **Garrido V**, Ibarra C, Lavandero S. “Efecto de GDF11 sobre el metabolismo energético de cardiomiocito sometido a estímulo hipertrófico patológico con catecolaminas”. XXV Congreso Iberoamericano de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, 4-7 de diciembre del 2015, Santiago, Chile.
- **Garrido V**, Ibarra C, Lavandero S. “GDF11 exerts anti-hypertrophic and metabolic actions on cultured cardiac myocytes”. XXXIX Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 27-30 de septiembre del 2016, Puerto Varas, Chile.
- **Garrido V**, Lavandero S. “Anti-hypertrophic and metabolic effects of GDF11 on cultured cardiomyocytes”. XL Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 26-29 de septiembre del 2017, Puerto Varas, Chile.
- **Garrido V**, Navarro M, López-Crisosto C, Ibarra C, Lavandero S. “GDF-11 prevents alterations in mitochondrial metabolism and ER-mitochondria communication triggered by norepinephrine in cardiomyocytes”. XXXIII Reunión anual Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas e Internacional Society for Heart Research, Latin American Section, 28-31 de agosto del 2018, Reserva Ecológica Huilo Huilo, Chile.

b) Publicaciones:

- Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, **Garrido V**, Díaz A, Verdejo HE, Castro PF, García L, Lavandero S. New molecular insights of insulin in diabetic cardiomyopathy. *Frontiers in Physiology*. 2016, 7:125, 2016.2.
- **Garrido V**, Mendoza-Torres E, Díaz A, Pizarro M, Bustamante M, Chavez M, Riquelme J, Ocaranza MP, Allende M, Lavandero S. Novel therapies targeting cardioprotection and regeneration. *Current Pharmacological Design*. 2017, 23:2592-2615.
- Torrealba N., Navarro Marquez M., **Garrido V**, Pedrozo V., Romero D., Eura Y, Villalobos E., Roa J., Chiong M., Kokame K., Lavandero S. Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor degradation. *Scientific Reports* 2017, 17;7:13402.
- **Garrido V**, Troncoso MF, Navarro-Márquez M, López-Crisosto C, Díaz-Vegas A, Cifuentes M, Lavandero S. GDF-11 prevents cardiomyocyte hypertrophy by maintaining the sarcoplasmic reticulum- mitochondria communication. *Pharmacological Research* (en prensa, 2019)

c) Proyectos de difusión científica:

- Villa M, Mendoza-Torres E, **Garrido V**. “Jornadas de iniciación científica para estudiantes de enseñanza media de colegios municipales enfocadas en enfermedades cardiovasculares y cáncer”. Concurso “Proyectos académicos de estudiantes de postgrado de la Universidad de Chile”. Convocatoria 2015 – 2016, Agosto-Octubre del 2016, Santiago, Chile

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Sergio Lavandero por confiar en mí a pesar de mi poca experiencia, ayudarme a continuar este camino y cumplir mis sueños. Mil gracias profe.

A los profesores que dirigen a nuestro grupo, Dr. Mario Chiong, Dra. Valentina Parra y Dra. Lorena García, por su ayuda y apoyo. A la Sra Gindra y Don Fidel por gestionar nuestras necesidades en el trabajo con buena disposición y cariño.

A todos mis compañeros de laboratorio durante estos 5 años de aventuras y a los amigos que hice en esta pasada: Ignacio Norambuena, Pablo Morales, Sebastián Leiva, César Vásquez, Francisca Troncoso, Camila López, Andrea Ramírez, Evelyn Mendoza, Marina García, Constanza Nuñez y en especial a Mónica Villa con quien tuve la suerte de partir el doctorado y se ha convertido en una de mis grandes amigas de la vida.

A las grandes amigas que hice en el pregrado Sandra Alberti y Carolina Franco, que han sido muy importantes en esta cruzada. Las quiero mucho.

A una de las personas que más admiro, mi hermana Silvana simplemente por ser como es, a mi sobrina Theare de quién me enorgullezco por ser una de las personas más nobles y amorosas que conozco y a mi cuñado Claudio por siempre estar allí para la familia.

A mi mamá Elianira porque cada uno de mis logros han sido gracias a su amor, empuje y a los mil sacrificios que ha hecho para sacarnos adelante. A mi papá Ricardo que se fue a la mitad de este camino pero que me enseñó mantenerme de pie y hacerle frente a la adversidad

Al comité del doctorado por aceptarme y darme la oportunidad de cumplir mis sueños. A la comisión evaluadora de la tesis por todos sus consejos y ayuda. Al Dr. Cristián Ibarra por toda su ayuda al inicio de la tesis. Y a todos aquellos que de alguna forma han aportado en el trabajo o en lo personal durante estos años.

Y por sobre todo a Dios.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
SUMARY	18
1. INTRODUCCIÓN	19
Hipertrofia cardiaca	19
Vías de señalización pro-hipertróficas en el cardiomiocito	21
Homeostasis del Ca ²⁺ e hipertrofia del cardiomiocito	23
Metabolismo celular e hipertrofia cardiaca	25
Homeostasis del Ca ²⁺ y función mitocondrial	26
Comunicación retículo sarcoplásmico-mitocondria	28
Comunicación RS-mitocondria en el cardiomiocito	29
Factor de crecimiento y diferenciación-11 (GDF11)	30
2. HIPOTESIS	34
3. OBJETIVO GENERAL	34
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
Reactivos	35
Diseño experimental	36
Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata	37
Determinación de área, perímetro y del cardiomiocito	37
Preparación de extractos celulares totales	38
Electroforesis y electrotransferencia de proteínas	38
Western blot	39
Extracción de RNA	39
Transcripción reversa	40
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	40
Determinación de los niveles intracelulares de ATP	41

Medición de la velocidad del consumo de oxígeno celular	41
Medición del potencial de membrana mitocondrial (ψ_{mt})	42
Medición de los niveles Ca^{2+} citoplasmático	42
Medición de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial	43
Estudio de la colocalización RS-mitocondria mediante inmunofluorescencia	43
Determinación de la concentración de NE mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).	44
Evaluación de la morfología mitocondrial	44
Análisis estadístico	44
6. RESULTADOS	45
Evaluación de la estabilidad de NE en el medio de cultivo	45
Evaluación de la bioactividad de NE en el cardiomiocito	46
Efecto hipertrófico de NE mediado por receptores α_1 -adrenérgicos	47
Determinación de la concentración bioactiva de GDF11 en el cardiomiocito	49
Evaluación de la expresión de GDF11 en cardiomiocitos.	50
Evaluación del efecto anti-hipertrófico de GDF11 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata.	50
Resultados objetivo 1: Evaluar si GDF11 previene la disminución del metabolismo energético mitocondrial dependiente de NE.	53
Resultados objetivo 2: Determinar in vitro si GDF11 previene la pérdida de la comunicación física y funcional del retículo sarcoplásmico-mitocondria inducida por NE.	53
Evaluación de cambios en la dinámica mitocondrial	65
7. DISCUSIÓN	66
Efecto de la NE en el desarrollo de hipertrofia cardíaca	66
Bioactividad del GDF11 en el cardiomiocito	68
Efecto del GDF11 en la hipertrofia cardíaca	69

Efecto del GDF11 en el metabolismo energético mitocondrial	70
Efecto del GDF11 sobre el Ca ²⁺ mitocondrial	72
Efecto del GDF11 sobre la comunicación RS-mitocondria	73
Efecto del GDF11 en los niveles citoplasmáticos de Ca ²⁺	74
8. CONCLUSIONES	78
9. REFERENCIAS	79

TABLA DE FIGURAS

Figura 1.	Principales vías de señalización pro-hipertróficas activadas por NE a través del receptor α_1 -adrenérgico (α_1 -AR) en el cardiomiocito	23
Figura 2.	Efecto de NE en el metabolismo energético del cardiomiocito	27
Figura 3.	Participación del acoplamiento RS-mitocondria en la captación de Ca^{2+} por la mitocondria	30
Figura 4.	Efecto del GDF11 sobre la hipertrofia cardiaca por envejecimiento	32
Figura 5.	GDF11 previene la hipertrofia inducida por fenilefrina o testosterona dependiente de la vía Smad2/3	29
Figura 6.	Diseño experimental	37
Figura 7.	Evaluación de la vida media de NE en el medio de cultivo	47
Figura 8.	NE mantiene su bioactividad en los cardiomiocitos hasta 48 h después del inicio del tratamiento	48
Figura 9.	El bloqueador α_1 -adrenérgico prazosina previno los aumentos del área y perímetro celular inducidos por NE en cardiomiocitos	45
Figura 10.	Determinación de la concentración óptima de GDF11 que produce máxima fosforilación de Smad3	50
Figura 11.	GDF11 presenta baja expresión de su mRNA en el cardiomiocito de rata neonata	51
Figura 12.	GDF11 previene el fenotipo hipertrófico inducido por NE en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata	53
Figura 13.	GDF11 previene el aumento de la expresión del biomarcador de hipertrofia ANP inducido por NE en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata	54
Figura 14.	GDF11 previene la disminución en los niveles intracelulares de ATP inducido por NE en el cardiomiocito	55
Figura 15.	GDF11 previene la disminución en la velocidad de uso de O_2 inducido por NE en el cardiomiocito	56
Figura 16.	GDF11 no previene las alteraciones del ψ_{mt} inducidas por NE en cardiomiocitos.	57
Figura 17.	GDF11 previene la disminución en la captación del Ca^{2+} por la mitocondria inducida por NE en el cardiomiocito	59
Figura 18.	La colocalización entre GRP75 (mitocondria) y calnexina (RS) no muestran cambios significativos entre las diferentes condiciones	60

Figura 19.	GDF11 previene la disminución en la colocalización entre RS y mitocondria inducida por NE en el cardiomiocito	61
Figura 20.	GDF11 previene el aumento de los niveles citoplasmáticos de Ca ²⁺ inducidos por NE en el cardiomiocito	62
Figura 21.	GDF11 previene el aumento en la expresión de la proteína RCAN1 inducida por NE	64
Figura 22.	GDF11 previene el fenotipo fisionado mitocondrial inducido por NE	66
Figura 23.	Modelo propuesto para el efecto farmacológico del GDF11 en el cardiomiocito	75

ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
$\alpha 1\text{-AR}$	Receptor alfa-1 adrenérgico
ActRIIA	Receptor de activina de tipo IIA
ActRIIB	Receptor de activina del tipo IIB
ALK4/5/7	Receptor de activina I 4/5/7
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
Ang II	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético auricular
AR	Receptor adrenérgico
AT1R	Receptor de angiotensina II subtipo 1
ATP	Adenosina trifosfato
BNP	Péptido natriurético cerebral
BSA	Albúmina de suero bovino
CaMKII	Calcio/Calmodulina proteína quinasa
CaN	Calcineurina
CCCP	carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
cDNA	Acido deoxirribonucleico complementario
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Ciclo umbral
DAG	Diacilglicerol
DME	<i>"Dulbecco modified Eagles minimal essential medium"</i>
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
ET-1	Endotelina 1
ETAR	Receptor de endotelina 1 tipo A
ETBR	Receptor de endotelina 1 tipo B
F	Intensidad de la fluorescencia a un tiempo t
FADH ₂	Dinucleótido de adenina y flavina
FAK	Quinasa de adhesión focal

FBS	Suero fetal bovino
FCS	Suero fetal de ternera
Fo	Intensidad de la fluorescencia a tiempo 0
FoxO 2/3	<i>"Forkhead box O2/3"</i>
GDF11	Factor de crecimiento y diferenciación 11
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GRP75	<i>"Glucose-regulated protein 75"</i>
h	Hora
HC	Hipertrofia cardiaca
HDAC	Histona deacetilasa
IC	Insuficiencia cardiaca
INE	Instituto Nacional de Estadística
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
IP3R	Receptor de IP3
ISDH	Isocitrato deshidrogenasa
Kd	Constante de disociación
KDa	kilo Daltons
KDH	Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa
LTCC	Canal de calcio dependiente de voltaje
mA	Mili Ampere
MAMs	Membranas asociadas a mitocondrias
MCU	Transportador de calcio mitocondrial
MEC	Matriz extracelular
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
min	Minuto
mL	Mililitro
MMP	Metaloproteasas
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NCLX	Intercambiador de Na ⁺ /Ca ²⁺ mitocondrial

NCX	Intercambiador Na ⁺ / Ca ²⁺
NE	Norepinefrina
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-Cell
nM	nano Molar
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	peso/volume
PAPBN1	<i>"Poly(A) Binding Protein Nuclear 1"</i>
PBS	Solución buffer fosfato
PDH	Piruvato deshidrogenasa
Pi	Pirofosfato
PKA	Proteína quinasa A
PLB	Fosfolamban
PLC β	Fosfolipasa C beta
PSF	<i>"Point Spread function"</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa
r.p.m	revoluciones por minuto
RCAN1	Proteína reguladora de calcineurina 1
ROI	Región de interes
RS	Retículo sarcoplásmico
RYRs	Receptores de rianodina
s	Segundo
SDS	Sodio dodecil sulfato
SERCA2a	ATPasa de Calcio de retículo sarco/endoplásmico
SKA	Actina esquelética tipo alfa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TMRM	tetrametilrodamina metil éster perclorato
V	Volt
VDAC	Canal de anión dependiente de voltaje
α -MHC	Isoforma alfa de la cadena pesada de miosina

β 1-AR	Receptor β 1-adrenérgico
β 2-AR	Receptor β 2-adrenérgico
β -MHC	isoforma β de la cadena pesada de miosina
ψ mt	Potencial mitocondrial