



TESIS DE MAESTRÍA

PEDECIBA BIOLOGÍA SUB-ÁREA: BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

*GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS Y
PRODUCTOS FINALES DE GLICOSILACIÓN
AVANZADA EN EL CORAZÓN DIABÉTICO.
EFECTOS DEL RESVERATROL*

LIC. VERÓNICA BERVEJILLO IGLESIAS

LABORATORIO DE SEÑALIZACIÓN CELULAR Y NANOBIOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

TUTOR: JUAN C. BENECH

I. ABREVIATURAS	4
II. ÍNDICE DE FIGURAS	4
III. ÍNDICE DE TABLAS	4
IV. RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 DIABETES	6
TIPOS DE DIABETES	7
1.2 ESTRÉS OXIDATIVO	12
1.3 SIRT1	14
1.4 RESVERATROL	16
1.5 GLICOSILACIÓN	18
1.6 AGES	20
1.7 RELACIÓN ENTRE AGES Y SIRT1	24
2. HIPÓTESIS	26
2.1 JUSTIFICACIÓN	26
3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	27
3.1 OBJETIVO GENERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS	28
4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	28
4.2 WESTERN BLOT	29
4.3 PREPARACIÓN MUESTRAS PARA CORTES HISTOLÓGICOS	30
4.4 INMUNOFLUORESCENCIA	31
4.5 GLICOSILACIÓN DE PROTEINAS	31
4.6 ESTIMACIÓN DE PESO MOLECULAR	32
4.7 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE	32
4.8 ESTADÍSTICA	33
5. RESULTADOS	34

5.1	EXPRESIÓN DE SIRT1	34
5.2	ACTIVIDAD SIRT1	34
5.3	GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS	36
5.4	AGES	38
5.5	AGES EN CORTES HISTOLÓGICOS DE CORAZÓN	39
<hr/>		
6.	DISCUSIÓN	42
6.1	EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE SIRT1	42
6.2	GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS Y AGES	44
<hr/>		
6.	CONCLUSIÓN	50
<hr/>		
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	51
<hr/>		
8.	AGRADECIMIENTOS	52
<hr/>		
9.	BIBLIOGRAFÍA	53

i. ABREVIATURAS

N- Carboximetilisina.....	CML
Control con resveratrol.....	C+RSV
Control.....	C
Desviación estándar.....	SD
Diabetes Mellitus.....	DM
Diabético con resveratrol.....	D+RSV
Diabético.....	D
Especies reactivas de nitrógeno.....	RNS
Especies reactivas de oxígeno.....	ROS
Estreptozotocina.....	STZ
Estrés oxidativo.....	OS
Matriz extracelular.....	ECM
Productos finales de glicosilación avanzada (advanced glycation end products).....	AGEs
Resveratrol.....	RSV
Western Blot.....	WB

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> DIABETES	6
<i>Figura 2</i> SIRT1	14
<i>Figura 3</i> RESVERATROL	16
<i>Figura 4</i> RSV-SIRT1	17
<i>Figura 5</i> EXPRESIÓN de SIRT1	34
<i>Figura 6</i> p53Ac /p53	35
<i>Figura 7</i> ACTIVIDAD SIRT1	36
<i>Figura 8</i> TINCIÓN CON REACTIVO DE SCHIFF'S	36
<i>Figura 9</i> TINCIÓN CON COOMASSIE	36
<i>Figura 10</i> CARACTERIZACIÓN ANTICUERPO ANTI-AGE	38
<i>Figura 11</i> AGEs	39
<i>Figura 13</i> INMUNOHISTOQUÍMICA AGES II	41

iii. ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1</i> ANTICUERPOS	30
<i>Tabla 3</i> PESOS MOLECULARES GELES COOMASSIE	37
<i>Tabla 2</i> PESOS MOLECULARES GELES GLICOSILACIÓN	37
<i>Tabla 4</i> PESOS MOLECULARES AGEs	39

iv. RESUMEN

La diabetes mellitus es un desorden sistémico crónico que afecta a millones de personas en el mundo. En este trabajo nos enfocamos en el estudio de efectos que produce la Diabetes tipo 1 en el corazón. La patogénesis de la cardiomiopatía diabética es multifactorial. Los principales mecanismos patogénicos se dividen en: alteraciones metabólicas, fibrosis intersticial, enfermedad microvascular, disfunción autonómica, presencia de hipertrofia del miocardio, falla en las proteínas contráctiles, acumulación de proteínas de la matriz extracelular, alteración de la homeostasis iónica, formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), producción de especies reactivas del oxígeno y disminución de la función del ventrículo izquierdo, entre otras. En el presente trabajo se utilizaron ratones CD1 a los que se les indujo diabetes tipo 1 a través de la administración de estreptozotocina. La hipótesis planteada fue que el Resveratrol (un flavonoide natural, con acción antioxidante y activador de SIRT1), a través de la activación de SIRT1, tiene efecto directo sobre los AGEs endógenos revirtiendo la glicosilación avanzada en el ventrículo izquierdo de corazones de ratones con diabetes tipo 1. En nuestro modelo experimental, no se detectaron cambios significativos en la expresión de SIRT1 ni en presencia de diabetes ni en animales diabéticos tratados con resveratrol. Sin embargo la actividad de esta enzima se vio muy disminuida en presencia de la patología, pero no fue modificada por el tratamiento con resveratrol. Por otro lado, se obtuvieron los patrones de bandas glicosiladas y de proteínas que formaron AGEs, comprendidas entre 250 y 20 KDa, de los diferentes grupos de ratones. En ninguno de los casos se encontraron grandes diferencias. Por último, por inmunofluorescencia se detectó una señal específica de anticuerpo anti-AGE únicamente en cortes de ventrículo izquierdo de corazón de ratones diabéticos. Dicha señal no fue observada en ratones tratados con resveratrol. Relacionando todos los resultados se puede concluir que el efecto observado del resveratrol, en nuestro modelo experimental, no fue a través de la modificación de la actividad de SIRT1 y si muy probablemente a través de su efecto antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DIABETES

La diabetes mellitus (DM) es un desorden sistémico crónico que afecta a millones de personas en el mundo (Vassort & Turan 2010). En Figura 1 se muestran los datos proporcionados por la Federación Internacional de Diabetes, en su actualización 2014 tanto a nivel mundial como para Sudamérica en particular (Federación Internacional de Diabetes 2013). La Organización Mundial de la Salud define a la Diabetes como “una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce” (OMS, 2015). La insulina es una hormona segregada por el páncreas que permite que la glucosa ingrese a las células del organismo, en donde se será utilizada como fuente de energía.

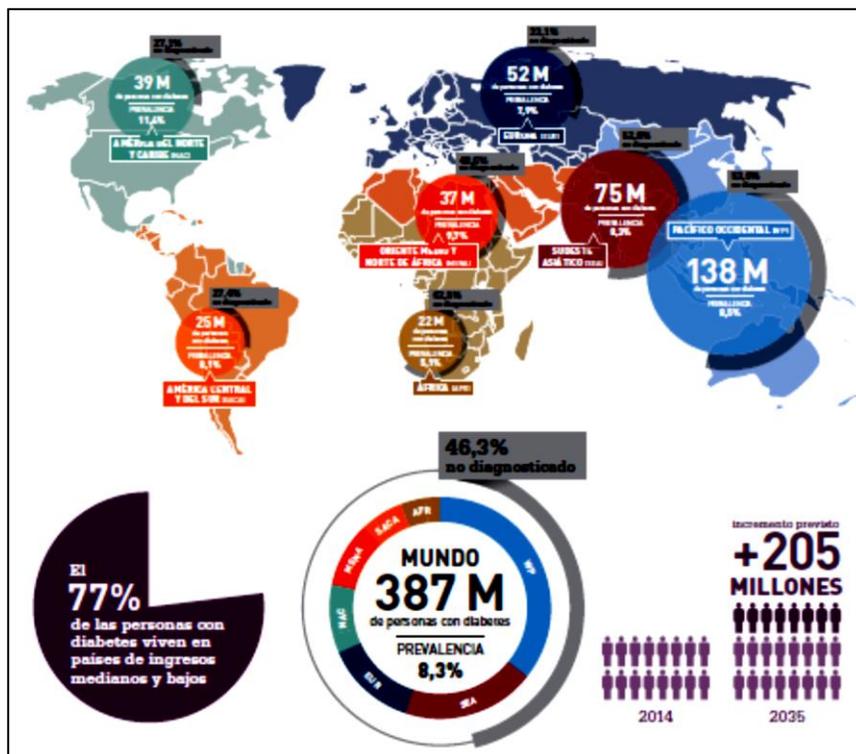


Figura 1 **DIABETES** Datos proporcionados por la Federación Internacional de Diabetes, en su actualización 2014 (Figura extraída de www.idf.org).

Una de las características más saliente de la DM es la hiperglicemia crónica. A su vez, también se

exhiben anomalías metabólicas en hidratos de carbono, lípidos y proteínas que son el resultado de los bajos niveles de insulina (que alteran su actividad o función multimetabólica), del nivel de los receptores de insulina, de defectos en sistemas de transducción de señales, y/o defectos genéticos (Kharroubi & Darwish 2015). Cascadas de señalización mediadas por la insulina (por ejemplo, la fosforilación de sustratos del receptor de la insulina, la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa, activación de Akt y otras proteínas regulatorias, la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática) son responsables del nivel normal de captación de glucosa dependiente de la insulina a nivel fisiológico. En la diabetes mellitus, se puede observar la inactivación de Akt y la pérdida de translocación de GLUT4. En respuesta al estrés oxidativo, estas vías de señalización críticas podrían ser inhibidas en varios puntos, lo que aumenta el grado de resistencia a la insulina, y por lo tanto contribuir al desarrollo del síndrome. (Brasnyó et al. 2014)

Las consecuencias de un aumento de los radicales libres así como del estrés oxidativo, y muchos factores de estrés metabólicos son muy graves en el desarrollo en la patogénesis y las complicaciones de la diabetes mellitus.

TIPOS DE DIABETES

La DM puede clasificarse en las siguientes categorías: a) Diabetes tipo 1, b) Diabetes tipo 2, c) Diabetes Gestacional, d) Tipos específicos de diabetes provocados por otras causas: diabetes monogénica (como la diabetes neonatal y MODY (maturity-onset diabetes of the young), enfermedad del páncreas exocrino, y diabetes inducida por químicos o drogas (por ej. Tratamiento para VIH/SIDA o luego de un trasplante de órgano) (American Diabetes Association 2015).

DIABETES TIPO 1

La Diabetes tipo 1 resulta de la incapacidad del cuerpo para producir insulina. Se caracteriza por la pérdida de las células β productoras de insulina de los islotes de Langerhans en el páncreas, lo que lleva

a la deficiencia de insulina. Este tipo puede ser clasificado como autoinmune o idiopática. (Cc et al. 2014)

LA momento del diagnóstico presenta como síntomas más salientes: sed anormal y sequedad de boca (polidipsia), excreción excesiva de orina (poliuria), cansancio extremo/falta de energía (astenia), apetito constante (polifagia), pérdida de peso repentina, curación de heridas más lentas, infecciones recurrentes, visión borrosa y acidosis cetónica en niños y adolescentes. Los síntomas son más severos en niños que en adultos (OMS 2015; Kharroubi & Darwish 2015; Federación Internacional de Diabetes 2013).

La Diabetes tipo 1 autoinmune constituye del 5% -10% de los pacientes diagnosticados con diabetes. Se define por la presencia de uno o más de estos marcadores autoinmunes (autoanticuerpos contra las células β pancreáticas, contra la insulina, contra la descarboxilasa del ácido glutámico GAD (GAD65), contra las tirosinas fosfatasa IA-2 y IA-2b y contra el transportador de zinc 8 (ZnT8)). (American Diabetes Association 2015; Kharroubi & Darwish 2015)

La diabetes tipo 1 es claramente un trastorno poligénico, con casi 40 loci que, se sabe, afectan la susceptibilidad de la enfermedad. La región HLA (antígenos leucocitarios humanos) en el cromosoma 6 proporciona quizás la mitad de la susceptibilidad genética que conduce a riesgo de la diabetes tipo 1. De los muchos tipos de HLA, los de clase II muestran la asociación más fuerte con diabetes tipo 1, en donde haplotipos DRB1 * 0401-DQB1 * 0302 y DRB1 * 0301-DQB1 * 0201 que confieren la mayor susceptibilidad y DRB1 * 1,501 y DQA1 * 0102-DQB1 * 0602 que proporcionan la resistencia a la enfermedad. El MHC (Complejo mayor de histocompatibilidad) Clase I también parece influir en el riesgo para la diabetes tipo 1, independiente de la molécula de clase II. De los loci restantes, sólo aquellos para la insulina VNTR, PTPN22, CTLA4, y IL2RA están asociados con un índice de probabilidad superior a 1.75. La mayoría de los loci asociados con el riesgo de la diabetes tipo 1 se cree que están involucrados con la respuesta inmune. (Atkinson et al. 2014; Kharroubi & Darwish 2015)

Para llevar a cabo el siguiente trabajo de tesis se utilizó un modelo animal de ratones CD1 a los cuales se les indujo diabetes tipo 1. En modelos animales, se administra estreptozotocina (STZ) para destruir las células β pancreáticas y de ese modo inducir diabetes tipo 1. En las células beta de los animales expuestos a STZ, el ADN se somete a la fragmentación y se activan los mecanismos de reparación. El papel crucial en la reparación del ADN se atribuye a la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Esta enzima cataliza la síntesis de poli(ADP-ribosa) a partir de NAD + (dinucleótido de nicotinamida y adenina) y su acción es generalmente beneficiosa para la célula. Sin embargo, cuando el daño en el ADN es muy alto, se produce el agotamiento del NAD⁺ intracelular y ATP, por acción del PARP-1, y como consecuencia se produce la muerte celular de las células β por necrosis. Por lo tanto, los animales con diabetes inducida por STZ se caracterizan por la hiperglucemia sustancial (Szkudelski & Szkudelska 2015).

La hiperglicemia crónica puede causar varias enfermedades a nivel del corazón, vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. Además, las personas con diabetes también corren un mayor riesgo de desarrollar infecciones. En casi todos los países de ingresos altos, la diabetes es una de las principales causas de enfermedad cardiovascular, ceguera, insuficiencia renal y amputación de extremidades inferiores. Mantener los niveles de glicemia, de tensión arterial y de colesterol cercanos a lo normal puede ayudar a retrasar o prevenir las complicaciones diabéticas. Las personas con diabetes necesitan hacerse revisiones con regularidad para detectar posibles complicaciones.

Las principales complicaciones que pueden presentar en los pacientes con diabetes son: 1) Cardiomiopatía diabética. Esta enfermedad aparece en ausencia de arteriosclerosis coronaria e hipertensión, siendo ésta una enfermedad específica que padecen los pacientes diabéticos y que ocurre en ausencia de otros factores tradicionales de riesgo cardíaco. La patogénesis de la cardiomiopatía diabética es multifactorial. Los principales mecanismos patogénicos vinculados a esta enfermedad se dividen en: alteraciones metabólicas, fibrosis intersticial, enfermedad microvascular y disfunción

autonómica (Arieta 2011), presencia de hipertrofia del miocardio, falla en las proteínas contráctiles, acumulación de proteínas de la matriz extracelular, alteración de la homeostasis iónica, formación de productos glicosilados, y disminución de la función del ventrículo izquierdo (Boudina & Abel 2010; Baur & Sinclair 2006). 2) Neuropatía. Cuando la glicemia y la tensión arterial son demasiado altas, la diabetes puede dañar los nervios de todo el organismo. El resultado podría ser problemas de digestión y de continencia urinaria, impotencia y alteración de muchas otras funciones, pero las áreas afectadas con más frecuencia son las extremidades y, especialmente, los pies. Las lesiones nerviosas en estas áreas se llaman neuropatía periférica y pueden generar dolor, hormigueo y pérdida de sensación. La pérdida de sensibilidad es especialmente importante debido a que puede hacer que las lesiones pasen desapercibidas, provocando graves infecciones, pie diabético y amputaciones. 3) Retinopatía diabética. Es una causa importante de ceguera y es la consecuencia del daño de los pequeños vasos sanguíneos de la retina que se va acumulando a lo largo del tiempo. El 1% de los casos mundiales de ceguera es consecuencia de la diabetes. En la retinopatía, la red de vasos sanguíneos que riega la retina se puede bloquear y dañar, causando una pérdida de visión permanente. 5) Nefropatía. Esta enfermedad está causada por un deterioro de los pequeños vasos sanguíneos, que puede hacer que los riñones sean menos eficientes, o que lleguen a fallar por completo (OMS 2015; Federación Internacional de Diabetes 2013; Tiwari 2014; Atkinson et al. 2014).

CARACTERÍSTICAS DEL CORAZÓN DIABÉTICO

La hiperglicemia representa uno de los factores centrales de las alteraciones metabólicas, funcionales y estructurales presentes en el corazón diabético. Alteraciones en el control de la glucosa son suficientes para desencadenar una serie de procesos aberrantes incluyendo hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, agotamiento de GLUT4, cambios en la oxidación de los ácidos grasos libres, acumulación de productos finales de glicosilación avanzada, entrega de Ca^{2+} alterada, activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y aumento de la generación de especies reactivas del oxígeno (Huynh

et al. 2014).

Uno de los mayores cambios patológicos observados en la cardiomiopatía es una anomalía en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular. Esto se atribuye a la alteración funcional de múltiples proteínas involucradas en la liberación y captación de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y la membrana del retículo sarcoplásmico (Rao et al. 2008; Adegate & Singh 2014; Turan & S. 2014). Por otro lado, el rol de la activación del sistema renina-angiotensina en el desarrollo de la cardiomiopatía en pacientes diabéticos está ampliamente descrito. La densidad del receptor de la angiotensina II y la expresión del mRNA están elevadas en corazones diabéticos. Se ha mostrado que la activación del sistema renina-angiotensina tiene una relación directa con el daño oxidativo y apoptosis de cardiomiocitos, células endoteliales y necrosis en corazones diabéticos, lo cual contribuye a un aumento de la fibrosis intersticial. En roedores diabéticos, la inhibición del sistema renina-angiotensina ha mostrado ser efectiva para la reducción de especies reactivas del oxígeno, mostrando resultados similares a la utilización de antioxidantes (Boudina & Abel 2007; Liu et al. 2014; Turan & S. 2014). Un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) se asocia con un aumento en el daño celular y pérdida de los mecanismos de reparación de ADN. Por lo tanto, la muerte celular asociada a los ROS puede promover un remodelamiento cardíaco anormal, que podría contribuir a las anomalías morfológicas y funcionales asociadas con la cardiomiopatía en diabetes (Boudina & Abel 2007). Por otro lado, las mitocondrias de corazones diabéticos son dañadas por los ROS que ellas mismas producen, disminuyendo la eficiencia en la producción de energía (Wang et al. 2006; Turan & S. 2014). Los corazones sanos producen su energía mayoritariamente de ácidos grasos libres y una pequeña proporción de la glucosa circulante. Durante un infarto, hay un aumento en el uso de la glucosa y se reduce la utilización de ácidos grasos. En contraste, los corazones diabéticos en infarto utilizan más ácidos grasos y reducen la utilización de glucosa. El aumento en el uso de ácidos grasos por los adipocitos y el hígado, resulta en un aumento en la cantidad de triglicéridos y ácidos grasos circulantes

en la sangre. A su vez, el aumento de la disponibilidad de ácidos grasos tiene como consecuencia la reducción de insulina disponible, disminuyendo así el metabolismo de la glucosa en el corazón. El exceso de dependencia a los ácidos grasos tiene a su vez como consecuencia una mayor concentración intracelular de los mismos, lo cual trae aparejado modificaciones en estos, que resultan en mecanismos apoptóticos (por ejemplo, el ácido palmítico posiblemente se convierte a ceramida) y la exposición prolongada al palmitato también daña el aparato contráctil (Wang et al. 2006; Turan & S. 2014). Algunos de los mecanismos responsables de aumentar la tensión en el miocardio resultan de una fibrosis excesiva (van Hoeven & Factor 1990) y deposición de productos finales de glicosilación avanzada (Berg et al. 1999). Estas proteínas modificadas no sólo causan daños directamente, sino que también contribuyen a la generación de ROS. Proteínas extracelulares como el colágeno y la elastina son particularmente vulnerables a la glicosilación. Esto podría disminuir la degradación del colágeno, lo cual contribuye a una acumulación del mismo (fibrosis intersticial). Los Crosslinks, en colágeno y elastina, junto con la fibrosis resultante también causan un aumento en la rigidez del miocardio y dificulta la relajación cardíaca, fenómenos típicos en la diabetes (Wang et al. 2006; Turan & S. 2014).

1.2 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo (OS) es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y capacidad de los sistemas biológicos para desintoxicar fácilmente los intermediarios reactivos o para reparar el daño resultante. Se ha establecido que el estrés oxidativo es uno de los principales factores causantes en la inducción de muchas enfermedades crónicas. (Cc et al. 2014) En individuos sanos en condiciones fisiológicas normales, estas moléculas se inactivan mediante mecanismos de defensa antioxidantes innatos, que comprende varias enzimas y compuestos que participan en una cascada que impide que las moléculas reactivas tengan efectos perjudiciales sobre la estructura y funciones de las células (Arumugam et al. 2014). Los radicales libres producidos durante el metabolismo aeróbico, en el cuerpo pueden causar daño oxidativo de aminoácidos, lípidos, proteínas y ADN. La familia de los

radicales libres generados a partir del oxígeno se llaman especies reactivas de oxígeno (Cc et al. 2014). La parte principal de los contenidos de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) son: superóxido ($O_2 \bullet^-$), hidroxilo ($\bullet OH$), peróxido ($ROO \bullet^-$) óxido nítrico, y radicales libres ($\bullet NO$) y productos de la reacciones de estos radicales libres, tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito y ($ONOO^-$) (Nikolic et al. 2014). El estrés oxidativo se ha relacionado tanto a la aparición de la diabetes como al desarrollo de sus complicaciones. Se ha demostrado que el daño oxidativo inducido por ROS y/o RNS derivadas de la hiperglicemia desempeña un papel crítico en la lesión diabética en múltiples órganos (Liu et al. 2014).

La hiperglicemia tanto en la diabetes tipo 1 como en la diabetes tipo 2 se asocia con un aumento de la producción de ROS y RNS en la mitocondria. Las mitocondrias son una fuente importante de la producción de ROS. Fuentes celulares de la generación de ROS dentro del corazón incluyen cardiomiocitos, células endoteliales y neutrófilos. ROS conduce a un daño celular a través de varios mecanismos: oxidación, interferencia con el óxido nítrico y modulación de vías de señalización intracelular perjudiciales. Por lo tanto, el aumento de ROS causa la disfunción cardíaca por el daño directo a proteínas y el ADN y mediante la inducción de apoptosis. Concentraciones elevadas de ácidos grasos libres en el corazón como resultado de una falta de metabolismo de la glucosa mediada por la insulina pueden aumentar la producción ROS y/o RNS. ROS puede conducir al daño celular a través de varios mecanismos. Por lo tanto, el aumento de ROS y/o RNS causa la disfunción cardíaca por el daño directo a proteínas y el ADN, así como mediante la inducción de apoptosis. El daño oxidativo y/o la pérdida de la defensa antioxidante también podrían estimular una serie de respuestas asociadas con la remodelación ventricular. Estos incluyen la activación de la metaloproteínasa de la matriz para alterar la arquitectura de la matriz extracelular, la modulación de las vías de transducción de señales que inician la hipertrofia de los cardiomiocitos y la apoptosis (Liu et al. 2014).

1.3 SIRT1

SIRT1, es una proteína desacetilasa de histonas de clase III, dependiente de NAD⁺, que se localiza tanto en el núcleo como en el citosol. Actúan como enzimas desacetilasa utilizando NAD⁺ para eliminar grupos ε-acetilo de los residuos de lisina de factores de transcripción, histonas y enzimas específicas en una reacción (Figura 2) que genera nicotinamida y 2'-O-acetil-ADP-ribose (D'Onofrio et al. 2015; Turkmen 2014; Control et al. 2013).

SIRT1 ejerce sus efectos citoprotectores a través de diversos mecanismos. La función principal de las sirtuinas es desacetilar las proteínas importantes para la homeostasis celular que regulan una amplia variedad de procesos con respecto a proteínas, hidratos de carbono, metabolismo lípidico, reparación del ADN, regulación de la energía, estrés oxidativo, promoción de la angiogénesis, transporte intracelular Ca²⁺, promoción de la supervivencia celular, longevidad, homeostasis mitocondrial y mecanismos de muerte celular programada, tales como la apoptosis y la autofagia (Turkmen 2014; Yacoub et al. 2014; Mohtavinejad et al. 2015; D'Onofrio et al. 2015).

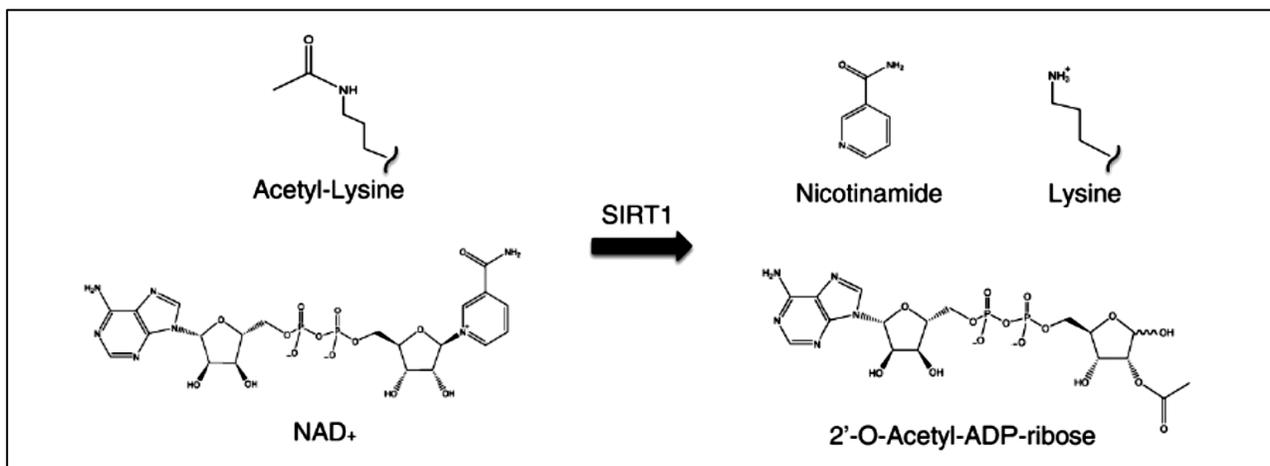


Figura 2 **SIRT1** Reacción catalizada por SIRT1 (Figura extraída de Baur 2010).

Estas funciones las ejerce principalmente a través de las interacciones con NFκB (factor nuclear kappa B), PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)g coactivator 1a) y FOXO1 (Forkhead box

protein O1). (Control et al. 2013) Por otro lado, ejercen funciones asociadas a la cromatina a través de la modulación de la información epigenética por desacetilación directa de las marcas de acetilación de histonas específicas. Por ejemplo, la desacetilación H3K9ac y H4K16Ac a través de SIRT1 está directamente asociada con su capacidad para coordinar la formación de heterocromatina constitutiva y facultativa. Otros histonas sustratos de SIRT1 son H1K27Ac, H3K9ac, H3K14Ac, H3K18Ac, H3K56Ac, H4K12Ac y H4K6Ac (D'Onofrio et al. 2015).

Una de las proteínas desacetiladas por SIRT1 es p53. El nivel de acetilación de esta proteína puede ser utilizada para medir de forma indirecta la actividad de la enzima. Cuanto mayor sea el nivel de p53 menor es la actividad de SIRT1.

El aumento del estrés oxidativo se ha asociado con el envejecimiento y SIRT1 ha demostrado combatir el estrés oxidativo mediante la modulación de las actividades transcripcionales de varias proteínas clave que intervienen en la respuesta al estrés oxidativo y la biogénesis mitocondrial. PGC-1 α es un factor de transcripción implicado en la homeostasis de lípidos y en la biogénesis mitocondrial, que protege contra el estrés oxidativo. La actividad PGC-1 α parece estar regulada por la desacetilación por SIRT1 de una manera tejido específica. La desacetilación de PGC-1 α por SIRT1 se ha observado en los músculos esqueléticos, donde la desacetilación de PGC-1 α aumenta la biogénesis mitocondrial, la masa muscular y mejora la resistencia al ejercicio (Yacoub et al. 2014). En condiciones de hiperglicemia SIRT1 disminuye la producción de glucosa hepática a través de la desacetilación y la activación de la quinasa AMPK (proteína quinasa activada por AMP) LKB1. Cuando se activa AMPK se reduce la producción hepática de glucosa, colesterol y triglicéridos y se promueve la oxidación de ácidos grasos. AMPK a su vez también activa SIRT1 mediante el aumento de su sustrato NAD⁺. Esta reciprocidad de activación / interacción dinámica entre la AMPK y SIRT1 se ve interrumpida por la hiperglucemia, que disminuye la expresión de AMPK, lo que lleva a una reducción de la expresión de SIRT1 (Yacoub et al. 2014).

SIRT1 mapea en el cromosoma 10 (10q21.3) y variantes polimórficas de este gen han sido estudiados en la relación con la susceptibilidad a varios trastornos, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes Tipo 2, tolerancia a la glucosa, perfiles de lípidos, el sobrepeso, entre otros. Variantes de la región del promotor puede dar cuenta de la expresión diferencial SIRT1, aumentando la susceptibilidad a ciertas patologías. Dos polimorfismos rs3758391 SIRT1 T / C y rs369274325 G / T se han identificado cerca del extremo 5' del gen SIRT1. Hasta ahora, el alelo T rs3758391 se ha asociado con diabetes tipo 2, así como el envejecimiento (Mohtavinejad et al. 2015), sin embargo, ningún estudio ha evaluado aún el impacto de estos dos polimorfismos en el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

1.4 RESVERATROL

El Resveratrol (RSV) (Figura 3), es un flavonoide natural que se encuentra en el orujo de las uvas rojas, el vino tinto y el maní. Se le han atribuido una gran variedad de efectos biológicos (Baur & Sinclair 2006). A través de sus propiedades antioxidantes, ha sido demostrado que previene o retarda la progresión de una variedad de enfermedades que incluyen enfermedades cardiovasculares, del cerebro y cáncer (Hung et al. 2000; Ignatowicz & Baer-Dubowska 2001; Shigematsu et al. 2003).

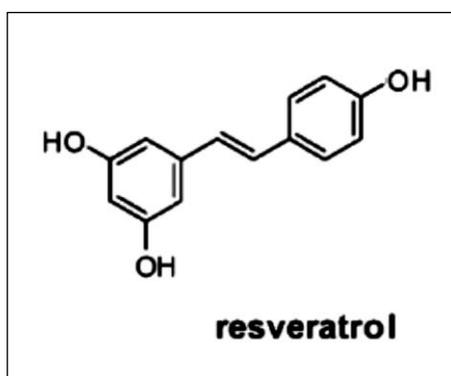


Figura 3 **RESVERATROL** Estructura química del Resveratrol. Figura extraída de Baur 2010

La activación indirecta de SIRT1 por RSV está mediada por la activación de AMPK. AMPK actúa como un sensor inicial y primario que aumenta los niveles de NAD⁺, y por ende la actividad de SIRT1, lo que

induce a una mayor desacetilación de PGC-1 α y FOXO1. Una de las formas de explicar los efectos metabólicos del RSV es por el aumento de los niveles de cAMP tanto en el músculo esquelético como en el tejido adiposo blanco mediante la inhibición de la fosfodiesterasa, ya que el RSV compite con cAMP en su sitio de unión. El aumento de cAMP citosólico activa la proteína efectora Epac1 cAMP, lo que aumenta los niveles de Ca²⁺ citosólico, induciendo así la fosforilación de AMPK vía de calcio calmodulina quinasa II. La activación de AMPK aumenta los niveles de NAD⁺, lo que conduce a la activación de SIRT1 (Organización Mundial de la Salud (OMS) <http://www.who.int>)

(Villalba & Alcaín 2012) Varios de los efectos del RSV, parecen estar relacionados con su capacidad de inducir la actividad de SIRT1. Sulaiman et al. 2010, mostraron que la actividad reducida de SIRT1 durante la diabetes tipo1, contribuye a la represión de la expresión de SERCA2a observada en esta patología y que el resveratrol, al activar SIRT1, mejora los niveles de expresión de SERCA2a y las funciones cardíacas en los ratones diabéticos. En modelos de diabetes (animales diabéticos inducidos por STZ) se ha visto que el RSV ha mejorado varios síntomas y complicaciones de la diabetes, incluyendo una reducción del estrés oxidativo y la inflamación generada durante el metabolismo de alta glucosa, y la inducción de las vías de señalización. (Park & Pezzuto 2015)

En la diabetes tipo1, el RSV ha mostrado ser capaz de disminuir los niveles de glucosa y triglicéridos. A nivel de expresión génica del efecto del RSV en la diabetes Park y Pezzuto (2015) resumieron algunos de los efectos que el tratamiento de RSV produce en el corazón. Entre ellos se destacan la disminución de Cav-1 y el aumento de p-AMPK, p-Akt, p-eNOS, HO-1, GLUT4, Cav-3, y VEGF. (Park & Pezzuto 2015).

Numerosos investigadores han reportado la habilidad de los flavonoides (incluido el resveratrol) de proporcionar protección anti-oxidante a lípidos y lipoproteínas. Si bien en varias publicaciones se le atribuye un efecto hipoglucémico al RSV, en otras se reportó que no tuvo ningún efecto sobre los niveles de glucosa en sangre (Park & Pezzuto 2015; Damián et al. 2014).

Específicamente en el páncreas, el resveratrol mejora la defensa es decir, aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa) y protege las células del daño de los radicales libres. El Resveratrol ha revertido los cambios degenerativos en las células β de ratas diabéticas inducidas por STZ-NA y se ha visto que previenen la apoptosis de las células β inducida por STZ. La disminución de la apoptosis se acompaña mediante el bloqueo de la actividad de la caspasa-3 y se debe principalmente a la inhibición de la escisión de PARP por el resveratrol. Cabe destacar que Resveratrol también atenúa la destrucción autoinmune de células β (Szkudelski & Szkudelska 2015).

1.5 GLICOSILACIÓN

La glicosilación es una modificación post-traducciona que cataliza la unión de residuos de azúcar a las proteínas. Esta modificación es crítica para una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo la fijación de células a la matriz y las interacciones proteína-ligando extracelular en la célula. Se caracteriza por varios tipos de enlaces glicosídicos, incluyendo la N- glicosilación (el glicano se une al grupo amino de asparagina en el RE), O- glicosilación (los monosacáridos se unen al grupo hidroxilo de la serina o treonina en el ER, Golgi, citosol y el núcleo), C- glicosilación (la manosa se une al anillo de indol del triptófano), la unión de glicofosfatidilinositol (núcleos de glicano se unen a un fosfolípido y una proteína) y fosfoglicosilación (el glicano se une a través de serina por enlace fosfodiéster).

La glicosilación es una función crítica de la vía de biosíntesis-secreción en el retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi. Aproximadamente la mitad de todas las proteínas normalmente expresadas en una célula se someten a esta modificación, lo que implica la adición covalente de residuos de azúcar a aminoácidos específicos. Los lípidos y proteoglicanos también pueden estar glicosilados, aumentando significativamente el número de sustratos para este tipo de modificación (Spiro 2002; Walsh 2006).

La glicosilación aumenta la diversidad del proteoma a un nivel incomparable con cualquier otra

modificación posterior a la traducción. La célula es capaz de facilitar esta diversidad, porque casi todos los aspectos de la glicosilación pueden ser modificados, incluyendo: enlace glicosídico (sitio de unión a oligosacáridos), composición de Glicanos (tipos de azúcares que están unidos a una proteína particular), estructura de glicano (cadenas ramificadas o no ramificadas) y longitud de Glicano (oligosacáridos de cadena corta o larga) (Spiro 2002; Walsh 2006).

Las enzimas que transfieren mono u oligosacáridos a partir de moléculas donantes a las cadenas de oligosacáridos nascentes o proteínas se llaman glicosiltransferasas. Cada transferasa tiene especificidad para la unión de un azúcar particular, de un donante a un sustrato y actúan de forma independiente a otras glicosiltransferasas. Las glicosidasas catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos para eliminar los azúcares de las proteínas. Estas enzimas son esenciales para el procesamiento del glicano en el ER y Golgi, y cada enzima muestra especificidad para la eliminación de un azúcar particular (por ejemplo, manosidasa) (Spiro 2002; Walsh 2006).

Los oligosacáridos están unidos covalentemente a las proteínas a través de nitrógeno u oxígeno, a serina o treonina o asparagina unidos a O- o N-oligosacáridos, respectivamente. En las proteínas-O glicosiladas, los oligosacáridos varían en tamaño de 1 a < 20 Azúcares, mostrando una alta diversidad estructural. Por otra parte, estos oligosacáridos no están distribuidos uniformemente a lo largo de la cadena peptídica; están agrupados en dominios altamente glicosilados. La N-acetilgalactosamina (GalNAc) está invariablemente ligada a Ser o Thr. Los N-oligosacáridos tienen una estructura de núcleo común de cinco azúcares y difieren en sus ramas exteriores. El primer residuo de azúcar, N-acetilglucosamina (GlcNAc) está unido a Asn incluido en una secuencia de tripéptido específico (Asn-X-Thr o Ser). Los N-oligosacáridos se clasifican en tres categorías principales: alta manosa, complejos e híbridos. Los Oligosacáridos de alta concentración de manosa tienen de dos a seis manosas adicionales vinculadas al núcleo pentasacárido y la formación de las ramas. Los Oligosacáridos de tipo complejo tienen dos o más ramas, cada uno contienen al menos un GlcNAc, un Gal, y finalmente, un ácido siálico

(SA); que pueden ser bi-, tri-, o tetracatenaria. Los oligosacáridos híbridos contienen una rama que tiene la estructura compleja y una o más ramas de alta manosa (Durand & Seta 2000).

1.6 AGEs

La reacción no enzimática entre los grupos amino libres de las proteínas, lípidos o ácidos y los grupos carbonilo de azúcares reductores u otros compuestos de carbonilo se conoce como reacción de Maillard. Esta reacción se subdivide en tres etapas principales: temprana, intermedia y tardía. En la etapa temprana, la glucosa (u otros azúcares reductores tales como fructosa, pentosas, galactosa, manosa, xilosa) reacciona con un grupo amino libre para formar un compuesto inestable, la base de Schiff que se reorganiza en productos de Amadori. El producto de Amadori se degrada a una variedad de compuestos reactivos dicarbonilo tales como glioxal, MGO, y deoxyglucosonas a través de la deshidratación, la oxidación u otras reacciones químicas. En la última etapa de la glicosilación, se forman compuestos irreversibles llamados productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) a través de reacciones de oxidación, deshidratación y ciclización (Singh et al. 2014; Ottum & Mistry 2015). La reacción de Maillard es la vía más común conocida para la formación de AGEs. No sólo durante todas las etapas de la reacción de Maillard, sino también como productos intermedios o subproductos de la autooxidación de la glucosa, la peroxidación de lípidos o la vía de polioliol, se forman compuestos reactivos de alto contenido de carbonilo, incluyendo glioxal, metilglioxal o 3-desoxiglucosona. El glioxal, por ejemplo, provoca la formación de N-(carboximetil)lisina (CML), que es en la actualidad el AGE mejor caracterizado. Otros AGEs formados por glioxal son GOLD (glyoxal-derived lysyl dimer), N-(carboximetil)arginina (CMA) o S-carboximetilcisteína (Nowotny et al. 2015). Los AGE son aductos insolubles de color amarillo-marrón, fluorescente que se acumulan en las proteínas de vida media larga lo que afecta sus funciones fisiológicas. A su vez, los AGE también pueden actuar como agentes de crosslinks entre las proteínas, lo que resulta en la producción de agregados resistentes a proteinasas. En los tejidos se han detectado más de una docena de AGEs y pueden ser divididos en tres categorías: a)

crosslinks fluorescentes b) crosslinks no fluorescentes c) No-crosslinks tales como CML (Singh et al. 2014).

La formación de AGEs aumenta progresivamente con el envejecimiento y se ha demostrado que se acumulan en el cartílago humano, el colágeno de la piel y el líquido pericárdico. Las proteínas de vida media larga especialmente el colágeno contienen numerosos restos de lisina, hidroxilisina y arginina que son propensos a la acumulación de glicosilación. Hay tres rutas para la formación AGEs: a) la vía de auto-oxidación, b) rearrreglos de Amadori, y c) a partir de la base de Schiff. Además, los seres humanos también están expuestos a AGEs exógenos que son ingeridos con los alimentos (Singh et al. 2014).

Muchos AGEs son generados por una combinación de oxidación y glicosilación de manera que la formación de los llamados productos de glicosilación se desencadena por estrés oxidativo. Dos AGEs importantes producidos por la glicosilación son pentosidina y CML. La complejidad y diversidad de la formación de AGE deja en claro por qué las sustancias que pertenecen al grupo de los AGEs son tan heterogéneas en cuanto a sus propiedades químicas y físicas. Algunos AGEs son fluorescentes; unos pocos inducen el crosslink de proteínas. Hay compuestos que muestran ambas propiedades, otros AGEs son o fluorescentes o crosslinkers. La formación de AGEs se produce intra- o extracelularmente como parte del metabolismo fisiológico. Para detectar la formación de AGEs en los fluidos y tejidos, se puede medir la fluorescencia de AGE específica. La mayoría de los AGEs hasta ahora identificados se caracterizan por fluorescencia en el área alrededor de una longitud de onda de excitación de 370 nm y una emisión de 440 nm. Además, la pentosidina emite luz a 385 nm cuando se excita a 335 nm. Otros métodos para la detección de AGEs utilizados *in vitro* e *in vivo* son anticuerpos de tinción o ensayo inmunoenzimático (ELISA) usando anticuerpos contra diferentes AGEs, por ejemplo, la CML o pentosidina. Sin embargo, la aplicación de estos métodos es a menudo limitada debido a la falta de anticuerpos fiables. Métodos más sensibles para la detección de AGEs incluyen cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases o cromatografía líquida con diferentes detectores

(Nowotny et al. 2015).

Los AGEs son factores causantes para la patogénesis de la diabetes, las cataratas, aterosclerosis y las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Singh et al. 2014). Los AGEs han sido relacionados con el desarrollo de algunas de las complicaciones diabéticas incluyendo cardiomiopatía y la alteración de la función del miocardio (Ottum & Mistry 2015). En las personas con diabetes, la formación de AGE se acelera debido a una mayor concentración de glucosa, precursores de AGEs y estrés oxidativo. En el suero y en los tejidos de los pacientes con diabetes mellitus tanto tipo 1, como tipo 2, se ha detectado el aumento de los niveles de AGE, entre ellos CML (Nowotny et al 2015). Los AGEs se unen covalentemente entre si formando crosslinks entre proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno, laminina y elastina. Estas modificaciones perjudican el proceso de degradación de colágeno, lo que conduce a un aumento de la deposición del mismo y la fibrosis, reduciendo la flexibilidad del tejido, y llevando a la disfunción del miocardio. Por otro lado, pueden causar daño de forma indirecta, a través de la formación de ROS (Ottum & Mistry 2015). Una de las razones por lo que los AGEs producen daño son las alteraciones directas en las estructuras de proteínas y funciones debido al AGE per se o al efecto de los crosslinks de algunos AGEs. Los AGE se encuentran a menudo en la matriz extracelular (ECM) y proteínas de la matriz por lo que cuando se modifican perjudican las interacciones matriz-matriz y célula-matriz. Esto puede causar la muerte celular, la diferenciación celular o la reducción de la adhesión celular y la migración. Las proteínas intracelulares también son blanco de las modificaciones y la formación de AGE también afecta sus funciones (Nowotny et al 2015).

Los niveles de AGEs en estado de equilibrio no sólo reflejan la glicemia, sino también el equilibrio de la ingesta oral, formación endógena y el catabolismo de los AGEs. Se han caracterizado al menos 2 tipos de receptores de AGE celular: RAGE y AGER (Vlassara & Uribarri 2014). Un receptor que media la endocitosis y degradación de AGE y un receptor que activa las respuestas de células. Los receptores que

se unen los AGEs e inducen la endocitosis y degradación son AGER1, AGER2, AGER3, CD36 y receptores scavenger macrófago I y II. Propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias de AGER1 están asociadas con la supresión de la expresión de RAGE y supresión resultante de NFκB, receptor del factor de crecimiento epidérmico, MAPK, vías de estrés y p66shc (Ottum & Mistry 2015). El otro tipo de receptor multiligando, RAGE, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, se cree que promueve y perpetúa la activación de las células. La unión al ligando de RAGE activa NADPH oxidasas y aumenta así la formación de ROS intracelular, lo que provoca la lesión del tejido. El aumento de ROS a su vez conduce a la formación de AGEs, lo que desencadena todos los mecanismos perjudiciales descritos mediados por AGE, pero también activa el factor de transcripción factor nuclear kappa B (NFκB) (Vlassara & Uribarri 2014; Nowotny et al. 2015). El equilibrio entre estos dos receptores puede ser crítico en el mantenimiento de la homeostasis oxidativa o la progresión a la diabetes (Ottum & Mistry 2015).

Hay dos posibilidades para proteger los tejidos contra el daño mediado por AGE: los AGE se eliminan o las células activan mecanismos compensatorios. Se ha demostrado que las células procesan otros receptores de AGEs que sean capaces de unirse a AGEs extracelulares y median su captación celular. En las células, los AGEs pueden ser degradados por el sistema endosomal-lisosomal. La catepsina D y L fueron identificadas como dos enzimas que intervienen en la desintoxicación de AGEs. Después de la digestión, los productos de degradación de AGE se liberan y circulan en el torrente sanguíneo hasta la eliminación renal (Nowotny et al 2015).

1.7 RELACIÓN ENTRE AGES y SIRT1

Una posibilidad para evitar daños mediados por RAGE, es el aumento de la expresión de AGER1. La regulación positiva suprime las vías mediada por RAGE: AGER1 inhibe la actividad de la NADPH oxidasa y debilita la generación de estrés oxidativo, así como la señalización mediada por ROS (Nowotny et al 2015). El exceso de estrés oxidativo promueve la inflamación a través de RAGE, TLR4, EGFR, y otros

receptores que regulan la actividad de NFκB, AP1, FOXO y otras vías. Por otra parte, se ha descrito que AGER1 está vinculada a SIRT1. Por ejemplo, a través de la desacetilación de NFκB SIRT1 suprime procesos proinflamatorios mediados por NFκB. La presencia de altas concentraciones de AGEs, a través de niveles altos de estrés oxidativo, son potentes supresores de NAD⁺, lo que conduce al agotamiento de SIRT1. La disminución de los niveles de SIRT1 promueve la hiperacetilación de p65 por NFκB y una mayor transcripción de genes inflamatorios, tales como TNFα, lo que contribuye a la resistencia a la insulina, a la falla de la regulación de la señalización de RAGE y el estrés oxidativo y al aumento de la inflamación. AGER1, mediante la unión a AGEs, controla muchos de estos efectos. Los efectos protectores de AGER1 pueden provenir de su cola extracelular con dominio de alta afinidad de unión a AGE que interfiere competitivamente con otras interacciones de la superficie celular de AGE que conducen a ROS (Vlassara & Uribarri 2014; Nowotny et al. 2015). Tanto AGER1 y SIRT1 se restauran después de bajar la carga oxidativa externa por la restricción de AGEs. Resumiendo, los niveles de expresión AGER1 se correlacionan positivamente con los niveles de otros mecanismos antioxidantes intracelulares (SIRT1, Nampt, SOD2, GSH) y negativamente con las vías prooxidantes (NADPH oxidasa, p66shc). Por lo tanto, suponiendo que AGER1 es importante en el mantenimiento de la homeostasis normal de AGE, la reducción de los niveles de expresión AGER1 pueden indicar un compromiso en las defensas del huésped. El receptor AGER1 normalmente suprime los efectos de los AGEs y de ROS, y puede mejorar la expresión de SIRT1 y la función de las células β, regulando positivamente la secreción de insulina (Ottum & Mistry 2015; Vlassara & Uribarri 2014).

2. HIPÓTESIS

El Resveratrol, a través de la activación de SIRT1, tiene efecto directo sobre los AGEs endógenos revirtiendo la glicosilación avanzada en ratones con diabetes tipo 1.

2.1 JUSTIFICACIÓN

El tema elegido para la realización de la tesis de maestría es la Diabetes tipo 1 en el corazón. Es sabido que dicha patología produce ROS, lo que tiene como consecuencia el estrés oxidativo. Los ROS junto con la hiperglicemia inducen la formación de productos finales de glicosilación avanzada endógenos.

Han sido reportadas la disminución en la expresión y actividad de SIRT1 en la diabetes tipo 1, así como la restauración parcial de éstas luego del tratamiento con resveratrol (Sulaiman et al. 2010). Por otra parte, ha sido demostrado el aumento de depósitos de AGEs en biopsias de corazones diabéticos humanos (Van Heerebeek et al. 2008). Sin embargo, no ha sido estudiado en el corazón diabético si el resveratrol, activador de SIRT1 y antioxidante, tiene efecto directo sobre los niveles de AGEs endógenos.

Basados en lo anteriormente expuesto, el fin de la tesis de maestría es estudiar si el Resveratrol, a través de la activación de SIRT1, tiene efecto directo en los AGEs endógenos. Asimismo, el trabajo de tesis pretende identificar qué proteínas del corazón están glicosiladas y cuáles formaron productos finales de glicosilación avanzada en la diabetes tipo 1. También se quiere estudiar si el resveratrol tiene un efecto benéfico, disminuyendo la formación de AGEs.

3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Verificar utilizando diferentes técnicas el aumento de proteínas glicosiladas y AGEs en ventrículo izquierdo de ratones diabéticos y estudiar si el resveratrol, a través de la activación de SIRT1, revierte los efectos producidos por la patología.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar los niveles de expresión de SIRT1 en homogenizados de muestras de ventrículo izquierdo de ratones C, C+RSV, D y D+RSV.
2. Comparar los niveles de actividad de SIRT1 mediante el estudio de la desacetilación de p53 en homogenizados de muestras de ventrículo izquierdo de ratones C, C+RSV, D y D+RSV.
3. Obtener el perfil de proteínas glicosiladas en 4 grupos de ratones en geles 1D.
4. Obtener el perfil de proteínas que formaron AGEs en homogenizados de muestras de ventrículo izquierdo de ratones C, C+RSV, D y D+RSV por WB.
5. Realizar un estudio comparativo por inmunofluorescencia en cortes histológicos de corazón provenientes de C, C+RSV, D y D+RSV utilizando anticuerpo anti-AGE.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para la realización del presente proyecto se utilizaron muestras obtenidas en el desarrollo del proyecto PR_FCE_2009_1_2887 “Homeostasis del Ca^{2+} en la cardiomiopatía diabética. Efecto del resveratrol en la expresión de proteínas involucradas en la señalización por Ca^{2+} y en las propiedades mecánicas del cardiomiocito medidas por Microscopía de Fuerza Atómica”, desarrollado entre el 2011 y 2013, en el laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología. En este proyecto, para inducir la diabetes tipo I, se administró estreptozotocina (Sigma, St Louis, MO, EE.UU), una droga que produce necrosis selectiva de las células β pancreática y resulta en un estado de deficiencia de insulina. Ratones CD1 machos de 1,5 meses de edad fueron inyectados con una única dosis (150 mg/kg) de una solución de STZ recién preparada en buffer citrato (pH 4,5), mientras que los animales control (n = 12) fueron inyectados con buffer citrato. Luego de la inyección, los animales fueron pesados y se midió su nivel de glicemia utilizando un ACCU-CHEK compact Plus System (Roche Diagnostics). Entre 4-7 días después de la administración de STZ, los animales con 250 mg/dl fueron considerados diabéticos y sus niveles de glicemia fueron verificados periódicamente.

Para el desarrollo de la tesis se seleccionó material guardado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de los siguientes grupos experimentales creados en el anterior proyecto: control (C), control tratado con resveratrol (C+RSV), diabético (D) y diabético tratado con resveratrol (D+RSV). El resveratrol (BML-FR104, Enzo Life Sciences, Inc.) (40 mg/kg), resuspendido en DMSO, fue inyectado día por medio en forma intraperitoneal, dada la alta solubilidad del fármaco en DMSO, los volúmenes a inyectar fueron muy pequeños (60 μl). Ni la droga ni el DMSO son irritantes. Los animales control se inyectaron únicamente con DMSO. Luego de tres meses (4,5 meses de edad), se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvieron las diferentes muestras a estudiar (Damián et al. 2014; Benech et al. 2014). Fue necesario repetir los

diferentes grupos de animales, para obtener un número suficiente de los mismos a los 4.5 meses de edad.

4.2 WESTERN BLOT

Se partió de trozos de ventrículo izquierdo de corazón provenientes de ratones control, controles tratados con resveratrol, diabéticos y diabéticos tratados con resveratrol conservados a -80°C . Basándose en la relación 1.5 ml buffer lisis / 50 mg corazón, se calcularon los mililitros de buffer de lisis para realizar el homogenizado (para 20 ml: 4 ml EGTA 100 mM, 800 μl DTT 100 mM, HEPES 0.5 M, 200 μl Tritón X-100, 2 ml Glicerol, 80 μl PMSF 100 mM (inhibidor de proteasas de serina y cisteína), 200 μl Ortovanadato de sodio 100 mM (inhibidor de fosfatasa de tirosinas) y 20 μl Coctel inhibidor de proteasas). Para preparar los homogenizados que se utilizaron para los ensayos de actividad de SIRT1, al buffer de lisis se le agregó 2 μl Tricostatina A 50 μM , (inhibidor de desacetilasas de histonas HDAC (Van Beneden et al. 2013)) utilizando homogeneizadores de vidrio. Se centrifugó el homogenizado a 14000g por 5 min, y se guardó el sobrenadante. Para finalizar, se sonicó el sobrenadante 2 veces durante 3s con %DUTY CYCLE 40 Y OUTPUT CONTROL MACRO TIP LIMIT 3 (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole Parmer Instrument Co.). Se cuantificaron las muestras mediante Ensayo Bradford (BRADFORD 1976).

Se realizó la electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 10% a 100 V, sembrando 50 μg de proteína total por carril, y peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual Color (161-0374, Bio-Rad Laboratories, Inc.) y luego se llevó a cabo la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (polyvinylidenedifluoride) Immobilon-P^{sq} Transfer membrane (ISEQ00010, MILIPORE) a 350 mA por una hora y 15 minutos a 4°C . Una vez finalizada la transferencia se bloquearon las membranas con buffer de bloqueo (TBS-T+ leche descremada 5%) por 1 hora y se incubaron overnight a 4°C en agitación constante con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) diluido en TBS-T.

Tabla 1 **Anticuerpos** (nombre / código / dilución)

ANTICUERPOS PRIMARIOS		
Anti-p53 (acetylK386)	ab52172	1:500
Anti-p53 [PAb 240]	ab26	1:1000
Anti-SIRT1 antibody	ab50517	1:750
anti-β-Actin	ab8227	1:1.000
anti-AGE	ab23722	1:2000 (WB), 1/400 (IHC)
ANTICUERPOS SECUNDARIOS		
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preadsorbed	ab150081	1:1000 (WB, IHC)
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H&L)	A11001	1:1000

En el caso de SIRT1, dado que la proteína de interés y el control de carga elegido, β actina, tienen pesos moleculares muy diferentes, la membrana fue dividida en 2 tomando como punto de corte las bandas 75 y 50 KDa del peso molecular. La membrana que contiene los pesos moleculares altos fue incubada con anticuerpo anti-SIRT1, mientras que la otra parte fue incubada con β actina. En el caso de la membrana utilizada para la caracterización del anticuerpo anti-AGE como control de carga se utilizó la membrana teñida con Rojo Ponceau. Posteriormente a los lavados del anticuerpo primario, se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 1) diluido en TBS-T. El revelado del western blot se realizó por fluorescencia utilizando el High Performance Luminescent Image Analyser (FLA-9000 Fujifilm). Se cuantificó por densitometría utilizando el programa Image J (NIH, USA). Fueron analizados por lo menos 4 animales diferentes de cada grupo por triplicado.

4.3 PREPARACIÓN MUESTRAS PARA CORTES HISTOLÓGICOS

Se fijaron las muestras con paraformaldehído 3% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Luego se realizó la crioprotección de la muestra con sacarosa 15%, overnight a 4°C, seguido de

sacarosa 30%. Se realizó la infiltración en el medio de congelamiento con sacarosa 30% (1:1) por 1 h a temperatura ambiente en agitación, y 1 h en medio de inclusión puro (0201 08926, Jung) en iguales condiciones. Las muestras fueron conservadas a -80°C. Se realizaron cortes de 10 µm en crióstato en suelo ECO modelo MEV (SLEE Technical GmbH, Mainz, Alemania).

4.4 INMUNOFLUORESCENCIA

Se delimitaron los cortes con el lápiz Super Pap Pen Liquid Blocker for IHC (SPM0928, IHCWORLD), se lavaron 3 veces con PBS + GLICINA 100 mM y se permeabilizaron 10 min con PBS 1x -TRITÓN X-100 0.1%. Luego se realizó el bloqueo por 30 min con PBS + BSA 1% + Glicina 100 mM a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpo primario anti-AGE (Tabla 1) se realizó overnight a 4°C en cámara húmeda y luego se incubó a temperatura ambiente por 1 hora con anticuerpo secundario (Tabla 1) en cámara húmeda. En todos los experimentos se realizó un control incubado sólo con secundario, como control negativo. Por último se utilizó DAPI (1µg/ml) como contratinción, para esto se incubó por 10 minutos y por último se montó el preparado con ProLong Antifade kit (p7481, Invitrogen). Desde la incubación con anticuerpo secundario en adelante el procedimiento se realizó enteramente en oscuridad. Para obtener las imágenes se utilizó microscopía de epifluorescencia se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido IX81 (Olympus), el cual tiene acoplado una cámara CCD de alta velocidad Olympus DP71. Se utilizaron los filtros dicróicos: UMNIBA3 Excitación: 470-495nm Emisión: 510-550 y U-MWU2 Excitación: 330-385nm Emisión: 420nm. Por otro lado, para adquirir las imágenes por microscopía láser confocal, se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido BX61, con módulo confocal FV3000 y con una cámara DP70 acoplada (Olympus). En este caso se utilizó el láser 488, con filtro dicróico U-MWIBA2, Ex: 460-495nm Em: 510-550nm. Se analizaron (en su totalidad) un mínimo de 5 cortes de cada corazón de 3 animales de cada grupo.

4.5 GLICOSILACIÓN DE PROTEINAS

Se llevó a cabo el protocolo sugerido por el fabricante del Schiff's Reagent (S5133, Sigma, St Louis, MO,

EE.UU). Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida 10% a 100 V, sembrando 50 µg de proteína total por carril. Se fijó el gel por 30 minutos con etanol 40% - ácido acético 7% y se lavó 30 minutos con solución de fijación fresca, este lavado se repitió 4 veces y se continuó overnight con solución de fijación fresca. Luego se oxidaron las bandas de glicoproteínas por inmersión del gel en una solución de Ác. Periódico 1% - Ác. Acético 3% por 1 hora y se lavaron los geles oxidados 10 veces con agua por 10 min cada vez, para remover las trazas de Ác. Periódico. Se sumergió el gel en Reactivo de sciff (S5133, Sigma, St Louis, MO, EE.UU) en oscuridad por 60 min. Se volvió a lavar el gel 3 veces, 10 min cada vez con metabisulfito de potasio 0,58% - Ác. Acético 3%. Se continuó lavando con esta solución cada 30 min, por al menos 1 hora o hasta que se haya eliminado el background (en caso que existiera). Por último se escaneó el gel a 525–600 nm, con un máximo de 550-570 nm utilizando el High Performance Luminescent Image Analyser (Fujifilm FLA-9000).

4.6 ESTIMACIÓN DE PESO MOLECULAR

Para estimar el peso molecular de cada una de las bandas que aparece en los geles teñidos con Azul de Coomassie y reactivo de Schiff's se utilizó el método descrito por Shapiro et al. (Shapiro et al. 1967). Se utilizó el software ImageJ (NIH, USA) para medir la distancia entre cada una de las bandas presentes, en los geles, hasta un punto de referencia marcado por encima del comienzo del carril. Se repitió el procedimiento con las bandas que se visualizaron del marcador del peso molecular, distancias que fueron utilizadas para la realización de la curva de calibración. Para estimar el peso molecular de cada una de las bandas identificadas se utilizó el software MATLAB (The MathWorks, Inc.), el cual fue programado con tal fin para estimar el peso molecular a través del cálculo del logaritmo de las distancias según lo descrito por Shapiro et al. (Shapiro et al. 1967). Para determinar cuáles son las bandas características de cada condición se tomó como criterio considerar únicamente las bandas que estuvieran presentes en todos los animales de esa condición.

4.7 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

Una vez terminada la electroforesis se fijó el gel con solución de fijación (50% v/v metanol en agua con 10% v/v ácido acético) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Luego se realizó la tinción con azul de Coomassie (0.005% - 0.1% (w/v Coomassie blue R, 50% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético) overnight agitando suavemente. Se decoloró con solución decolorante (5% (v/v) metanol y 7% (v/v) ácido acético) en agitación suave por aproximadamente 2 horas. Se equilibró el gel en solución de almacenamiento (5% (v/v) ácido acético) por al menos 1 hora. Por último se escaneó el gel.

4.8 ESTADÍSTICA

La normalidad de los datos se analizó por el test de Shapiro-Wilks y la homocedasticidad (homogeneidad de varianzas entre grupos) fue evaluada por el test de Cochran y Levene (Álvarez-Cáceres, 2007). La comparación de las diferentes variables entre grupos fue analizada por ANOVA. Las comparaciones múltiples a posterior del ANOVA fueron realizadas por la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher. Los resultados fueron expresados como media \pm DS. Se consideró diferencias significativas con $\alpha \leq 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis (Hammer et al. 2001).

5. RESULTADOS

5.1 EXPRESIÓN DE SIRT1

La Figura 4, muestra una imagen representativa de los diferentes western blot de los homogenizados de ventrículo izquierdo obtenidos de los corazones de los diferentes grupos de ratones. El análisis estadístico de estos resultados, mostró que ninguna de las comparaciones realizadas fue estadísticamente significativa. Estos datos muestran que en nuestro modelo, luego de 3 meses de diabetes tipo 1 inducida, la expresión de SIRT1 no fue afectada por la patología. Por otro lado el tratamiento con Resveratrol, tampoco tuvo efecto en la expresión de SIRT1, ni en animales sanos (C+RSV) ni en animales diabéticos (D+RSV).

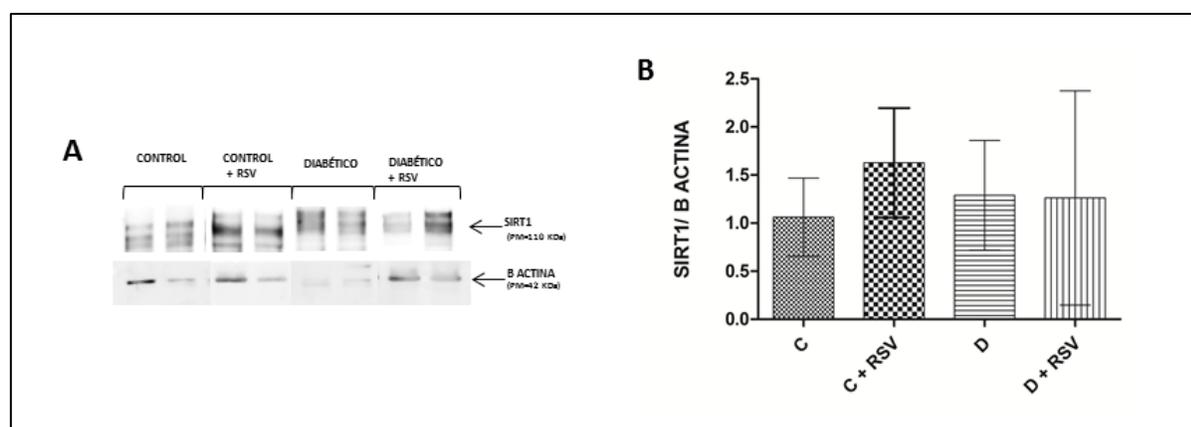


Figura 4 **EXPRESIÓN de SIRT1**. Imágenes representativas de un gel con 2 animales de cada condición. Las flechas indican las bandas correspondientes a SIRT1 (110KDa) y a β actina (42 KDa). En B) están representados gráficamente los datos obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar.

5.2 ACTIVIDAD SIRT1

En la Figura 6A se muestra un western blot representativo, con 2 animales de cada condición. En esta figura se observa una clara diferencia entre los animales control y diabéticos. En los controles la presencia de p53 acetilada es casi nula mientras que cuando está presente la patología se ve un aumento significativo de la acetilación de p53. Si tomamos como referencia el resveratrol se puede

observar que la presencia de la droga no afecta los niveles de p53 acetilada ni en presencia (D+RSV) ni en ausencia (C+RSV) de la patología.

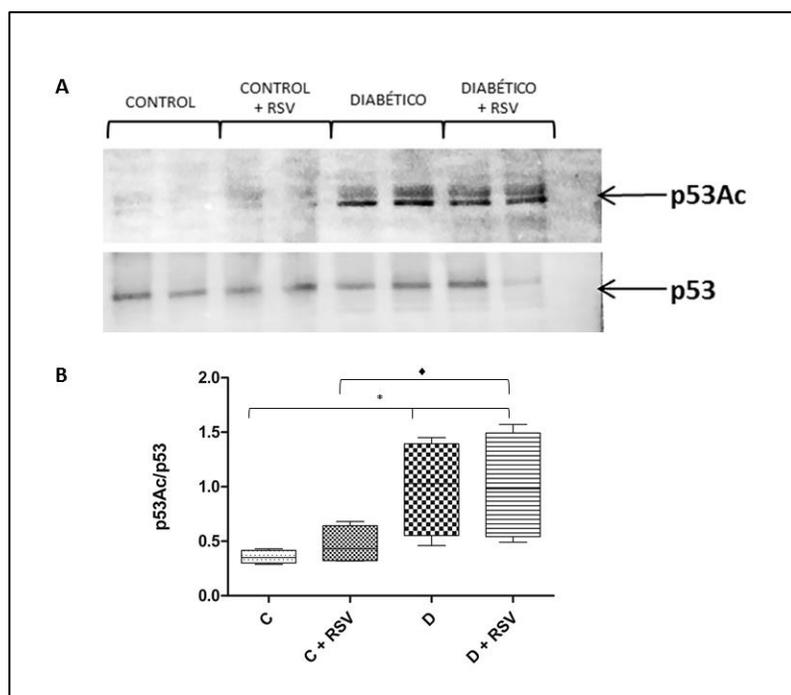


Figura 5 **p53Ac /p53**. Se muestra una imagen representativa del nivel de acetilación de p53 en C, C+RSV, D y D+RSV así como el nivel de p53 total. En B) se representan gráficamente los datos obtenidos de la relación p53 acetilada / p53 total \pm SD. * $p \leq 0.05$, ♦ $p 0.05-0.1$

Dado que el método elegido para medir la actividad de SIRT1 es indirecto, la Figura 6 no revela los resultados de la actividad. Para obtener las medidas de la actividad de SIRT1 se calculó el inverso del resultado de p53 acetilada ya que la actividad de SIRT1 está inversamente relacionada al nivel de acetilación de p53. En la Figura 7 se muestra la gráfica correspondiente a los datos de actividad de SIRT1 con sus desvíos estándar correspondientes para los 4 grupos de ratones estudiados.

La diabetes produce una disminución estadísticamente significativa de la actividad de SIRT1 tanto en presencia (D+RSV) como en ausencia (D) de tratamiento con resveratrol. Por otro lado, contrariamente a lo esperado, no existe diferencia estadísticamente significativa (*) entre el grupo control y el grupo control tratado con resveratrol. Por lo tanto, en nuestro modelo no se observó la activación de la actividad de SIRT1 por RSV. Si bien no es estadísticamente significativa la comparación entre los ratones controles tratados con resveratrol y los ratones diabéticos tratados con resveratrol, el análisis

estadístico de los resultados mostraron una tendencia (\diamond), lo que sugiere un posible efecto diferente del resveratrol en animales controles y diabéticos.

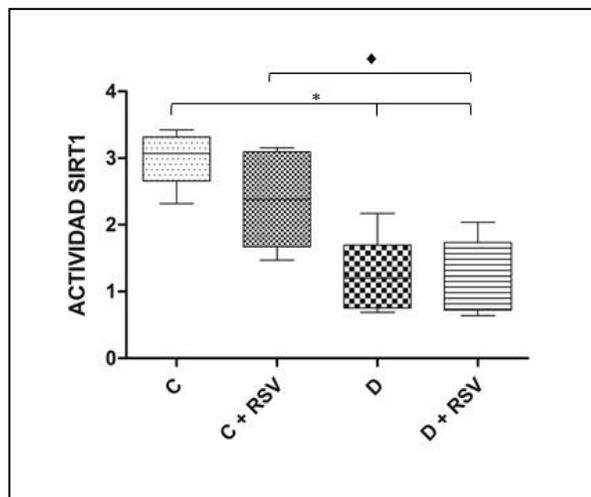


Figura 6 **ACTIVIDAD SIRT1** A) Representación gráfica de los datos correspondientes a la actividad de SIRT1 (1/(p53Ac/p53total). * $p \leq 0.05$, $\diamond p 0.05-0.1$

5.3 GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

Con el fin de obtener un perfil de proteínas característico de cada grupo, los homogenizados de ventrículo izquierdo de los animales de los diferentes grupos, fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida y luego teñidos con Azul de Coomassie (Figura 9) como describió en en material y métodos. Los resultados corresponden al análisis de por lo menos 4 animales de cada grupo.

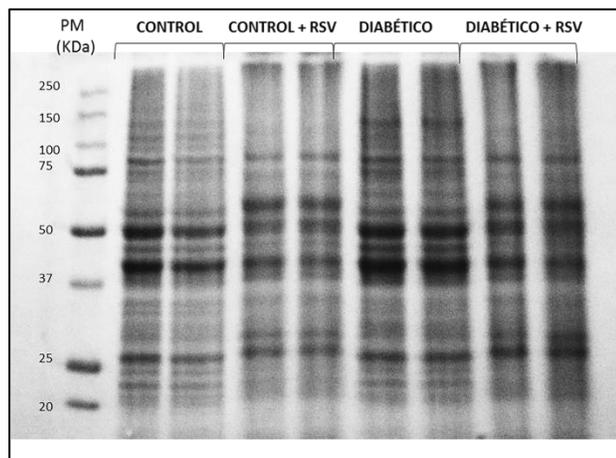


Figura 8 **TINCIÓN CON COOMASSIE**. Foto representativa de un gel con 2 animales de cada condición (C, C+RSV, D y D+RSV) teñido con azul de Coomassie.

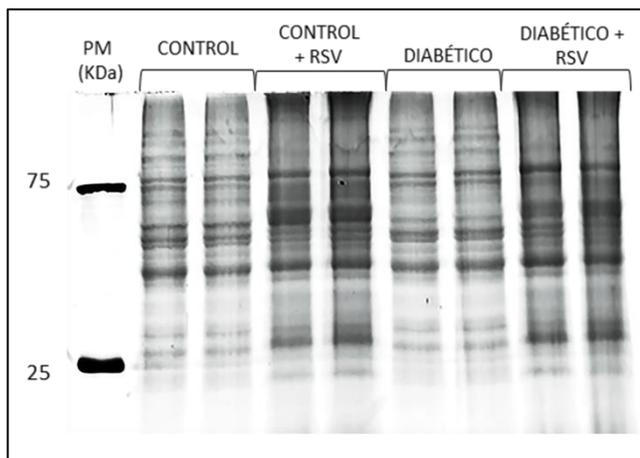


Figura 7 **TINCIÓN CON REACTIVO DE SCHIFF**. Foto representativa de un gel con 2 animales de cada condición (C, C+RSV, D y D+RSV) teñido con reactivo de Schiff's.

Considerando que la tinción con Azul de Coomassie tiñe todas las proteínas presentes en la muestra con una concentración de 100 ng o mayor, no se esperaba encontrar diferencias entre los diferentes patrones. En el caso las muestras que pertenecen a los grupos control y diabético esta suposición se cumple casi totalmente (Tabla 3). Hay solamente 2 bandas presentes en todos los animales control que no fueron detectadas en todos los animales diabéticos. En el caso de los grupos de animales tratados con resveratrol hay una menor cantidad de bandas que están presentes en todos los animales de esa condición (Tabla 3). Solamente la banda de 48KDa fue observada en todos los animales analizados de todos los grupos de ratones. Las diferentes bandas no fueron cuantificadas, pero resulta notoria la diferencia en la intensidad de la tinción observada con Azul de Coomassie en varias de las bandas cuando comparamos los diferentes grupos (Figura 9).

Tabla 3 **PESOS MOLECULARES GELES COOMASSIE**
Pesos moleculares estimados correspondientes a las bandas características para cada condición, identificadas en geles teñidos con Azul de Coomassie.

BANDAS COOMASSIE				
	CONTROL	CONTROL + RSV	DIABÉTICO	DIABÉTICO + RSV
1	140		✓	
2	128			
3	105		✓	✓
4	98	✓	✓	
5	82		✓	
6	71		✓	✓
7	61		✓	
8	55		✓	
9	48	✓	✓	✓
10	37			
11	29		✓	
12	25	✓	✓	
13	23			
14	21		✓	

Tabla 2 **PESOS MOLECULARES GELES GLICOSILACIÓN**
Pesos moleculares estimados correspondientes a las bandas de proteínas glicosiladas, características para cada condición, identificadas en geles teñidos con Reactivo de Schiff's

BANDAS GLICOSILACIÓN				
	CONTROL	CONTROL + RSV	DIABÉTICO	DIABÉTICO + RSV
1	154		✓	
2	141		✓	
3	122		✓	
4	104		✓	✓
5	96	✓	✓	✓
6	89		✓	
7	72	✓	✓	✓
8	63		✓	
9	57	✓		✓
10	48	✓	✓	✓
11	42	✓		✓
12	28	✓		✓
13	24	✓	✓	✓
14	22	✓		✓

Para visualizar las proteínas glicosiladas en el gel de poliacrilamida, se llevó a cabo el protocolo sugerido por el fabricante del Reactivo de sciff. Esta tinción permite identificar proteínas glicosiladas enzimática y no-enzimáticamente (Racusen 1979) (Figura 9). El peso molecular relativo de cada banda, también fue calculado como explicado en material y métodos. En la Tabla 2, se enumeran las bandas glicosiladas que fueron detectadas en cada uno de los grupos. En el control aparecen 14 bandas que están comprendidas entre 154 y 22 kDa. En el grupo C+RSV aparecen 5 bandas menos que en el control (154, 141, 122, 104, 89 y 63 KDa). En los ratones que presentan la patología desaparecen 4 bandas: 57, 42, 28 y 22 kDa. Por último en el grupo D + RSV faltan las mismas 5 bandas que en el control con resveratrol y aparecen las bandas que no están presentes en el grupo diabético.

5.4 AGES

Con el fin de encontrar un patrón de bandas característico de las proteínas que forman AGEs de cada grupo de ratones, se realizaron western blot utilizando un anticuerpo anti-AGEs (Tabla 1).

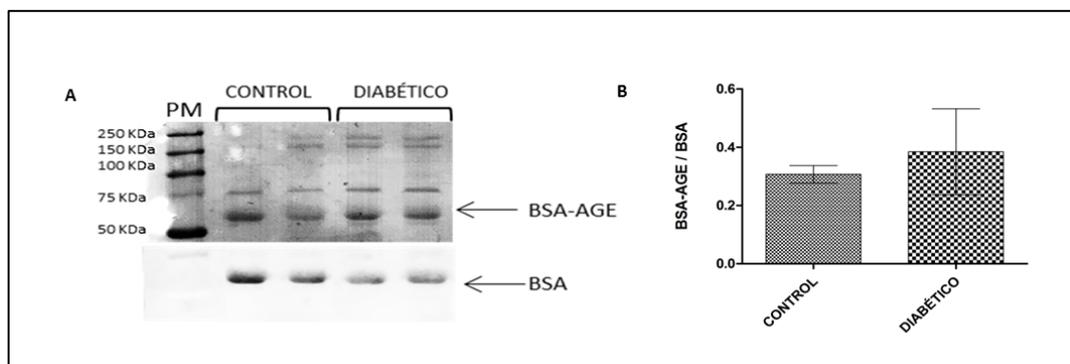


Figura 9 **CARACTERIZACIÓN ANTICUERPO ANTI-AGE**. A) identificación de BSA-AGE en suero de controles y diabéticos. B) Promedio de los datos obtenidos de la cuantificación de la banda de BSA-AGE/BSA total.

Antes de comenzar los estudios se realizó la caracterización del anticuerpo utilizado (Figura 9A). Para esto se utilizó suero proveniente de ratones control y diabético y se estudió la presencia de BSA-AGE, único AGE que el fabricante asegura que reconoce el anticuerpo. En la Figura 9 B se muestran los datos

de cuantificación. En este caso se validó la información brindada por el fabricante, ya que se identificó el complejo BSA-AGE y se constató un aumento significativo del mismo en ratones diabéticos. Además de BSA-AGE, el anticuerpo reconoce otros AGEs de los cuales no se tiene información (una banda de 75 KDa y 2 bandas entre 150 y 250 KDa) (Figura 9).

Una vez validado el anticuerpo en nuestro modelo, se realizó un western blot para identificar el patrón de bandas característico de AGEs cada uno de los grupos. En la Figura 11 se muestra una imagen representativa de una membrana de PVDF incubada con ANTI-AGE y revelada por fluorescencia, formada con 2 animales de cada uno de los grupos estudiados. Dicho estudio reveló la presencia de 4 bandas (Tabla 4).

No se observaron diferencias entre los diferentes grupos. En el único grupo que presentó una menor cantidad de bandas fue el control con resveratrol (Tabla 4, Figura 11).

Tabla 4 **PESOS MOLECULARES AGEs** Pesos moleculares estimados correspondientes a las bandas de AGEs.

BANDAS AGEs				
N° BANDA	CONTROL	CONTROL + RSV	DIABÉTICO	DIABÉTICO + RSV
1	84	✓	✓	✓
2	75	✓	✓	✓
3	48		✓	✓
4	27		✓	✓

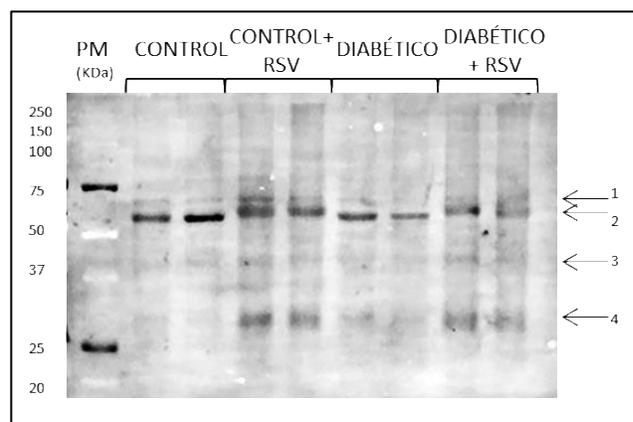


Figura 10 **AGEs** Foto representativa de una membrana de western blot con ANTI-AGE con 2 animales de cada condición (C, C+RSV, D y D+RSV). Las flechas indican las diferentes bandas reveladas en la membrana

5.5 AGEs EN CORTES HISTOLÓGICOS DE CORAZÓN

La Figura 12 muestra imágenes representativas de inmunofluorescencia (utilizando el anticuerpo anti-

AGEs, Tabla 1) obtenidas por microscopía de epifluorescencia de cortes de ventrículo izquierdo de corazones de los diferentes grupos de ratones. Las imágenes fueron obtenidas teniendo en cuenta aplicar el mismo tiempo de exposición para cada una de las capturas (obtenido en base al background observado en el control negativo).

Los cortes fueron fotografiados y se analizaron varias fotos de cada corte de corazón y se analizó la ausencia o presencia de señal para el anticuerpo anti-AGE (Figura 12).

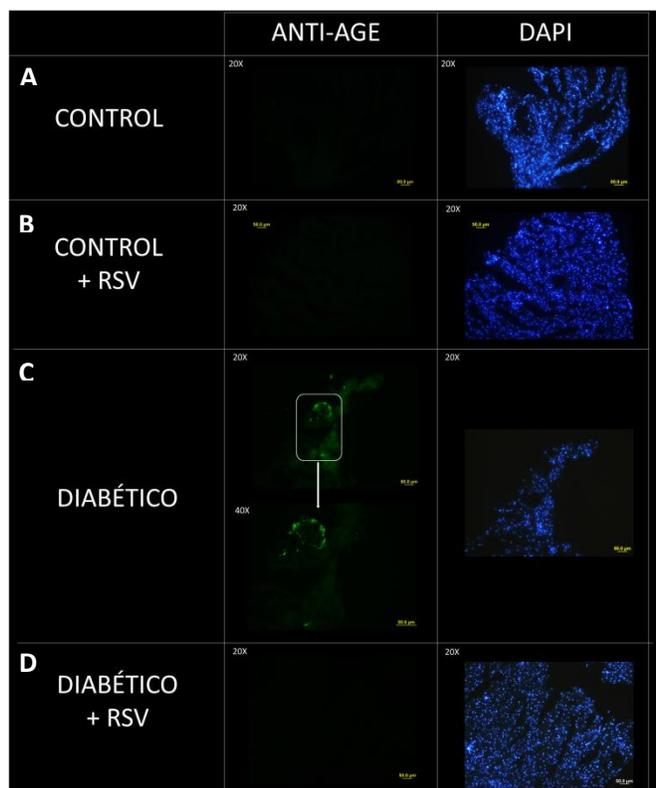


Figura 11 **INMUNOFUORESCENCIA AGEs I** Se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de 10 μm de ventrículo izquierdo de corazón con anticuerpo anti-AGE y DAPI. A) Control, B) Control tratado con resveratrol C) Diabético y D) Diabético tratado con resveratrol. La barra de escala corresponde a 50 μm .

En la Figura 12 se muestran imágenes obtenidas a 20 x tanto para DAPI como para AGE. En el caso del diabético también se muestra una ampliación a 40 x de la señal obtenida en 20x. Como se observa en la Figura 12 el único grupo que mostró señal positiva en todos los cortes analizados fue el diabético (Figura 12C). La presencia de AGEs no fue detectada en los animales diabéticos tratados con resveratrol.

En la Figura 12 se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal con un aumento de 60x. En la Figura 12 A y B se muestra una imagen representativa de un ratón control y uno diabético respectivamente. En el diabético se muestra un clip de una de las señales positivas donde se puede

apreciar que la señal está localizada fuera de los cardiomiocitos, muy posiblemente en la matriz extracelular.

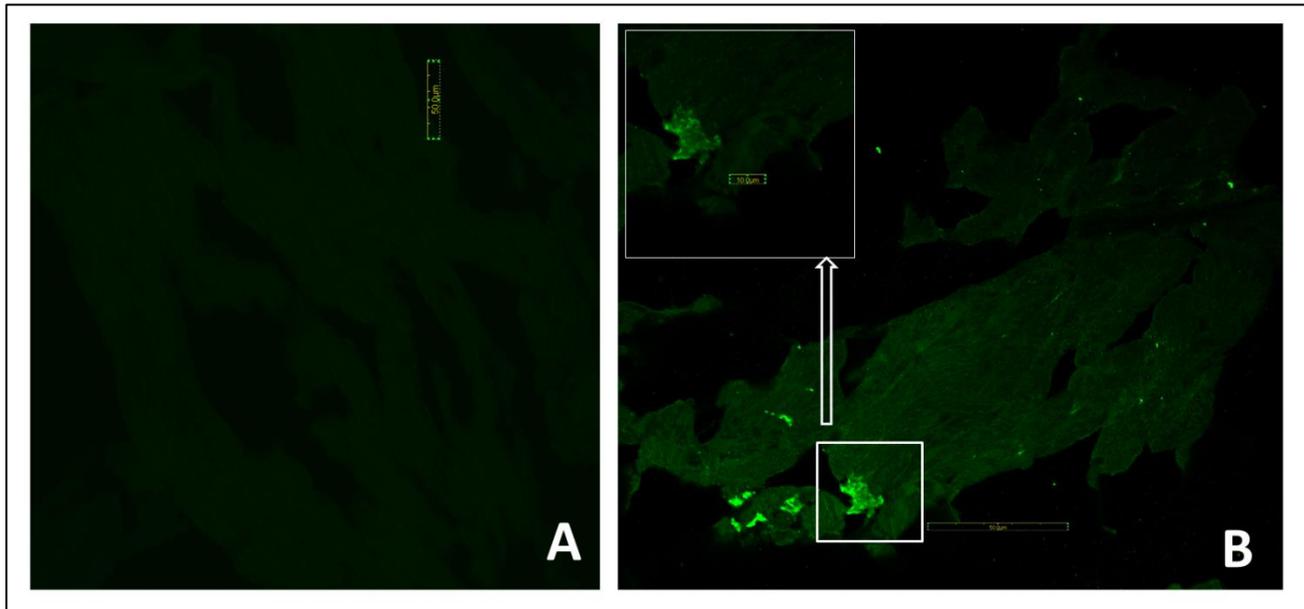


Figura 12 **INMUNOFUORESCENCIA AGES II**. Se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia de cortes de 10 µm de ventrículo izquierdo de corazón con anticuerpo anti-AGE. A) Control, B) Diabético. La barra de escala corresponde a 50 µm.

6. DISCUSIÓN

6.1 EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE SIRT1

Los resultados para la expresión de SIRT1 en nuestro modelo experimental no mostraron diferencias entre los 4 grupos de ratones estudiados (Figura 4). Sin embargo, fue detectada una disminución del 50% aproximadamente de la actividad de SIRT1 en los ratones diabéticos y en los diabéticos tratados con resveratrol con respecto al grupo control. No se detectaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo control tratado con resveratrol (Figura 7).

En la literatura ha sido reportada la reducción de la expresión de SIRT1 (Sulaiman et al. 2010; Sadi et al. 2015). Sin embargo nuestro resultado de la expresión de SIRT1 en el grupo diabético, no mostró dicha disminución (Figura 4). Sulaiman et al. 2010, reportaron que en ratones diabéticos, 3 meses después del tratamiento con STZ, la expresión de SIRT1 disminuyó un 60%. Por otro lado, Sadi et al. 2015 demostraron que el RSV revirtió la expresión de SIRT1 en el grupo D+RSV. Nuestros resultados del estudio de la expresión de SIRT1 (Figura 4) mostraron una gran variabilidad. Una de las posibles explicaciones para esta variación puede ser atribuida al anticuerpo utilizado (diferente al utilizado por los citados autores). Tal vez la diferencia de expresión en la patología exista, pero la gran variabilidad en los resultados haya enmascarado dicha disminución.

Respecto a la actividad de SIRT1, en este trabajo se observó la disminución de la actividad para el grupo de ratones diabéticos (Figura 7), lo que coincide con lo encontrado en la literatura. La disminución encontrada no fue revertida por la acción del RSV. Sulaiman et al. 2010 encontraron una drástica reducción de la misma en el grupo diabético y en el grupo diabético con RSV observaron una estimulación del 40% por encima de la actividad observada en animales control. Las diferencias entre los resultados pueden radicar en las diferencias de medición de la actividad de SIRT1 y sobre todo en la vía de administración del RSV. En el caso de Sulaiman et al. 2010 la actividad desacetilasa se SIRT1 se midió utilizando p53 acetilada como sustrato (SIRT1 Fluorimetric Activity Assay/Drug Discovery Kit) a partir de

SIRT1 endógena inmunoprecipitada, mientras que en nuestro caso la actividad se midió de forma indirecta midiendo los niveles de p53 acetilada por western blot. Por otro lado, la principal diferencia con los modelos experimentales de los autores mencionados anteriormente fue la vía de administración del RSV. En uno de los casos, el grupo de ratones D+RSV fue alimentado con una dieta especial enriquecida con RSV al 0.067%, estimando en 100 mg por kilo por día la dosis administrada (Sulaiman et al. 2010). Por otro lado, en Sadi et al 2015, a las ratas se les administró una dosis de 20 mg/kg/día diaria e intraperitoneal. En nuestro caso 40 mg/kg de RSV fueron administrados día por medio intraperitonealmente. Las diferencias en la dosis y la periodicidad con la que se administró el RSV podrían explicar por qué no se observó la reversión de la actividad de SIRT1 en el grupo D+RSV.

En Damián et al. 2014 se muestran estudios de comportamiento de los mismos ratones utilizados en este trabajo de Tesis. En dicho estudio se determinaron los niveles de glicemia de los ratones de los grupos D y D+RSV. Las medidas realizadas mostraron que los niveles de glucosa no se vieron afectadas por el tratamiento con RSV. Esta observación concuerda con Sadi et al. 2015, quienes demostraron que en ratas con diabetes inducida por inyección de STZ el RSV éste no afectó los niveles de glucosa en sangre en los animales diabéticos (Sadi et al. 2015).

Yar et al. 2011 demostraron que la administración intraperitoneal de RSV en ratas diabéticas puede proteger el corazón contra la inflamación asociada a la diabetes a través de activación de SIRT1. Según los mencionados autores, el RSV, probablemente a través de un mecanismo dependiente de SIRT1, elimina los efectos adversos de la hiperglicemia e impide las alteraciones fenotípicas proinflamatorias en el corazón. Los autores presumen que el efecto cardioprotector del RSV, al menos parcialmente, contribuye a su capacidad para estimular la síntesis de SIRT1 en el corazón diabético (Yar et al. 2011). El estrés oxidativo juega un papel clave en la patogénesis de la diabetes Mellitus tipo 1 y sus complicaciones relacionadas. El resveratrol tiene efectos benéficos en condiciones de resistencia a la insulina por la disminución del daño oxidativo a través de efectos antioxidantes directos e indirectos. En el caso de los humanos, los autores sugieren que la administración de resveratrol en combinación con la

ingesta de alimentos más saludables en la dieta y la actividad física regular puede ser una estrategia eficaz para la prevención de la diabetes mellitus, y junto con agentes antidiabéticos orales una estrategia eficaz para su tratamiento (Brasnyó et al. 2014).

El resveratrol tiene efectos a nivel de la expresión génica en varios órganos. El RSV mejora varios síntomas y complicaciones de la diabetes en animales diabéticos inducidos por STZ, con los mecanismos moleculares subyacentes, incluyendo una reducción de la oxidación y NOS y la inflamación generada durante el metabolismo de la hiperglicemia, y la inducción de las vías de señalización como AMPK y Sirt (Park & Pezzuto 2015). Barger et al. 2008 sugieren, en base a estudios de microarrays, que una dosis baja de resveratrol en la dieta induce un programa transcripcional similar a la restricción calórica en múltiples tejidos y retarda parámetros de envejecimiento, pero estos efectos pueden ser en gran medida independientes al aumento de la actividad de SIRT1 (Barger et al. 2008).

6.2 GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS y AGES

El criterio utilizado para reportar las bandas que se identificaron en cada grupo de ratones fue que las bandas deberían estar presentes en todos los animales pertenecientes a ese grupo. A priori no esperábamos encontrar diferencias en el número de bandas presentes en los geles teñidos con azul de coomassie. Sin embargo, sí encontramos diferencias. Debe quedar claro, que nos estamos refiriendo a los pesos moleculares aparentes de las bandas de proteínas identificadas en geles de poliacrilamida al 10% en todos los animales de cada grupo. La Figura 9, es una figura representativa, y por lo tanto en este caso se pueden observar más bandas que las que se reportan en la Tabla 3. Si comparamos las bandas detectadas en el grupo control con las detectadas en el grupo diabético (Tabla 3), podemos decir que no hay mayores diferencias. Sin embargo, se detectó una diferencia notoria con la inclusión de la droga (resveratrol), ver Tabla 3. En este caso, solamente 3 bandas fueron detectadas en forma sistemática en todos los animales del grupo. Es sabido que esta droga, fue capaz de modificar la expresión génica en varios órganos diferentes (Park & Pezzuto 2015), como fue dicho anteriormente. La mayor variabilidad

del patrón de bandas detectado en los grupos de ratones tratados con resveratrol podría ser explicado parcialmente de esta forma. También debemos recordar que el método de detección utilizado, la tinción con Azul de Coomassie, quizás no sea suficiente para detectar todas las bandas presentes. El límite de sensibilidad de esta tinción es de aproximadamente 100 ng (Dyballa & Metzger 2012). Tal vez, en los grupos de animales tratados con resveratrol las mismas bandas de proteínas esten presentes en menor cantidad y no fueron detectadas por la tinción con Azul de Coomassie. Para poder averiguar esto, sería necesario realizar una tinción con nitrato de plata, cuya sensibilidad de detección es de 10 ng (Chevallet et al. 2006).

En el caso de las proteínas glicosiladas la diferencia en el patrón de bandas no fue tan marcada como en el caso de la tinción con azul de Coomassie para los grupos tratados con RSV. Una posible explicación para esta observación sería que el reactivo de Schiff's es entre 4 y 20 veces más sensible que la tinción con Coomassie (límite de detección del reactivo de schiff de 5 a 25 ng de carbohidratos) y además esta tinción reconoce únicamente proteínas glicosiladas y no proteínas totales como el Coomassie. Tampoco notamos grandes diferencias entre controles y diabéticos. De 14 bandas detectadas en la condición control (en todos los animales) 10 fueron detectadas en el grupo diabético (en todos los animales) (Tabla 2). Una observación interesante fue encontrar que las bandas que no se detectaron en el grupo diabético fueron detectadas en el grupo diabético con resveratrol. Este resultado sugiere un efecto del RSV en la glicosilación de proteínas en los animales diabéticos. Dado que el reactivo de Schiff tiñe todas las proteínas glicosiladas (sin discriminar a través de que tipo de glicosilación, enzimática o no enzimática, se hayan formado las proteínas) la técnica utilizada permite decir que el patrón de glicosilación total de las proteínas, fue similar en el grupo diabético y en el control. Esta similitud en los patrones de bandas de proteínas glicosiladas entre los grupos C y D está de acuerdo a lo observado por Myint et al. 1995 donde describe que las proteínas del corazón, músculo, bazo y la glándula adrenal se glicosilaron tanto en condiciones fisiológicas como diabéticas con patrones similares (Myint et al. 1995).

El aislamiento y la identificación química de los productos de glicosilación avanzada (AGEs) ha sido problemática, dada su heterogeneidad e inestabilidad. A través de ensayos *in vitro*, se han podido aislar e identificar unos pocos AGEs. Posteriormente se ha confirmado la presencia de AGEs *in vivo*, por ejemplo en proteínas plasmáticas y en tejido conectivo, utilizando anticuerpos específicamente dirigidos contra estos productos (Makita et al. 1992). En nuestro caso, el anticuerpo que utilizamos mostró reconocer BSA-AGE (descrito por el fabricante) y otras tres bandas de proteínas (una de 75 KDa y otras dos entre 150 y 250 KDa). Utilizando dicho anticuerpo, fuimos capaces de detectar un aumento significativo de BSA-AGE en el suero de los ratones diabéticos comparado con los controles (Figura 9). Sin embargo, cuando analizamos el perfil de proteínas que forman AGEs en el homogenizado de ventrículo izquierdo corrido en geles de poliacrilamida al 10 %, no detectamos cambios mayores entre los diferentes grupos. En los grupos C, D y D+RSV aparecen 4 bandas (Tabla 4). En el grupo C+RSV se observaron sólo 2 bandas presentes de todos los animales de la condición. Cabe destacar que en estos geles detectamos bandas proteicas comprendidas entre 250 y 20 KDa.

Los estudios de inmunohistoquímica realizados por microscopía de fluorescencia, utilizando el mismo anticuerpo, mostraron señal específica del mismo únicamente en el grupo de ratones diabéticos (Figura 12). En los otros grupos de ratones, incluyendo los diabéticos tratados con resveratrol, la señal específica no fue detectada en ninguno de los campos microscópicos analizados. Estos resultados, sugieren un efecto del tratamiento con resveratrol en la formación de AGEs. El análisis de los cortes en más detalle utilizando microscopía láser confocal, mostró que la señal podría estar ubicada en la matriz extracelular (Figura 12).

Ya que no se encontraron grandes diferencias entre las proteínas detectadas en geles de poliacrilamida 10%, entre 20 y 250 KDa, creemos que dichas diferencias pueden estar en las proteínas de peso molecular mayor a 250 KDa. Una observación de nuestros resultados (microscopía de epifluorescencia Figura 12 y microscopía láser confocal Figura 12), que apoyan esta conclusión es que, cuando se realiza la

inmunofluorescencia en cortes de ventrículo izquierdo de corazón criopreservados con anti-AGE, se visualizan las diferencias esperadas. En este caso el único grupo que muestra presencia de marcación positiva para AGES fue el grupo diabético, lo que está de acuerdo con lo descrito en la literatura que la hiperglicemia aumenta la producción de la AGEs (Singh et al. 2014; Ottum & Mistry 2015).

En condiciones fisiológicas la aparición AGEs está determinada por la concentración de azúcares reductores y por el tiempo de exposición de la proteína a los mismos (vida media de la proteína). En proteínas de recambio rápido, el proceso de glicosilación no enzimática no supera, en general, las etapas Iniciales (formación de la base de Schiff y eventualmente del producto de Amadori), mientras que las de vida media larga llegan a formar los productos de glicosilación avanzada (González Flecha et al. 2000).

En personas diabéticas descompensadas, la concentración de glucosa en la sangre está sustancialmente aumentada. Además, la falta de insulina o de sensibilidad de los receptores de las células musculares y del tejido adiposo, que normalmente son los principales consumidores de glucosa, tienen como consecuencia que no puedan utilizarla. Por el contrario, el resto de las células del organismo, que no requieren de insulina para que la glucosa ingrese al interior celular, presentan una alta concentración de glucosa intracelular. Esta situación favorece a la glicosilación de un gran número de proteínas intra y extracelulares. Las proteínas de vida media corta (por ejemplo las proteínas plasmáticas) y las presentes en células que son rápidamente reemplazadas (por ejemplo los glóbulos rojos) alcanzan a formar bases de Schiff o productos de Amadori, estadios tempranos de la reacción de Schiff's. Estos compuestos están asociados al desarrollo de patologías vasculares y renales y al anormal funcionamiento del mecanismo de transporte del calcio. Por otro lado, las proteínas de bajo recambio (por ejemplo el colágeno y demás proteínas de la matriz extracelular, las cristalinas) pueden llegar a la última fase de la reacción de Schiff's. Estos AGEs están implicados en el desarrollo de diversas patologías a través de tres

mecanismos generales: 1) la modificación de proteínas estructurales que se encuentran fuera de la célula, 2) el desencadenamiento de procesos intracelulares a través de la unión a receptores extracelulares y 3) la alteración de proteínas intracelulares (González Flecha et al. 2000).

El colágeno es el componente principal de la ECM y es uno de los blancos principales de la glicosilación no enzimática. Esta es la proteína de vida media más larga en los animales superiores, el cual se dispone principalmente como fibras extracelulares, insolubles. Cuando esta proteína, localizada por ejemplo en las paredes arteriales y las membranas basales, de los capilares, se glicosila, llega a formar productos de entrecruzamiento no sólo con otras moléculas de colágeno sino también con varias proteínas plasmáticas, que en circunstancias normales son de vida media corta, como por ejemplo la albúmina, las inmunoglobulinas y las lipoproteínas de baja densidad. Estas estructuras producen el engrosamiento, disminuyen la flexibilidad y la permeabilidad de dichos tejidos, y se ha sugerido que estarían involucradas en el desarrollo de enfermedades vasculares, aterosclerosis y glomeruloesclerosis. La formación de AGEs cambia las propiedades del colágeno tales como la pérdida de la solubilidad de la triple hélice y la flexibilidad para incrementar su rigidez. Algunos estudios concluyen que la glicosilación del colágeno aumenta la formación y migración de fibroblastos y participa en el desarrollo de la fibrosis en la diabetes (Singh et al. 2014; González Flecha et al. 2000). En Benech et al. 2014, trabajo realizado en nuestro laboratorio (ver anexo), se muestra una acumulación de colágeno intersticial en secciones de tejido del corazón de ratones diabéticos. Además del colágeno (300 KDa), la formación de AGE se puede dar en otras proteínas de la matriz extracelular incluyendo laminina (400 KDa) o fibronectina (440 KDa) las cuales han mostrado un autoensamblaje deteriorado así como también las interacciones con otros componentes de la matriz y las interacciones célula-matriz (Mellor et al. 2015).

Los resultados obtenidos por estos autores, están de acuerdo con nuestros estudios inmunohistoquímicos y podría explicar la marca observada en el grupo diabético (Figura 12; Figura 12). El anticuerpo utilizado en el presente trabajo de Tesis, marcó el complejo BSA-AGE el cual podría estar

formando complejo con el colágeno o con las otras proteínas de vida media larga de la matriz extracelular. Por otro lado, Tang et al 2014 han mostrado que el resveratrol puede proteger potencialmente el sistema cardiovascular del estrés oxidativo mediante la inhibición de la producción de productos finales de glicación avanzada (Tang et al. 2014). Esto apoya el resultado obtenido en la inmunofluorescencia en donde en el grupo D+RSV no hay marcación para el anticuerpo anti-AGE. En este caso el resveratrol mitiga el efecto de la patología, llevando a los ratones de este grupo a comportarse como el control.

Por lo discutido anteriormente, nuestros resultados muestran que: a) la expresión de SIRT1 no se vio modificada en ninguno de los grupos cuando se compara con el grupo control; b) la actividad de ésta desacetilasa, está disminuida en los ratones diabéticos y no fue modificada por el tratamiento con resveratrol; c) no fueron encontradas grandes diferencias en el patrón de bandas glicosiladas entre el grupo control y el grupo diabético; d) el patrón de proteínas que forman AGEs detectado en homogeneizados de ventrículo izquierdo corridos en geles de poliacrilamida al 10% (que resuelve proteínas entre 250 y 20 KDa), fue muy similar en todos los grupos de ratones; e) por inmunofluorescencia se logró detectar señal específica del anticuerpo anti-AGEs únicamente en cortes de ventrículo izquierdo de corazón de ratones diabéticos; f) en este caso, el tratamiento de los animales diabéticos con resveratrol eliminó la señal.

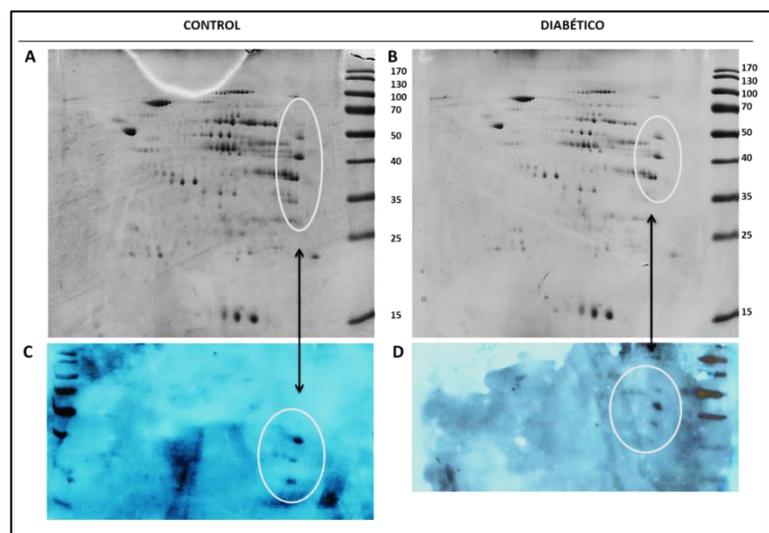
6. CONCLUSIÓN

La hiperglicemia crónica no modificó significativamente los productos finales de glicosilación avanzada en proteínas del ventrículo izquierdo del corazón comprendidas entre 250 y 20 KDa. Sin embargo, produjo un aumento de los productos finales de glicosilación avanzada detectados por inmunofluorescencia en cortes de ventrículo izquierdo de corazones de ratones diabéticos, muy probablemente en proteínas de la matriz extracelular como el colágeno. Este efecto, fue revertido por el tratamiento con resveratrol. Otro efecto observado de la patología fue la disminución de la actividad desacetilasa de SIRT1, pero en este caso el tratamiento con resveratrol no revirtió la disminución de la actividad de la enzima. Es bien conocido que el resveratrol es un activador de SIRT1 y tiene acción antioxidante. Analizando los datos obtenidos en este trabajo de tesis, podemos concluir que el efecto observado del resveratrol, en nuestro modelo experimental, no fue a través de la modificación de la actividad de SIRT1 y sí muy probablemente a través de su efecto antioxidante.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Medir niveles de especies reactivas del oxígeno *in vivo*.
2. Realizar geles de poliacrilamida con gradiente 4-10% para separar las proteínas de la matriz extracelular y estudiar si las diferencias a nivel de formación de AGES están en estas proteínas.
3. Realizar western blot con anticuerpo ANTI-CML.
4. Estudiar los niveles de expresión de los receptores de AGEs: AGER1 y RAGE.
5. Realizar estudios de secuenciación masiva para ver que vías, presentes en el corazón, están afectadas.
6. Realizar electroforesis bidimensional, western con anticuerpo anti-AGE y anti-CML y luego identificar mediante espectrometría de masa MALDI/TOF qué proteínas formaron AGES en cada

una de las condiciones. En la siguiente figura en A) y B) se muestran geles de electroforesis bidimensional teñidos con azul de Coomassie control y diabético, respectivamente. En C) y D) se observan imágenes del revelado por quimioluminiscencia del western de AGEs para ambos ratones, control y



diabético. En la figura se marcó la correspondencia entre los spots positivos en el WB y los spots del gel teñido con azul de Coomassie. Esta figura muestra resultados preliminares ya que utilizaron únicamente un animal de cada condición.

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a los pilares de mi vida, mis padres, por el apoyo incondicional que me han brindado en todos estos años, sin ellos no hubiera sido posible conseguir todos los logros obtenidos ni sortear todas las adversidades que se presentaron a lo largo de estos años. A mi familia en general, abuelas, tíos, primos, sobrinos y a mis amigas que estuvieron siempre presentes en todo momento alegrándose con mis logros y apoyándome y bancándome en los momentos más difíciles.

A Juan Benech, por el apoyo recibido durante todos estos años nivel persona, recibíendome en su laboratorio y dándome la oportunidad de realizar la tesis bajo su tutoría. También por su apoyo a nivel profesional, como tutor y consejero guiándome para ser una mejor científica. A los todos miembros del laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología, Ana Inés, Natalia, Andrés, Inés y Mariel por el apoyo y por la ayuda brindada para poder llevar a cabo mi tesis de maestría así como también el apoyo a nivel personal. A Inés por programar el MATLAB para poder estimar el peso molecular de las proteínas. A Juan Pablo por ser una fuente de consulta permanente y por siempre estar dispuesto a ayudar y principalmente por ser quien me ha enseñado y guiado en que test estadísticos utilizar.

Por último destacar el apoyo constante durante todos estos años de Mareney, Leticia, Jonatan, Dayana, a los miembros del laboratorio del Departamento de Genética y mis compañeros de BIKO/BIONOVA.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adeghate, E. & Singh, J., 2014. Structural changes in the myocardium during diabetes-induced cardiomyopathy. *Heart Failure Reviews*, 19(1), pp.15–23.
- American Diabetes Association, 2015. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 38(Supplement_1), pp.S8–S16. Available at: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc15-S005>.
- Arieta, D.K., 2011. MIOCARDIOPATIA DIABETICA. , pp.1–7.
- Arumugam, S. et al., 2014. Diabetic Cardiomyopathy and Oxidative Stress. , pp.25–32.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S. & Michels, A.W., 2014. Type 1 diabetes. *Lancet*, 383(9911), pp.69–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890997> [Accessed October 22, 2014].
- Barger, J.L. et al., 2008. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS ONE*, 3(6).
- Baur, J. a & Sinclair, D. a, 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(6), pp.493–506.
- Baur, J. a., 2010. Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(8), pp.1626–1634. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.025>.
- Benech, J.C. et al., 2014. Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *AJP: Cell Physiology*, 307(10), pp.C910–C919. Available at: <http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00192.2013>.
- Van Beneden, K. et al., 2013. HDAC inhibitors in experimental liver and kidney fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair*, 6(1), p.1. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3564760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Berg, T.J. et al., 1999. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 22(7), pp.1543–1548. Available at: <http://care.diabetesjournals.org/content/22/7/1186.short> [Accessed August 23, 2015].
- Boudina, S. & Abel, E.D., 2007. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, 115(25), pp.3213–3223.
- Boudina, S. & Abel, E.D., 2010. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11(1), pp.31–39.
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. Available at: http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf [Accessed August 30, 2015].
- Brasnyó, P. et al., 2014. Chapter 10 - Resveratrol and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. In pp. 99–109.

Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124058859000103>.

- Cc, I., Ue, E. & Cf, U., 2014. The Role of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus : A 24-year Review. *AFRIMEDIC Journal*, 5(1).
- Chevallet, M., Luche, S. & Rabilloud, T., 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols*, 1(4), pp.1852–1858.
- Control, D. et al., 2013. Sirtuin 1 as a key player of “ metabolic memory .” , 4(1), pp.2012–2014.
- D’Onofrio, N. et al., 2015. Sirtuins in vascular diseases: Emerging roles and therapeutic potential. *Biochimica et biophysica acta*, 1852(7), pp.1311–1322. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443915000654> [Accessed May 20, 2015].
- Damián, J.P. et al., 2014. Effect of Resveratrol on Behavioral Performance of Streptozotocin-induced Diabetic Mice in Anxiety Tests. *Exp Anim.*, 63(November 2013), pp.277–287.
- Durand, G. & Seta, N., 2000. Protein glycosylation and diseases: Blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clinical Chemistry*, 46(6), pp.795–805.
- Dyballa, N. & Metzger, S., 2012. Fast and sensitive coomassie staining in quantitative proteomics. In *Methods in Molecular Biology*. pp. 201–221.
- Federación Internacional de Diabetes, 2013. *Atlas de la DIABETES de la FID* . 6a edición., Available at: http://www.fmdiabetes.org/fmd/des/SP_6E_Atlas_Full.pdf.
- González Flecha, F.L. et al., 2000. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al Día Internacional*, 3(2), pp.1–17.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D., 2001. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, pp.9–18. Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Van Heerebeek, L. et al., 2008. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: Importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*, 117(1), pp.43–51.
- van Hoeven, K.H. & Factor, S.M., 1990. A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation*, 82(3), pp.848–855.
- Hung, L.M. et al., 2000. Cardioprotective effect of reveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc. Res.*, 47, pp.549–555.
- Huynh, K. et al., 2014. Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacology and Therapeutics*, 142(3), pp.375–415. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.01.003>.
- Ignatowicz, E. & Baer-Dubowska, W., 2001. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Polish Journal of Pharmacology*, 53(6), pp.557–569. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_ui

ds=11985329.

- Kharroubi, A.T. & Darwish, H.M., 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes*, 6(6), pp.850–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4478580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 5, 2015].
- Liu, Q., Wang, S. & Cai, L., 2014. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. *Journal of Diabetes Investigation*, 5(6), pp.623–634. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/jdi.12250>.
- Makita, Z. et al., 1992. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 267(8), pp.5133–5138.
- Mellor, K.M., Brimble, M. a. & Delbridge, L.M.D., 2015. Glucose as an agent of post-translational modification in diabetes — New cardiac epigenetic insights. *Life Sciences*, 129, pp.48–53. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320514003592>.
- Mohtavinejad, N. et al., 2015. SIRT1 gene is associated with cardiovascular disease in the Iranian population. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 16(2), pp.117–122. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S111086301400127X> [Accessed August 22, 2015].
- Myint, T. et al., 1995. Immunological detection of glycosylated proteins in normal and streptozotocin-induced diabetic rats using anti hexitol-lysine IgG. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1272, pp.73–79.
- Nikolic, D. et al., 2014. Oxidative stress and the role of antioxidative treatment in diabetes mellitus. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 3(1), p.9. Available at: <http://www.scopemed.org/?mno=153685>.
- Nowotny, K. et al., 2015. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*, 5(1), pp.194–222. Available at: <http://www.mdpi.com/2218-273X/5/1/194/html> [Accessed March 20, 2015].
- Ottum, M.S. & Mistry, A.M., 2015. Advanced glycation end-products: modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resistance. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 57(1), pp.1–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4512899&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 6, 2015].
- Park, E.-J. & Pezzuto, J.M., 2015. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), pp.1071–1113. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092544391500023X>.
- Racusen, D., 1979. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. *Analytical Biochemistry*, 99(2), pp.474–476. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269779800354>.

- Rao, A.A. et al., 2008. Proteomic analysis in diabetic cardiomyopathy using bioinformatics approach. *Bioinformatics and biology insights*, 2, pp.1–4.
- Sadi, G. et al., 2015. Resveratrol improves hepatic insulin signaling and reduces the inflammatory response in streptozotocin-induced diabetes. *Gene*, 570(2), pp.213–220. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811915007271> [Accessed August 10, 2015].
- Shapiro, a L., Viñuela, E. & Maizel, J. V, 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications*, 28(5), pp.815–820.
- Shigematsu, S. et al., 2003. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(7), pp.810–817.
- Singh, V.P. et al., 2014. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18(1), pp.1–14. Available at: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4196/kjpp.2014.18.1.1> [Accessed August 22, 2015].
- Spiro, R.G., 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), p.43R–56R. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042244>.
- Sulaiman, M. et al., 2010. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 298(3), pp.H833–H843.
- Szkudelski, T. & Szkudelska, K., 2015. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochimica et biophysica acta*, 1852(6), pp.1145–1154. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443914003196> [Accessed July 21, 2015].
- Tang, P.C.-T. et al., 2014. Resveratrol and cardiovascular health – Promising therapeutic or hopeless illusion? *Pharmacological Research*, 90, pp.88–115. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661814001388>.
- Tiwari, N., 2014. Therapeutic Targets for Diabetes Mellitus: An Update. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*, 3(1), pp.1–10. Available at: <http://www.omicsgroup.org/journals/therapeutic-targets-for-diabetes-mellitus-2167-065X.1000117.php?aid=27700>.
- Turan, B. & S., N., 2014. *Diabetic cardiomyopathy*,
- Turkmen, K., 2014. Sirtuins as novel players in the pathogenesis of diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 5(6), p.894. Available at: <http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v5/i6/894.htm>.
- Vassort, G. & Turan, B., 2010. Protective role of antioxidants in diabetes-induced cardiac dysfunction. *Cardiovascular Toxicology*, 10(2), pp.73–86.
- Villalba, J.M.J. & Alcaín, F.F.J., 2012. Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors*, 38(5), pp.349–359.

Available at:

http://www.researchgate.net/profile/Francisco_Alcaín/publication/228064029_Sirtuin_activators_and_inhibitors/links/00b7d53bcef68b3167000000.pdf [Accessed August 23, 2015].

Vlassara, H. & Uribarri, J., 2014. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: Cause, effect, or both? *Current Diabetes Reports*, 14(1).

Wang, J. et al., 2006. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. *The review of diabetic studies : RDS*, 3(3), pp.108–117.

Yacoub, R., Lee, K. & He, J.C., 2014. The Role of SIRT1 in Diabetic Kidney Disease. *Frontiers in Endocrinology*, 5(October), pp.1–8. Available at:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2014.00166/abstract>.

Yar, A., Menevse, S. & Alp, E., 2011. The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and -2, nuclear factor kappa beta, matrix expression in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. *Genet Mol Res.*, 10(4), pp.2962–75.

Organización Mundial de la Salud (OMS) <http://www.who.int>

Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation

Juan C. Benech,¹ Nicolás Benech,² Ana I. Zambrana,¹ Inés Rauschert,¹ Verónica Bervejillo,¹ Natalia Oddone,¹ and Juan P. Damián^{1,3}

¹Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay; ²Instituto de Física, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; and ³Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Submitted 24 June 2013; accepted in final form 4 August 2014

Benech JC, Benech N, Zambrana AI, Rauschert I, Bervejillo V, Oddone N, Damián JP. Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *Am J Physiol Cell Physiol* 307: C910–C919, 2014. First published August 27, 2014; doi:10.1152/ajpcell.00192.2013.—Stiffness of live cardiomyocytes isolated from control and diabetic mice was measured using the atomic force microscopy nanoindentation method. Type 1 diabetes was induced in mice by streptozotocin administration. Histological images of myocardium from mice that were diabetic for 3 mo showed disorderly lineup of myocardial cells, irregularly sized cell nuclei, and fragmented and disordered myocardial fibers with interstitial collagen accumulation. Phalloidin-stained cardiomyocytes isolated from diabetic mice showed altered (i.e., more irregular and diffuse) actin filament organization compared with cardiomyocytes from control mice. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) pump expression was reduced in homogenates obtained from the left ventricle of diabetic animals compared with age-matched controls. The apparent elastic modulus (AEM) for live control or diabetic isolated cardiomyocytes was measured using the atomic force microscopy nanoindentation method in Tyrode buffer solution containing 1.8 mM Ca²⁺ and 5.4 mM KCl (physiological condition), 100 nM Ca²⁺ and 5.4 mM KCl (low extracellular Ca²⁺ condition), or 1.8 mM Ca²⁺ and 140 mM KCl (contraction condition). In the physiological condition, the mean AEM was 112% higher for live diabetic than control isolated cardiomyocytes (91 ± 14 vs. 43 ± 7 kPa). The AEM was also significantly higher in diabetic than control cardiomyocytes in the low extracellular Ca²⁺ and contraction conditions. These findings suggest that the material properties of live cardiomyocytes were affected by diabetes, resulting in stiffer cells, which very likely contribute to high diastolic LV stiffness, which has been observed in vivo in some diabetes mellitus patients.

atomic force microscopy; diabetes; live cardiomyocyte stiffness

THE PREVALENCE OF DIABETES mellitus is rapidly growing. It is estimated that, globally, the number of adults with diabetes mellitus will increase from 171 million in 2000 to 300 million by 2030 (35). Diabetes mellitus is a well-recognized risk factor for development of heart failure (HF). Indeed, the Framingham Heart Study showed that HF occurs twice as frequently in diabetic men and five times as frequently in diabetic women as in age-matched controls (12). Thus cardiovascular complications, such as increased atherosclerosis in large arteries (carotid artery, aorta, and femoral artery) and increased coronary atherosclerosis, which increases the risk for myocardial infarction

and stroke, are the leading cause of diabetes-related morbidity and mortality (5, 11).

In animal models of diabetes, several cardiac functional and structural alterations or cardiac muscle disorders have been documented in type 1 and type 2 diabetes (5). In most of the type 1 diabetes studies, diabetes was induced by streptozotocin (STZ) administration (5, 24, 31). In humans, diabetes mellitus-induced diastolic left ventricular (LV) dysfunction is increasingly recognized as an important morbidity and mortality determinant in HF. In patients with diabetes mellitus, an increase in diastolic LV stiffness obstructs LV remodeling after myocardial infarction (27, 28) and raises LV filling pressures at similar LV filling volumes in HF with reduced LV ejection fraction and in HF with normal LV ejection fraction (32). As a consequence, diabetes mellitus patients have a higher incidence of HF after myocardial infarction (18, 23, 27, 28). Mechanisms that have been proposed to be responsible for raising myocardial stiffness in diabetes mellitus consist basically of excessive fibrosis (33) and deposition of advanced glycation end products (3). Hypertrophic cardiomyocytes isolated from LV biopsy samples of HF patients with normal LV ejection fraction showed high resting tension, which correlated with greater in vivo diastolic LV stiffness. This high resting tension might be an important contributor to the increased diastolic LV stiffness in the diabetic heart (32). Resting tension was measured in single cardiomyocytes isolated from frozen biopsy samples that were thawed, mechanically disrupted, and incubated with Triton X-100, provoking sarcolemmal and sarcoplasmic membrane disruption (4, 10, 32).

Atomic force microscopy (AFM) allows study of the dynamics and mechanical properties of intact cells. Different cell events, such as locomotion, differentiation and aging, physiological activation, electromotility, and cell pathology, can be analyzed with this new research tool (8, 13, 15, 17, 21, 37, 38). The effects of aging and obesity on vascular smooth muscle cell stiffness (8, 21, 38) and aging on cardiomyocyte stiffness (15) have been analyzed using AFM. However, to our knowledge, no studies have examined directly the effect of diabetes on the material properties of single live cardiomyocytes.

The present study, to the best of our knowledge, is the first to use the nanoindentation method of AFM to compare the material properties of live isolated LV myocytes from normal and diabetic mice.¹

Address for reprint requests and other correspondence: J. C. Benech, Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay (e-mail: jbenech@iibce.edu.uy or juanclaudio.benech@gmail.com).

¹ This article is the topic of an Editorial Focus by Gerald A. Meininger (16a).

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval. The experimental procedures were approved by the Institutional Ethical Committee (CEUA-IIBCE, Uruguay) in accordance with national legislation.

Experimental animals. STZ (Sigma, St. Louis, MO), which causes selective necrosis of pancreatic cells and results in an insulin deficiency state, was used to induce type 1 diabetes. Adult (1.5-mo-old) male CD1 mice ($n = 12$) were injected with a single dose (150 mg/kg ip) of a freshly prepared STZ solution in a citrate-saline buffer (pH 4.5). This dose of STZ was previously shown to result in high blood glucose levels with minimal cardiotoxicity (36). Control animals ($n = 12$) were injected with citrate buffer. Prior to STZ injection, all mice were weighed, and blood was obtained from the tail vein for measurement of nonfasting blood glucose using the ACCU-CHEK Compact Plus System (Indianapolis, IN). After 4–7 days of STZ administration, blood glucose was measured again, and mice with blood glucose >250 mg/dl were considered diabetic. For 3 mo, nonfasting blood glucose was monitored weekly to ensure continued diabetic status, as recommended by the manufacturer's instruction.

Variation in the apparent elastic modulus (AEM) was studied in 4.5-mo-old male control and diabetic CD1 mice. Diabetic mice were euthanized after 3 mo of diabetes. To obtain enough control and diabetic mice for the present study, this protocol was repeated once.

Statistical methods for animals. Body weight and glycemia were compared using ANOVA for repeated measurements. The model considered the group (diabetics vs. controls), time (in weeks), and interaction between group and time as fixed effects and the mouse in each group as a random effect. Post hoc comparisons were performed using least significant difference.

Morphological study. Hearts were rapidly removed from the mice and washed with phosphate-buffered saline (PBS) solution. Cardiac tissues were fixed in 3% paraformaldehyde for 1 h and cryoprotected in 15% and 30% sucrose, respectively (48 h). Thereafter they were embedded in tissue-freezing medium (Jung), sectioned, and stained with hematoxylin and eosin for light-microscopic morphological study.

F-actin study and confocal microscopy. Isolated cardiomyocytes from control and diabetic mice were fixed on polylysine-treated glass with 1% paraformaldehyde and later washed with 0.1% Triton X-100-PBS. Thereafter they were stained with 50 μ g/ml fluorescent phalloidin 633 conjugate solution in PBS for 40 min at room temperature (Sigma-Aldrich). Finally, they were washed three times with PBS. Mounted samples were analyzed using confocal microscopy. A surface plot of selected cells was made using National Institutes of Health ImageJ software.

Preparation of protein lysate. For Western blot analysis, frozen heart tissue (50 mg) was homogenized in 1.5 ml of lysis buffer [20 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 2 μ M leupeptin, 1 mM aprotinin, and 400 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride]. The homogenate was centrifuged at 4°C at 14,000 g , the supernatant was collected and sonicated, and the protein concentration was determined by Bradford assay. Tissue lysate aliquots were stored at -80°C .

Western blot analysis. Proteins (50 mg) were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, as previously described (1). Membranes were blocked with 10% fat-free milk and incubated overnight at 4°C with anti-sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a, 1:500 dilution; product no. ab2861, Abcam) or anti- β -actin (1:1,000 dilution; product no. ab8227, Abcam) antibody. β -Actin was used as the loading control. Membranes were washed with $1\times$ Tris-buffered saline (TBS)-Tween and hybridized with the appropriate secondary antibody conjugated with Alexa 488 in $1\times$ TBS-Tween: Invitrogen A11001 (1:1,000 dilution) for SERCA2a and Invitrogen A11008 (1:5,000 dilution) for β -actin. After the membranes were washed, the signal was developed using a

high-performance luminescent image analyzer (model FLA-9000, Fujifilm) according to the manufacturer's instructions. Protein bands were analyzed using ImageJ software.

Preparation of LV myocytes. Cardiomyocytes were prepared from control and diabetic male CD1 mice as described by Brum et al. (6) with modifications. The heart was rapidly excised and immediately immersed in a Tyrode buffer solution (TyBS; in mM: 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucose, and 5 HEPES, pH 7.4). The excised heart was washed in TyBS to remove blood and immersed in Ca^{2+} -free TyBS (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 50 μ M EGTA, 1 mM MgCl_2 , 10 mM glucose, and 5 mM HEPES, pH 7.4) for 10 min. A section of LV (30–40 mg) was cut into small pieces and incubated for 5 min in TyBS with 30 mg/ml collagenase type I and 50 μ M Ca^{2+} (to enhance collagenase activity). Subsequently, the pieces of tissue were transferred to an Eppendorf flask containing TyBS with 50 μ M Ca^{2+} and shaken to obtain single cells. The remaining pieces of tissue were removed from the flask, and the solution containing the cells was centrifuged for 5 min at 800 g . The pellet was resuspended in TyBS with 0.5 mM Ca^{2+} and centrifuged again for 5 min. This process was repeated in TyBS containing 1 mM Ca^{2+} and, finally, 1.8 mM Ca^{2+} . All solutions were warmed at 37°C and oxygenated. Myocytes were studied within 6 h from the time of isolation, as previously reported (15, 37). While cells were not analyzed with the AFM, they were kept in a CO_2 -water-jacketed incubator (SANYO) in TyBS with 200 μ M Ca^{2+} , which provided a 37°C, 5% CO_2 -humidified environment. To quantify cardiomyocyte viability, cardiomyocytes were stained with propidium iodide (PI) in a petri dish chamber. Cells in the chamber were photographed using an Olympus IX81 inverted microscope. Total cells, as well as PI-stained (nonviable) cells, were counted. Control myocyte isolations yielded $\sim 70\%$ viable cells, whereas isolations in diabetic mice yielded $\sim 60\%$ viable cells.

AFM. AFM indentation tests were conducted with an atomic force microscope (BioScope Catalyst, Bruker). After isolation, myocytes in TyBS (1.8 mM or 200 μ M Ca^{2+}) were plated on polylysine-coated glass microslide chambers (Sigma) for 10 min. Attached cardiomyocytes were incubated with PI for 5 min in darkness and washed carefully three times with TyBS with different ionic compositions: 1) normal physiological condition, 2) low extracellular Ca^{2+} condition, or 3) contraction condition (see *Composition of TyBS*).

The plated myocytes were placed into the inverted Nikon microscope coupled to the AFM. Isolated cells were studied using an AFM fluid cantilever holder at 25°C. The absence of PI fluorescence was used for selection of viable isolated cardiomyocytes, and only these were measured. All AFM measurements were conducted within 1 h after insertion of the AFM head. The silicon nitride probe (DNP-10, Bruker; *cantilever D*), with a tip radius of 20–60 nm, was attached to a triangular 200- μ m-long cantilever with a spring constant of 0.06 N/m, according to the manufacturer's instructions. The indentation protocol was as follows: 1) a $\times 20$ and $\times 40$ magnification eyepiece was used to position the cantilever directly above the surface of an immobilized myocyte; 2) a fast low-resolution 200- to 500-nm image of the middle of the longitudinal axis of the cardiomyocytes was obtained in the contact mode with the DNP-10 probe; and 3) the "point-and-shoot" application of the AFM software was used to select a series of points over the obtained image. Proper force curves with an indentation-and-retraction rate of 6 μ m/s were obtained in the force calibration mode at selected points. A low (1-Hz) frequency was set; this frequency was found to minimize not only hysteresis, but also drag force, and to maximize the number of force curves that were captured, as previously described (7, 14, 16, 22). At least 128 force curves were captured for each cell.

The indentation force (F) was calculated using Hooke's law, $F = k\delta$, where k is the cantilever's spring constant and δ is the cantilever's measured deflection. The spring constant k was calibrated using the thermal noise method ("thermal tune" application of Bruker AFM software) and was 0.067 N/m. The indentation depth h was calculated from the difference between the z movement of the piezoelectric

motor and the deflection (δ) of the cantilever. The equation relating the total elastic force exerted by the indenter (F_e) with pyramidal geometry over the sample is given by (26)

$$F_e = \frac{4E^* \tan(\alpha)}{\pi \sqrt{\pi}} h^2 \quad (1)$$

where E^* is the indenter sample's reduced Young's modulus, or AEM, and α is the half-pyramid angle. For indenters of a material much stiffer than the sample, the reduced Young's modulus is given approximately by $E^* \approx E/(1 - \nu^2)$, where E is Young's modulus and ν is the sample's Poisson ratio ($\nu \approx 0.5$ for incompressible materials such as the cell cytoplasm). Equation 1 was used to fit the approaching curve from which E is retrieved. It is known from a previous report (26) that if the adhesive force at the tip-sample contact area is not negligible, the total force applied to the indenter during the unloading process is the sum of the elastic force given in Eq. 1 and the adhesive force (F_a) at the indenter-sample contact area. The total force [$F(h)$] as a function of the indentation depth is given by

$$F(h) = \frac{4E \tan(\alpha)}{(1 - \nu^2)\pi \sqrt{\pi}} h^2 - \frac{32\gamma_\alpha \tan(\alpha)}{\pi^2 \cos(\alpha)} h \quad (2)$$

Thus the total force is composed of two terms. The first term is quadratic in h and accounts for the elastic force. The second term is linear in h and accounts for the adhesive force. This last term gives negative values of F at low values of h , a feature observed experimentally in unloading force curves obtained with AFM. Equation 2 was used to fit the retracting curves and extract the work of adhesive forces (γ_α) from the linear term in h . We prefer to account for the effect of adhesion force by fitting all points for each retraction curve (Eq. 2), instead of determining the unbinding force (i.e., the rupture point in the retraction curve). This last method uses a single point of the curve and is affected by random noise fluctuations, resulting in higher dispersion.

Note that E can also be retrieved from the quadratic term of the retracting curve. However, this is not the usual practice, since the viscoelastic cell behavior introduces a hysteresis loop even at low rates. Thus the elasticity estimation differs between the approaching and the retracting curves.

Composition of TyBS solutions. For the normal physiological condition, TyBS with 1.8 mM Ca^{2+} (in mM: 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucose, and 5 HEPES, pH 7.4) was used. For the low extracellular Ca^{2+} condition, TyBS with 100 nM free Ca^{2+} was used. The free Ca^{2+} concentration was calculated using the apparent Ca-EGTA association constants provided by Schwartzenbach and a computer program described by Fabiato and Fabiato (2, 9). The composition of the TyBS with 100 nM free Ca^{2+} was 135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 50 μM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 35.7 μM CaCl_2 , 10 mM glucose, and 5 mM HEPES, pH 7.4. For the contraction condition, cells were incubated in high- K^+ TyBS (in mM: 5.4 NaCl, 140 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucose, and 5 mM HEPES, pH 7.4).

AFM images. AFM images from fixed isolated cardiomyocytes were obtained with an atomic force microscope (BioScope Catalyst, Bruker). After isolation, cardiomyocytes were fixed for 10 min at 4°C in 3% paraformaldehyde, washed three times with MilliQ ultrapure water, and imaged using a silicon nitride probe (ScanAsyst-Air, Bruker). The probe had a tip radius of 2 nm, was attached to a triangular 115- μm -long cantilever, and had a spring constant of 0.4 N/m, according to the manufacturer's specifications. The images were obtained in the peak force tapping mode using the ScanAsyst-Air application (40 \times 40- μm scan size and 640 \times 640-pixel resolution) and were used to measure height of isolated cardiomyocytes.

Statistical methods for data analysis. A set of ~ 20 points from each cell image was selected using the point-and-shoot option of the AFM device. A minimum of 12 force curves were acquired for each point. From the data set for each cell type (control and diabetic), the

force curves were fitted with a second-order polynomial. Since the ramp size of the force curve was kept constant during all measurements for each cell, some force curves were not properly acquired. Thus the fits with a correlation coefficient (r^2) < 0.98 were discarded. Using Eq. 2, Young's modulus and the work of the adhesion force were retrieved. A normalized histogram for Young's modulus was constructed and fitted with a Gaussian curve. Data points outside the 95% confidence interval ($\bar{E} \pm 2\sigma$) were discarded, and the histogram and Gaussian fit were recalculated without these points. Then Student's t -test was used to determine if the two sets of data (control and diabetic) were significantly different from each other. This protocol was performed for all the experimental conditions.

All data are expressed as means \pm SD. Student's t -test was used for comparison between groups. In all cases, $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Characterization of diabetic animals. In adult male mice, a single injection of STZ (150 mg/kg ip) resulted in high blood glucose levels (> 250 mg/dl). In the 1st wk, there was no difference in body weight or glycemia level between the diabetic and control mice (Fig. 1, A and B). After the 2nd wk, body weight was lower ($P < 0.05$) and glycemia level was higher ($P < 0.0001$) in the diabetic than control mice. Blood glucose levels remained in the range of 160 mg/dl in vehicle-injected control animals and in animals prior to STZ injection (Fig. 1A). Over time, STZ-injected hyperglycemic animals developed symptoms of severe diabetes, characterized by polyuria, polydipsia, and poor body weight gain (Fig. 1, B and D). Figure 1C shows that 75% of these diabetic mice died before the end of the study (12–13 wk), while 91.6% of the animals in the control group survived.

Myocardial collagen accumulation, fragmentation of myocardial fibers, and inhibition of the SERCA2a pump. Hematoxylin-eosin-stained histological images showed well-arranged myocardial cells, with clear cellular nucleus and uniformly stained cytoplasm in the control group (Fig. 2, A and B). However, in diabetic animals, myocardial cells lined up in disorder, cellular nucleus sizes were irregular, and the myocardial fibers were fragmented and disordered. Moreover, the heart tissue contractile apparatus appeared severely disrupted (Fig. 2, C and D).

As previously shown (30), we detected interstitial collagen accumulation in heart tissue sections from diabetic mice (Fig. 2, C and D) compared with control mice (Fig. 2, A and B), where no collagen aggregates were observed. On the other hand, and consistent with previous reports (29–31), in LV homogenates from diabetic animals, we detected a reduction of SERCA2a pump expression compared with age-matched controls (Fig. 3). β -Actin was used as the loading control.

Viability of isolated cardiomyocytes and AFM images. Cardiomyocytes were isolated from control or diabetic mice and incubated with PI (see MATERIALS AND METHODS). Figure 4B shows a typical fluorescence image of myocytes isolated from control animals and incubated with PI. Figure 4A shows the normal-light image of the same preparation of isolated myocytes. Figure 4C depicts an isolated cardiomyocyte with the triangular AFM cantilever. Myocytes isolated from control animals were $\sim 10\%$ more viable (Ca^{2+} -resistant) than those from diabetic animals. AFM images from fixed isolated cardiomyocytes showed that the height of the smallest control cardiomyocytes was $2.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$ ($n = 40$) compared with

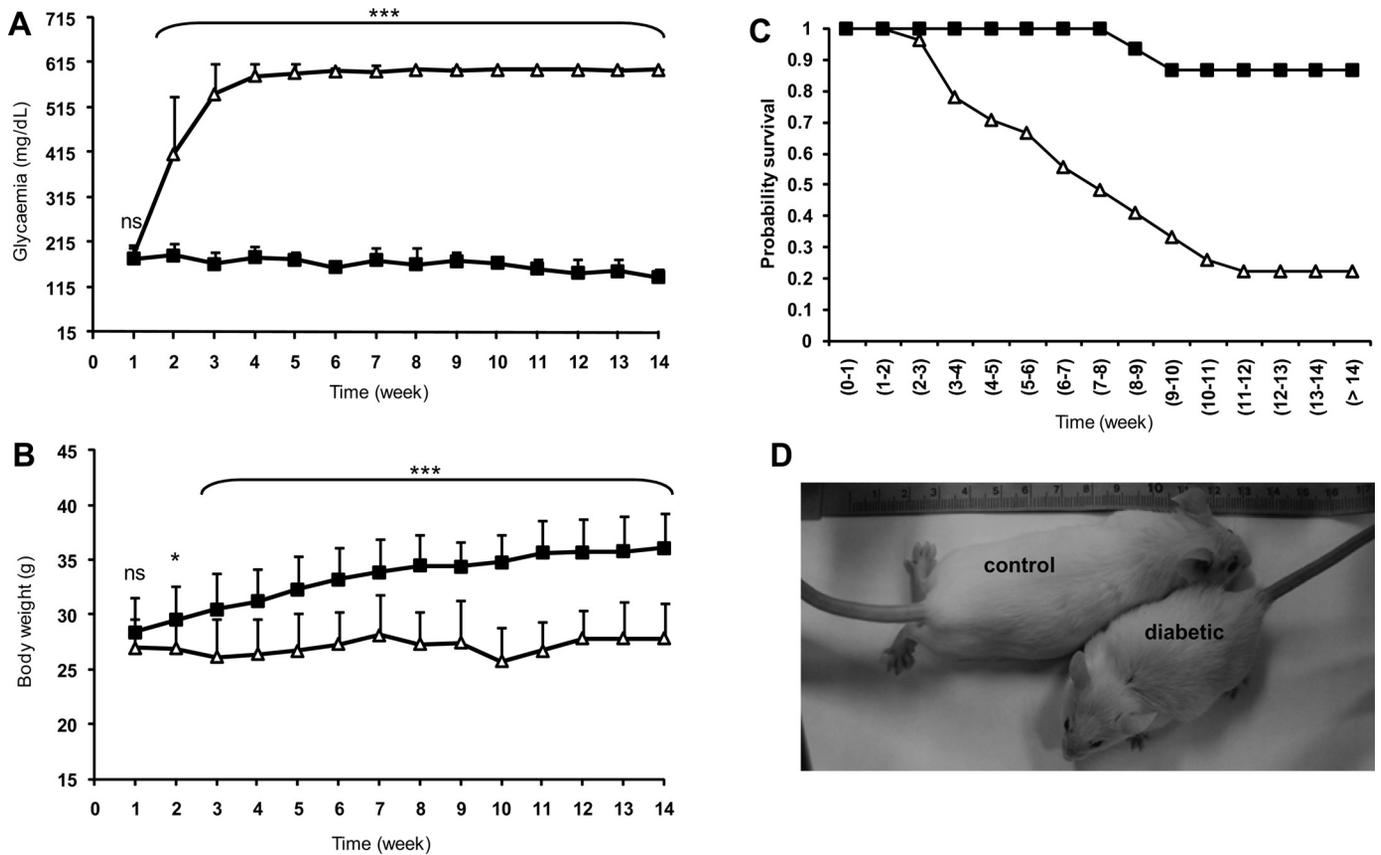


Fig. 1. A–C: characterization (glycaemia level, body weight, and survival rate) of streptozotocin (STZ)-induced diabetic (Δ) and control (\blacksquare) mice. Values are means \pm SD of 12 animals per group. D: representative image of a 4.5-mo-old control mouse and a 4.5-mo-old STZ-injected diabetic mouse. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$; ns, not significant.

$3.2 \pm 1.5 \mu\text{m}$ ($n = 40$) for diabetic cardiomyocytes (no significant difference, by Student's t -test). Figure 4, D and E, shows an example of an AFM image from a control isolated cardiomyocyte, and Fig. 4, G and H, shows an AFM image from a diabetic isolated cardiomyocyte. These images were obtained by scanning a $40 \times 40\text{-}\mu\text{m}$ sample area and were used to measure fixed isolated cardiomyocyte height. Height measurements of isolated control and diabetic cardiomyocytes are shown in Fig. 4, F and I, respectively.

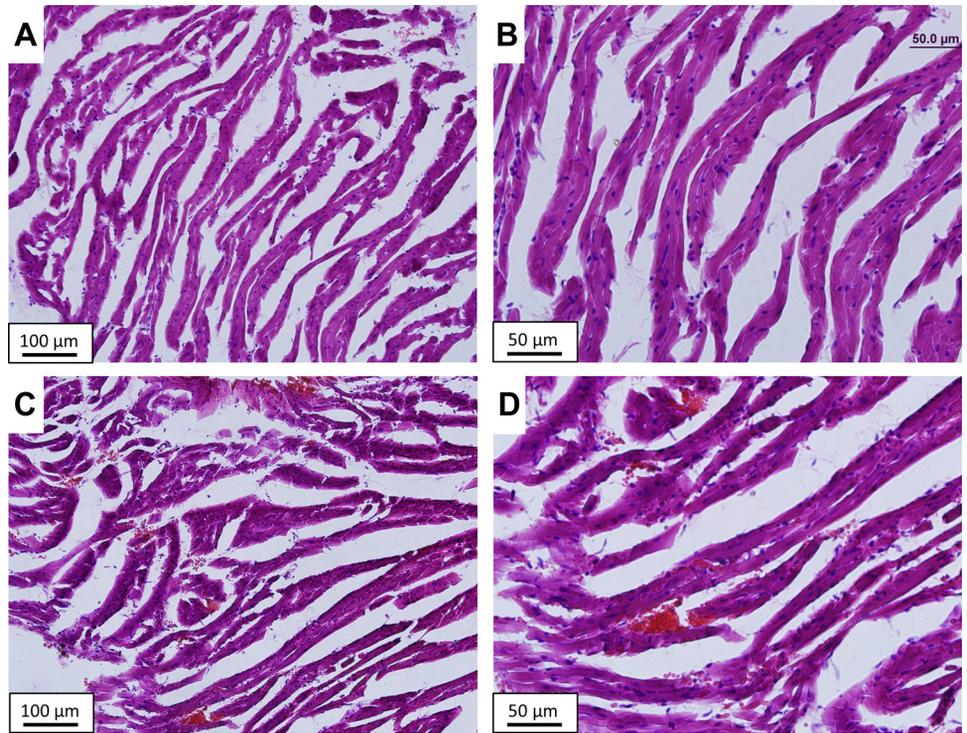
AEM of isolated cardiomyocytes. Figure 5A shows force curves from control and diabetic cardiomyocytes. The force curves on live cells showed lower indentation depth in the diabetic than control cardiomyocytes at an equally applied force. A priori, these results indicate that diabetic cardiomyocytes are stiffer. To confirm this, each curve was fitted by a second-order polynomial. To avoid the effect of the substrate on the stiffness measurements, only the first 100 nm of each curve were considered for the polynomial fit. The correlation coefficient (r^2) was >0.98 , in each case indicating good agreement between the theoretical model and the experiment. The values obtained for E and γ_a were as follows: $E_d = 75.3 \text{ kPa}$ and $\gamma_a^d = 2.39 \times 10^{-4} \text{ J/m}^2$ for diabetic cardiomyocytes and $E_c = 37.4 \text{ kPa}$ and $\gamma_a^c = 0.18 \times 10^{-4} \text{ J/m}^2$ for control cardiomyocytes.

Figure 5B shows the Young's modulus normalized histogram obtained from all diabetic (3 animals, 14 cells, 1,800 force curves) and control (4 animals, 14 cells, and 2,780 force

curves) samples. Each histogram was fitted with a Gaussian curve to obtain the mean and standard deviation of the Young's modulus. The AEM of diabetic cardiomyocytes ($E_d = 91 \pm 14 \text{ kPa}$) was significantly different ($P < 0.01$) from that of control cardiomyocytes ($E_c = 43 \pm 7 \text{ kPa}$). The mean of the elastic modulus was 112% higher for diabetic than control cardiomyocytes. Figure 5C shows the normalized histogram for the work of adhesive force obtained from all samples of each type of cell. Again, a Gaussian fit was used to retrieve the mean value and the standard deviation. For diabetic and control cells, $\gamma_a^d = 2.2 \pm 0.8 \times 10^{-4} \text{ J/m}^2$ and $\gamma_a^c = 0.21 \pm 0.04 \times 10^{-4} \text{ J/m}^2$, respectively.

AEM of isolated cardiomyocytes in TyBS with different ionic compositions. The AEM of control and diabetic isolated cardiomyocytes was measured in the presence of TyBS containing 100 nM free extracellular Ca^{2+} (low extracellular Ca^{2+} condition; Table 1). Under this experimental condition, the AEM of diabetic cardiomyocytes ($E_d = 103 \pm 12 \text{ kPa}$) was significantly different ($P < 0.01$) from that of control cardiomyocytes ($E_c = 39 \pm 6 \text{ kPa}$). However, no significant differences were detected when the AEM of control ($E_c = 39 \pm 6 \text{ kPa}$) or diabetic ($E_d = 103 \pm 12 \text{ kPa}$) cardiomyocytes measured with low extracellular Ca^{2+} were compared with the AEM of control ($E_c = 41 \pm 6 \text{ kPa}$) or diabetic ($E_d = 95 \pm 14 \text{ kPa}$) cardiomyocytes measured in normal physiological TyBS (containing 1.8 mM extracellular CaCl_2 ; Table 1).

Fig. 2. Myocardial collagen accumulation in heart tissue sections from control and diabetic mice. Representative micrographs show myocardial collagen accumulation in left ventricular (LV) sections from a control mouse (A and B) and a mouse in which diabetes was induced by STZ injection (C and D). Cardiac tissues were fixed in 3% paraformaldehyde, cryoprotected in 30% sucrose for 48 h, and embedded in tissue-freezing medium. Sections (5 μm) were stained with hematoxylin and eosin for light-microscopic morphological study. A and B: LV sections from a control mouse at ×20 and ×40 magnification, respectively. C and D: LV sections from a STZ-treated mouse at ×20 and ×40 magnification, respectively.



The AEM changed dramatically (in control and diabetic cardiomyocytes) when high K⁺ (140 mM) was included in TyBS containing 1.8 mM Ca²⁺ (contraction condition). In control cardiomyocytes, AEM was 106 ± 5 kPa. In diabetic cardiomyocytes, AEM was 324 ± 11 kPa, which was significantly higher than AEM in control cardiomyocytes (Table 1).

F-actin and confocal microscopy. Isolated cardiomyocytes of both groups were obtained and stained with fluorescent phalloidin (see MATERIALS AND METHODS). Control cardiomyocytes showed regular and well-defined actin organization, while diabetic cardiomyocytes showed a more diffuse and irregular actin disposition (Fig. 6). The differences can be visualized in the surface plot of representative control and diabetic cardiomyocytes (Fig. 6, C and F, respectively). Laser confocal images from 5-μm sections of myocardium stained with fluorescent phalloidin showed well-defined and well-ordered actin filaments in the control samples and disordered

and broken actin filaments in the diabetic samples (data not shown).

DISCUSSION

Novel experimental data are presented in this study, which uses the AFM nanoindentation function to analyze, with a nanoscale resolution, isolated cardiomyocytes from control and diabetic mouse hearts. The results suggest that living diabetic cardiomyocytes are stiffer than control cardiomyocytes. Diabetes was induced in mice by STZ administration, which is a well-characterized animal model for induction of type 1 diabetes (5, 24, 31). All diabetic animals showed high blood glucose levels and developed severe symptoms of diabetes, characterized by polyuria, polydipsia, and poor body weight gain (Fig. 1). Previous studies of STZ-induced type 1 diabetic animals showed many functional and structural cardiac muscle

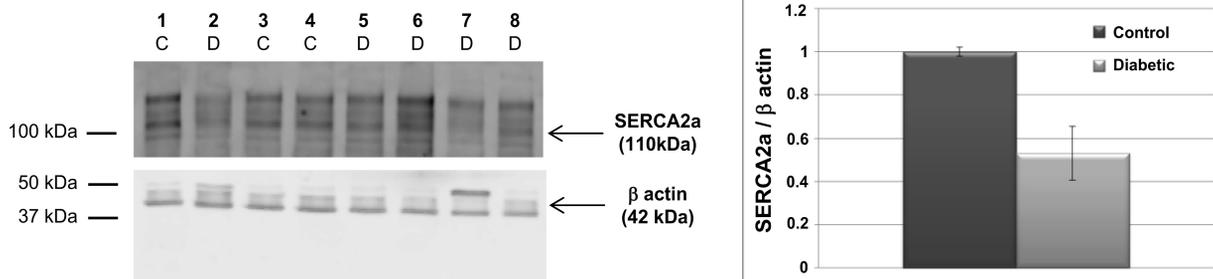


Fig. 3. Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) pump. *Left*: representative images obtained from Western blot analysis of LV samples from control and diabetic (STZ-treated) mice. Frozen heart tissue was homogenized in lysis buffer, and proteins were resolved by 10% SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and identified using appropriate antibodies (see MATERIALS AND METHODS). Original captured image of the polyvinylidene difluoride membrane, which was spliced between 50- and 75-kDa protein standards, is shown. *Top blot*: anti-SERCA2a antibody; *bottom blot*: anti-β-actin antibody. *Lanes 1–8* are shown for control (C) and diabetic (D) samples. *Right*: protein bands analyzed using ImageJ software. Significant differences were detected between control (n = 3) and diabetic (n = 5) bands corresponding to SERCA2a (P < 0.05, by Student's t-test).

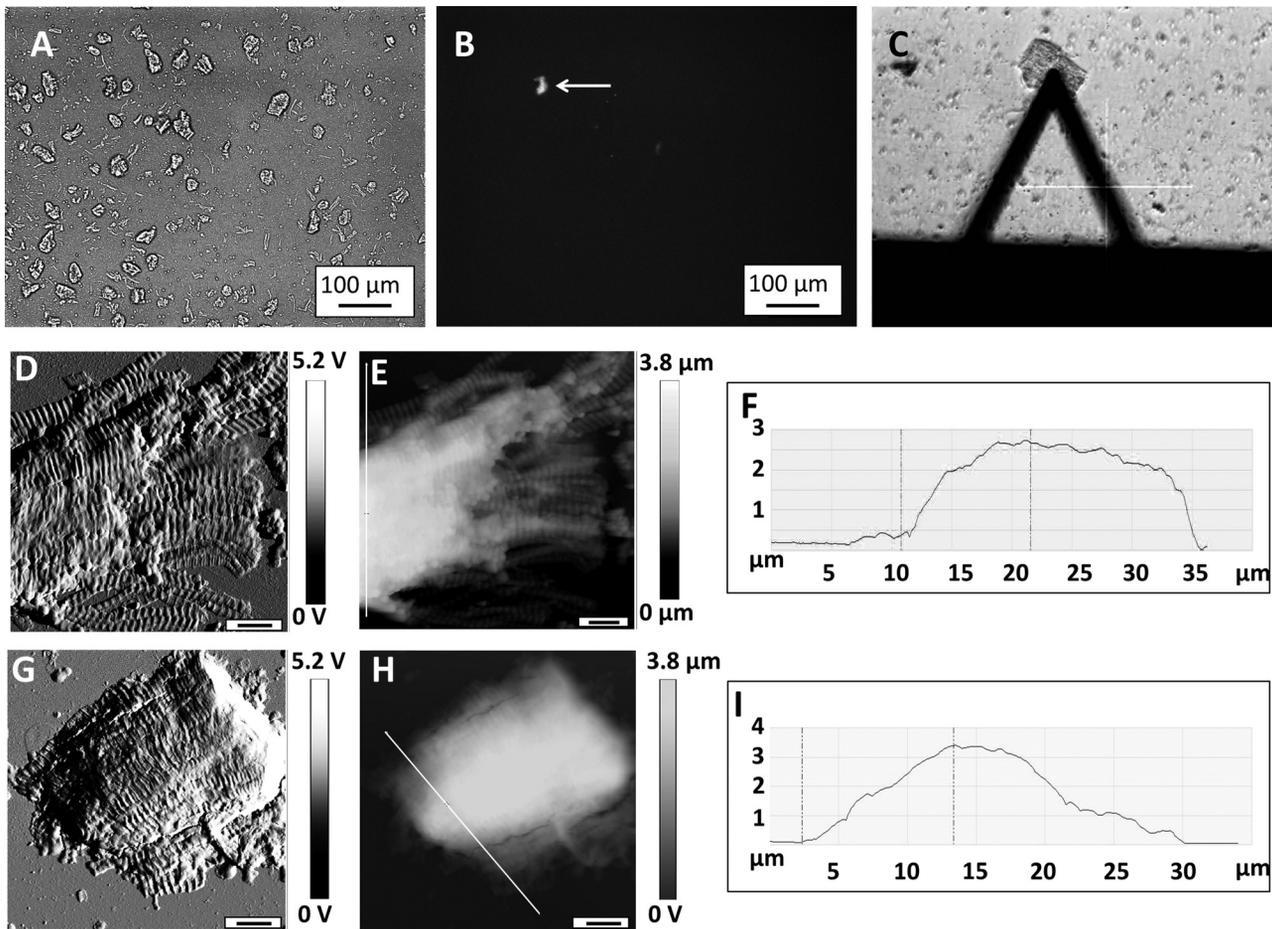


Fig. 4. Optical and atomic force microscopy (AFM) images of isolated cardiomyocytes. *A*: optical microscopy image ($\times 10$) of live isolated cardiomyocytes. Cardiomyocytes were isolated (see MATERIALS AND METHODS), incubated for 5 min with propidium iodide, plated on polylysine-treated glass, and imaged using an inverted microscope coupled to the AFM. *B*: fluorescence image ($\times 10$) of the preparation shown in *A*. *C*: image ($\times 20$) of an isolated cardiomyocyte with the triangle cantilever used to measure force curves. *D*: representative deflection AFM image of a fixed isolated control cardiomyocyte. *E*: control height image. *F*: height measurement of a control cardiomyocyte. *G*: representative deflection AFM image of a fixed isolated diabetic cardiomyocyte. *H*: diabetic height image. *I*: height measurement of a diabetic cardiomyocyte. Scale bars (*D*, *E*, *G*, and *H*) = 5 μm .

alterations (5, 19, 24, 30, 31). Consistent with these findings, interstitial collagen accumulation was observed (30) and SERCA2a pump expression was reduced (29–31) in heart tissue sections from diabetic mice (Fig. 2, *C* and *D*, and Fig. 3, respectively). In rats, after a prolonged period of diabetes, a disruption of heart tissue contractile apparatus was reported (19). Control isolated cardiomyocytes stained with phalloidin showed regular and well-defined actin organization, while the diabetic cardiomyocytes showed more diffuse and irregular actin disposition (Fig. 6). Additionally, in sections of diabetic mouse myocardium stained with phalloidin, we detected disordered and broken actin filaments (data not shown). Consistent with these findings, fragmentation of myocardial fibers in diabetic mice was observed (Fig. 2). Thus, hearts of diabetic animals used in the present study were affected by the induced pathology.

AFM has been employed to measure the viscoelastic response of different cell types (13). The effect of aging and obesity on vascular smooth muscle cell stiffness (8, 21, 38) and the effect of aging on cardiomyocyte stiffness (15) were analyzed using AFM. Cell thickness is an important factor in determining AEM. Substrate contributions to the elastic mod-

ulus measurement can be neglected if the AFM tip never indents $>10\%$ of the cell thickness (13). AFM images of isolated cardiomyocytes in the present study showed that the height of the smallest cardiomyocyte was $2.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$ for the control preparation and $3.2 \pm 1.5 \mu\text{m}$ for the diabetic preparation whereas data were analyzed with a $0.1\text{-}\mu\text{m}$ indentation (Fig. 4). Thus, substrate contribution can be neglected. AFM images were obtained by scanning a $40 \times 40\text{-}\mu\text{m}$ sample area with a resolution of 640×640 pixels. At this resolution level, images showed no differences between fixed control and diabetic cardiomyocytes. Further AFM image analysis at a higher resolution would be necessary to compare possible changes in diabetic cardiomyocyte topography. It has been reported that cardiomyocytes are softer in the nuclear region and become stiffer toward the periphery (25). To avoid this kind of data interference, all force curves were taken from the middle of the longitudinal axis of all cardiomyocytes from control and diabetic mice.

The AFM technique has been well documented in its ability to measure cytoskeletal components (34). In the case of live isolated cardiomyocytes, AFM indentation measurements register changes in the myocyte sarcolemma, sarcomeric skeleton,

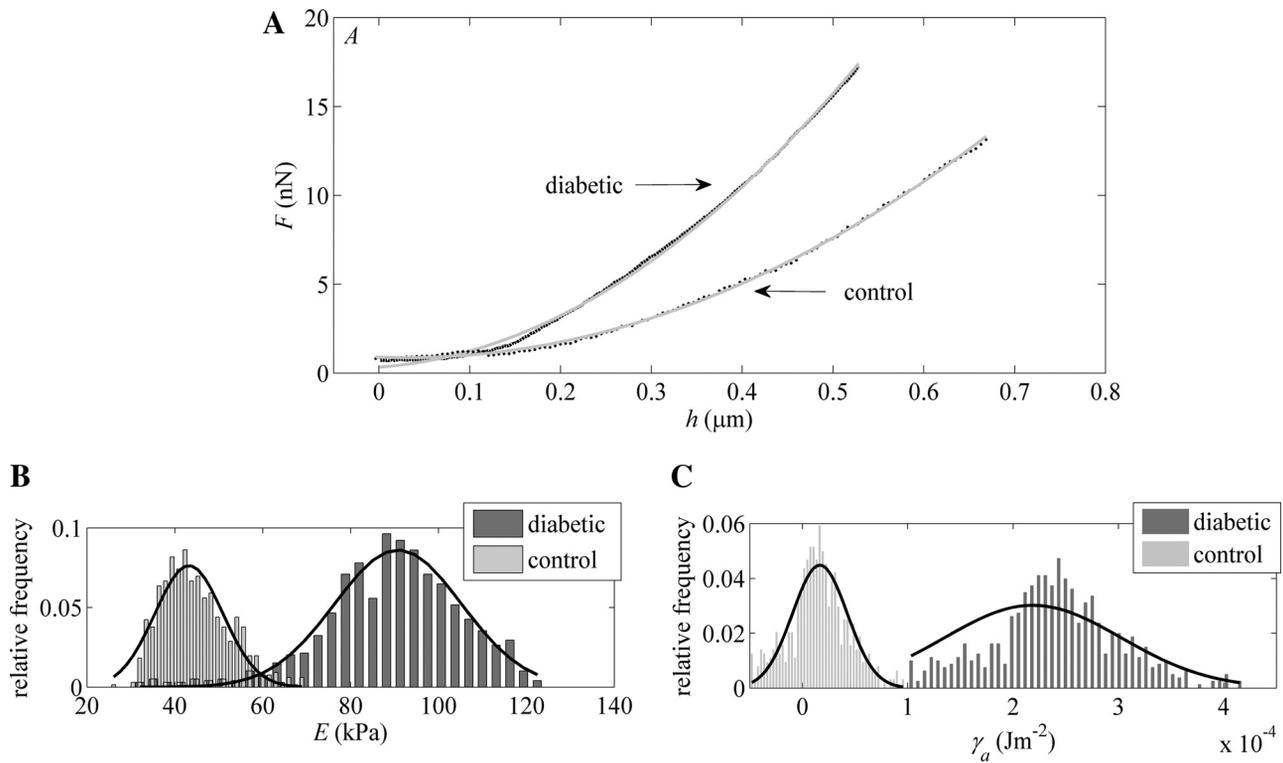


Fig. 5. Force curves, apparent elastic modulus (AEM), and work of adhesive force (γ_a) of isolated cardiomyocytes. *A*: representative force (F) curves of diabetic (dashed line) and control (dotted line) cardiomyocytes. A 2nd-order polynomial fit (continuous line) is also shown for each curve. Correlation coefficient of the fit was >0.98 for each case, indicating the goodness of fit of the model expressed in Eq. 1. h , Height. *B*: AEM histograms for diabetic and control cardiomyocytes. Sets of data were obtained for 3 diabetic animals (14 cells, 1,800 force curves) and 4 control animals (14 cells, 2,780 force curves). A Gaussian fit was plotted for each histogram to compute the mean and standard deviation of the elastic modulus (E). *C*: histograms showing γ_a for diabetic and control cardiomyocytes (data sets are the same as those used in *B*).

and cytoskeletal proteins, such as tubulin, desmin, and actin. In a previous report, the effect of aging in cardiomyocytes of young and old male rats was studied by AFM nanoindentation (15). A significant increase was observed in the AEM of cardiomyocytes from older animals (42.5 ± 1.0 kPa) compared with those from young rats (35.1 ± 0.7 kPa). According to our data, the mean AEM was 112% higher for diabetic than control cardiomyocytes: 91 ± 14 vs. 43 ± 7 kPa in the normal

Table 1. Apparent elastic modulus of control and diabetic isolated cardiomyocytes in Tyrode buffer solution with different ionic compositions

	Apparent Elastic Modulus, kPa	
	Control	Diabetic
Normal physiological condition	41 ± 6^a	95 ± 14^b
Low extracellular Ca^{2+} condition	39 ± 6^c	103 ± 12^d
Contraction condition	106 ± 5^e	324 ± 11^f

Values are means \pm SD; 800-1,200 force curves were obtained from 4-6 cells from 3 mice. Cardiomyocytes isolated from control and diabetic mice were plated on polylysine-coated glass microslide chambers. Attached cardiomyocytes were incubated in Tyrode buffer solution with different ionic compositions: normal physiological condition (1.8 mM Ca^{2+} and 5.4 mM KCl), low extracellular Ca^{2+} condition (100 nM free Ca^{2+} and 5.4 mM KCl), or contraction condition (1.8 mM Ca^{2+} and 140 mM KCl). Normalized Young's modulus histograms were obtained from all experimental conditions. Each histogram was fitted with a Gaussian curve. Statistical significance is as follows: $P < 0.05$ (by Student's t -test) for a vs. b, c vs. d, e vs. f, a or c vs. e, and b or d vs. f; no significant difference for a vs. c and b vs. d.

physiological condition (Fig. 5). Therefore, the material properties of cardiomyocytes are affected in a similar manner by diabetes and aging, since both conditions resulted in stiffer cells. However, changes promoted by diabetes seem to be greater than changes promoted by aging.

The AEM of cardiomyocytes isolated from control and diabetic mice was also measured in the presence of TyBS containing 100 nM free extracellular Ca^{2+} (low extracellular Ca^{2+} condition; Table 1). Under this experimental condition, the AEM of diabetic cardiomyocytes ($E_d = 103 \pm 12$ kPa) was significantly different ($P < 0.01$) from that of control cardiomyocytes ($E_c = 39 \pm 6$ kPa). We did not measure cytosolic Ca^{2+} concentration, but in the low extracellular Ca^{2+} condition, in nonstimulated viable cardiomyocytes (absence of PI signal), almost certainly, cytosolic Ca^{2+} concentration will be in the same nanomolar range. Thus it seems reasonable to consider that these cardiomyocytes were at rest. On the other hand, some reports showed no difference between basal Ca^{2+} concentration of control and diabetic cardiomyocytes (20). Therefore, very likely, the difference in the AEM between diabetic and control cardiomyocytes is not related to the contractile state in those conditions but, rather, to changes promoted by diabetes in the material properties of cardiomyocytes. In fact, we observed changes in F-actin organization when isolated control and diabetic cardiomyocytes stained with phalloidin were compared. Control isolated cardiomyocytes showed regular and well-defined actin organization, while the diabetic cardiomyocytes showed more diffuse and irregular

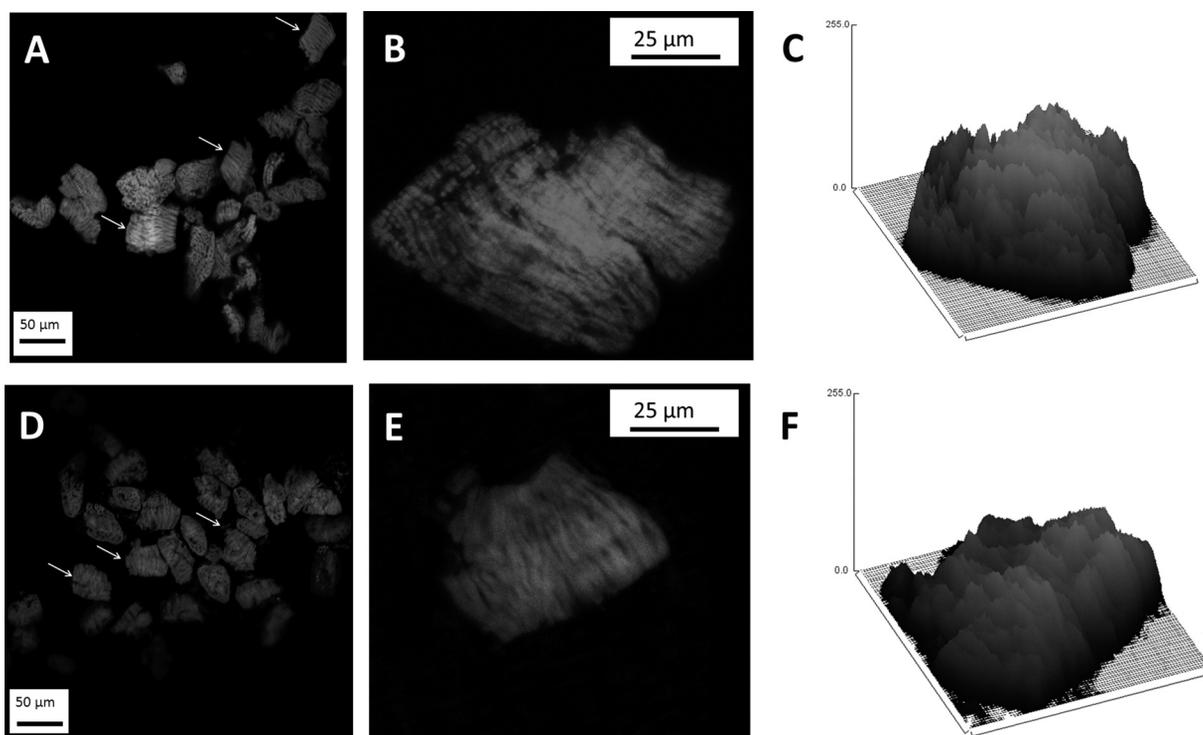


Fig. 6. F-actin in isolated control and diabetic cardiomyocytes. Confocal microscopy images ($\times 40$ and $\times 100$) show isolated control and diabetic cardiomyocytes stained with fluorescent phalloidin. Cardiomyocytes were isolated and fixed (see MATERIALS AND METHODS), incubated for 40 min with fluorescent phalloidin, and imaged using a confocal microscope. *A*: control cardiomyocytes ($\times 40$). Arrows indicate the most representative control cells, showing regular and well-defined actin organization. *B*: control cardiomyocyte ($\times 100$). *C*: surface plot of cell image in *B*. *D*: diabetic cardiomyocytes ($\times 40$). Arrows indicate the most representative diabetic cells showing more diffuse and irregular actin disposition. *E*: diabetic cardiomyocyte ($\times 100$). *F*: surface plot of cell image in *E*.

actin disposition (Fig. 6). On the other hand, no significant differences were found between the AEM of control or diabetic cardiomyocytes measured in the low extracellular Ca^{2+} condition and the normal physiological condition (Table 1). A possible explanation for the absence of differences is that viable cardiomyocytes were selected for all AFM measurements. Very likely, their cytosolic Ca^{2+} concentration was in the nanomolar range (resting). The AEM changed dramatically (in control and diabetic cardiomyocytes) when high (140 mM) K^+ was included in TyBS containing 1.8 mM Ca^{2+} (contraction condition). In control cardiomyocytes, AEM was 106 ± 5 kPa. On the other hand, AEM was significantly higher in diabetic than control cardiomyocytes and was 324 ± 11 kPa. The dramatic change in AEM in control and diabetic cardiomyocytes measured in high- K^+ TyBS might be explained by the opening of membrane Ca^{2+} channels, the increase in cytosolic Ca^{2+} concentration, and cardiomyocyte contraction (contraction condition). Even in this condition, the AEM was significantly higher in diabetic than control cardiomyocytes. Thus the difference between diabetic and control cardiomyocytes holds up in this altered contractile state, and we believe this is, in part, due to the cytoskeletal state in diabetic cardiomyocytes. Therefore, diabetic cardiomyocytes were stiffer than control cardiomyocytes in all tested conditions, supporting the idea that the mechanical properties of live cardiomyocytes were affected by diabetes.

It has been reported that excessive fibrosis, deposition of advanced glycation end products, and cardiomyocyte stiffness are mechanisms responsible for raising myocardial stiffness in diabetes mellitus (4, 10, 32). Cardiomyocyte stiffness was

determined by measuring resting tension (passive force at the same sarcomere length, using a force transducer and a piezoelectric motor) in single isolated cardiomyocytes. According to previously mentioned reports, resting tension was measured in frozen biopsy samples that, prior to experiments, were defrosted, mechanically disrupted, and incubated with Triton X-100. This procedure provokes disruption of sarcolemmal and sarcoplasmic membranes. Therefore, isolated cardiomyocytes became dependent on externally supplied Ca^{2+} for active force development. Thus the elevation of passive force was attributed to alterations of myofilament or cytoskeletal proteins. Hypophosphorylation of the cytoskeletal protein titin stiff isoform was suggested to be responsible for the elevation of passive force in diabetic cardiomyocytes (10).

According to our data, the mean AEM was higher (stiffer) for diabetic than control cardiomyocytes (Fig. 5D). Thus our results are in agreement with the previously mentioned studies of isolated cardiomyocytes with disrupted membranes. Since we checked the viability of the isolated cardiomyocytes before and after force curve measurements (by checking the absence of PI fluorescence using the inverted microscope coupled to the AFM), we can extend the observation to live cardiomyocytes. In our studies, cardiomyocyte membranes were undisturbed, suggesting that changes in membranes of diabetic cardiomyocytes probably contribute to the higher elastic modulus measured by AFM nanoindentation. Additionally, changes in F-actin in isolated cardiomyocytes of diabetic mice (confocal images) indicate changes in their actin organization, which is probably responsible for the higher elastic modulus of the diabetic cardiomyocytes.

As shown in Fig. 5C, adhesive force was higher in diabetic than control cardiomyocytes. Adhesive force represents the interaction force between the tip and the sample. Most probably, as cardiomyocytes' sarcolemmas were undisturbed, the contribution of the sarcolemma to adhesive force is an important component. Adhesive force changed from $\gamma_a^c = 0.21 \pm 0.04 \times 10^{-4} \text{ J/m}^2$ in control cardiomyocytes to $\gamma_a^d = 2.2 \pm 0.8 \times 10^{-4} \text{ J/m}^2$ in diabetic cardiomyocytes. This 10.5-fold change in γ_a suggests that cardiomyocytes' sarcolemmas were deeply affected by diabetes. In the present study we showed that adhesive force is greater in diabetic than control cardiomyocytes. These results suggest a change (i.e., an increase) in the number and/or the activation state of adhesion molecules on the surface of the diabetic cardiomyocytes. Further studies are needed to understand the physiological meaning of these results.

In summary, our data show that 3 mo of type 1 diabetes provokes changes in myocardial fibers of mouse hearts (fragmentation and disordering), interstitial collagen deposition, reduction of the SERCA2a pump expression, and changes in F-actin organization. Moreover, the data show that live isolated diabetic cardiomyocytes are stiffer than control cardiomyocytes in all tested conditions, suggesting that the material properties of live cardiomyocytes change with diabetes. Hence, it is very likely that a change in the material properties is an important factor in raising myocardial stiffness in vivo. Further studies are necessary to identify the molecules that are responsible for the increment in stiffness of live diabetic cardiomyocytes. Our data strongly suggest that actin is one of these molecules.

It will be interesting to extend the observations in the present study, in which a type 1 diabetes model was used, to a type 2 diabetes animal model.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Maria Bausero for critically reviewing the manuscript and Rita Pessano for the English language revision of the manuscript.

GRANTS

This research was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay (ANII, FCE_2009_1_2887) and partially by PEDECIBA, Uruguay.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.C.B. is responsible for conception and design of the research; J.C.B., N.B., A.I.Z., I.R., V.B., N.O., and J.P.D. performed the experiments; J.C.B., N.B., A.I.Z., I.R., V.B., N.O., and J.P.D. analyzed the data; J.C.B., N.B., A.I.Z., I.R., V.B., N.O., and J.P.D. interpreted the results of the experiments; J.C.B., N.B., A.I.Z., I.R., V.B., N.O., and J.P.D. prepared the figures; J.C.B., N.B., A.I.Z., and J.P.D. drafted the manuscript; J.C.B. and N.B. edited and revised the manuscript; J.C.B. approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Aksoy P, Escande C, White TA, Thompson M, Soares S, Benech JC, Chini EN. Regulation of SIRT 1 mediated NAD dependent deacetylation: a novel role for the multifunctional enzyme CD38. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 353–359, 2006.
- Benech JC, Wolosker H, de Meis L. Reversal of the Ca^{2+} pump of blood platelets. *Biochem J* 306: 35–38, 1995.
- Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjesen PA, Hildebrandt P, Mehlsen J, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22: 1186–1190, 1999.
- Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111: 774–781, 2005.
- Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 115: 3213–3223, 2007.
- Brum G, Flockerzi V, Hofmann F, Osterrieder W, Trautwein W. Injection of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into isolated cardiac myocytes. *Pflügers Arch* 398: 147–154, 1983.
- Collinsworth AM, Zhang S, Kraus WE, Truskey GA. Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1219–C1227, 2002.
- Chen JY, Tsai PJ, Tai HC, Tsai RL, Chang YT, Wang MC, Chiou YW, Yeh ML, Tang MJ, Lam CF, Shiesh SC, Li YH, Tsai WC, Chou CH, Lin LJ, Wu HL, Tsai YS. Increased aortic stiffness and attenuated lysyl oxidase activity in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 839–846, 2013.
- Fabiato A, Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Paris)* 75: 463–505, 1979.
- Falcão-Pires I, Hamdani N, Borbély A, Gavina C, Schalkwijk CG, van der Velden J, van Heerebeek L, Stienen GJ, Niessen H, Leite-Moreira AF, Paulus WJ. Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness. *Circulation* 124: 1151–1159, 2011.
- Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 23: 105–111, 1974.
- Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 241: 2035–2038, 1979.
- Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 38: 824–833, 2007.
- Li QS, Lee GY, Ong CN, Lim CT. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 609–613, 2008.
- Lieber SC, Aubry N, Pain J, Diaz G, Kim SJ, Vatner SF. Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H645–H651, 2004.
- Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomech* 34: 1545–1553, 2001.
- Meininger GA. The central importance of the cytoskeleton for increased cell stiffness in cardiovascular disease. Focus on “Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation.” *Am J Physiol Cell Physiol* (August 13, 2014). doi: 10.1152/ajpcell.00279.2014.
- Muller DJ, Dufrene YF. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol* 21: 461–469, 2011.
- Murcia AM, Hennekens CH, Lamas GA, Jimenez-Navarro M, Rouleau JL, Flaker GC, Goldman S, Skali H, Braunwald E, Pfeffer MA. Impact of diabetes on mortality in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Arch Intern Med* 164: 2273–2279, 2004.
- Nemoto O, Kawaguchi M, Yaoita H, Miyake K, Maehara K, Maruyama Y. Left ventricular dysfunction and remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Circ J* 70: 327–334, 2006.
- Pierce GN, Russell JC. Regulation of intracellular Ca^{2+} in the heart during diabetes. *Cardiovasc Res* 34: 41–47, 1997.
- Qiu H, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Gansner M, Depre C, Resuello RR, Natividad FF, Hunter WC, Genin GM, Elson EL, Vatner DE, Meininger GA, Vatner SF. Vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circ Res* 107: 615–619, 2010.
- Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J* 70: 556–567, 1996.
- Shah AM, Uno H, Kober L, Velazquez EJ, Maggioni AP, MacDonald MR, Petrie MC, McMurray JJ, Califf RM, Pfeffer MA, Solomon SD. The inter-relationship of diabetes and left ventricular systolic function on outcome after high-risk myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 12: 1229–1237, 2010.

24. **Shiomi T, Tsutsui H, Ikeuchi M, Matsusaka H, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Kubota T, Takeshita A.** Streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 42: 165–172, 2003.
25. **Shroff SG, Saner DR, Lal R.** Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C286–C292, 1995.
26. **Sirghi L, Ponti J, Broggi F, Rossi F.** Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *Eur Biophys J* 37: 935–945, 2008.
27. **Solomon SD, St. John Sutton M, Lamas GA, Plappert T, Rouleau JL, Skali H, Moya L, Braunwald E, Pfeffer MA.** Ventricular remodeling does not accompany the development of heart failure in diabetic patients after myocardial infarction. *Circulation* 106: 1251–1255, 2002.
28. **Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, Turi ZG, Strauss HW, Willerson JT, Robertson T, et al.** The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. The MILIS Study Group. *J Am Coll Cardiol* 14: 49–57, 1989.
29. **Suarez J, Scott B, Dillmann WH.** Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal calcium flux in established diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1439–R1445, 2008.
30. **Sulaiman M, Matta MJ, Sunderesan NR, Gupta MP, Periasamy M, Gupta M.** Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H833–H843, 2010.
31. **Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH.** Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51: 1166–1171, 2002.
32. **van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbely A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ.** Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 117: 43–51, 2008.
33. **Van Hoven K, Factor S.** A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation* 82: 848–855, 1990.
34. **Vinckier A, Semenza G.** Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett* 430: 12–16, 1998.
35. **Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.** Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047–1053, 2004.
36. **Wright JR, Jr., Mendola J, and Lacy PE.** Effect of niacin/nicotinamide deficiency on the diabetogenic effect of streptozotocin. *Experientia* 44: 38–40, 1988.
37. **Wu X, Sun Z, Foskett A, Trzeciakowski JP, Meininger GA, Muthuchamy M.** Cardiomyocyte contractile status is associated with differences in fibronectin and integrin interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H2071–H2081, 2010.
38. **Zhu Y, Qiu H, Trzeciakowski JP, Sun Z, Li Z, Hong Z, Hill MA, Hunter WC, Vatner DE, Vatner SF, Meininger GA.** Temporal analysis of vascular smooth muscle cell elasticity and adhesion reveals oscillation waveforms that differ with aging. *Aging Cell* 11: 741–750, 2012.

