

Programa de Posgrado del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas  
(PEDECIBA Biología)

Maestría en Biología

Sub-área: Biología Celular y Molecular

## **Tesis de Maestría**

Diabetes mellitus: cambios morfológicos, muerte celular y alteraciones del citoesqueleto de actina inducidos por hiperglucemia e hiperlipidemia en la línea celular H9c2 de mioblastos de embriones de rata.

Lic. Andrés Alberro Brage

Orientador: Dr. Juan C. Benech

Tribunal: Dr. Gustavo A. Folle  
Dr. Carlos Negreira  
Dr. Aldo Calliari

Fecha: 2 de Agosto de 2016

## Resumen

La diabetes mellitus representa una amenaza emergente para la salud a nivel global, estimándose que hacia 2030 habrá más de 360 millones de personas en el mundo con esta enfermedad. La cardiomiopatía diabética (CD) es una afección cardíaca que se presenta en pacientes diabéticos independientemente de otras enfermedades cardiovasculares o hipertensión. Varios estudios han mostrado que existe una pérdida de elasticidad en el tejido cardíaco durante esta patología que se ha atribuido entre otras causas, a la aparición de fibras de colágeno intersticiales en el miocardio. Recientemente se ha demostrado por nuestro grupo de investigación que también existe pérdida de elasticidad (aumento en el valor del módulo elástico aparente,  $E^*$ ) a nivel celular en cardiomiocitos aislados. Una de las estructuras que han sido señaladas como potenciales responsables de este aumento del  $E^*$  es el citoesqueleto celular y en particular las fibras de actina del mismo. En este trabajo utilizamos un modelo *in vitro* de cultivo celular de la línea de mioblastos H9c2 para estudiar el efecto de las condiciones diabéticas sobre el corazón. Para ello estudiamos el efecto de una alta concentración de glucosa (HG, 25 mM) y de ácido palmítico (PA, 500  $\mu$ M) sobre: a) la muerte celular; b) la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS); c) modificaciones en las fibras componentes del citoesqueleto y d) la elasticidad celular medida como  $E^*$ . Observamos que el PA provocó un 23,8% de muerte celular, lo que representa un aumento significativo con respecto al control. El medio HG no presentó un aumento significativo en la muerte celular pero sí produjo un incremento significativo de ROS. Al incubar células en condiciones HG y PA (medio HGPA), se produjo un 33% de muerte celular lo que indica que altas concentraciones de glucosa potencian el efecto de muerte del PA. El medio HGPA también provocó cambios en la distribución de actina y  $\alpha$ -tubulina observados mediante inmunocitoquímica. A su vez, este medio produjo cambios en el  $E^*$  de las células, medido por microscopía de fuerza atómica. Cuando las células incubadas en medios control y HGPA fueron tratadas con citocalasina B, el valor de  $E^*$  disminuyó en un 47% y 69% respectivamente. Nuestro trabajo es el primero en mostrar evidencias directas de que modificaciones en las fibras de actina del citoesqueleto contribuyen de manera importante en la disminución de la elasticidad celular en condiciones hiperglucémicas e hiperlipídicas que emulan las condiciones diabéticas. Estos resultados podrían contribuir en el desarrollo de nuevas terapias específicas en el tratamiento de la CD.

## Contenido

Resumen.....	2
Introducción .....	4
Hipótesis y objetivos generales y específicos .....	10
Objetivo general .....	10
Objetivos específicos .....	10
Materiales y métodos.....	11
Cultivos celulares .....	11
Preparación del complejo PA/BSA en solución.....	11
Medidas de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	12
Citometría de flujo .....	12
Microscopía de Fuerza Atómica.....	13
Tratamiento disruptivo del citoesqueleto .....	15
Inmunocitoquímica .....	15
Tratamiento estadístico de datos .....	16
Resultados .....	17
El tratamiento con HGPA y PA inducen muerte celular .....	17
El tratamiento hiperglucémico induce la formación de ROS.....	21
La hiperglucemia e hiperlipidemia inducen cambios en la distribución de actina y alfa-tubulina en el citoesqueleto .....	22
La hiperglucemia y la hiperlipidemia producen un aumento en la rigidez celular.....	24
Modificaciones en el citoesqueleto de actina provocan una disminución en el módulo elástico aparente .....	27
Discusión.....	29
Referencias.....	34

## Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de trastornos metabólicos caracterizadas por defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma sobre los tejidos, o de ambas cosas a la vez. Como resultado, la glucosa no es metabolizada adecuadamente por lo que se acumula en la sangre provocando hiperglucemia. Este efecto provoca a largo plazo daños a las células y tejidos de varios órganos, especialmente corazón, ojos, nervios, riñones y vasos sanguíneos (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003). Hay varios procesos que participan en el desarrollo de la DM que incluyen la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas (una de las causas más frecuentes de DM tipo 1) y la inducción de anomalías que producen una resistencia a la acción de la insulina en tejidos y paralelamente una respuesta compensatoria inadecuada del páncreas (DM tipo 2), la cual es mucho más prevalente (American Diabetes Association 2008). Debido a la alimentación y al estilo de vida contemporáneos, la DM representa una amenaza emergente para la salud humana a nivel global. Hasta el año 2014 el número de personas adultas con DM se estimaba en 422 millones, lo que representa un 8,5% de la población y las proyecciones van en aumento (World Health Organization 2016).

La DM incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas de 2 a 4 veces más que en personas que no tienen la enfermedad. Se estima que esto representa entre un 50% a un 80% de las muertes y es la primera causa de mortalidad en pacientes con DM (Mozaffarian et al. 2015). La DM predispone a un amplio rango de enfermedades que incluye entre otras, hipertensión y enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ECA)(Dokken 2008). Sin embargo, se ha determinado también que la DM provoca alteraciones cardíacas estructurales y funcionales independientemente de los efectos provocados por la hipertensión y ECA. Estas alteraciones involucran engrosamiento de la pared ventricular con disminución del volumen diastólico e hipertrofia del ventrículo izquierdo (Rubler et al. 1972; Stone et al. 1989), fibrosis intersticial, hipertrofia de los miocitos, aumento en la glicosilación de proteínas contráctiles (Kahn et al. 2006; Murarka & Movahed 2010), cambios en el tono adrenérgico (Thackeray et al. 2012), reactivación de genes fetales (Rosa et al. 2013), acumulación de lípidos en los cardiomiocitos y muerte celular (Poornima et al. 2006). En conjunto, todas estas alteraciones redundan en anomalías del miocardio que provocan una disfunción contráctil del corazón conocida como cardiomiopatía diabética (CD). La CD provoca una

pérdida de elasticidad o endurecimiento del tejido cardíaco, lo que causa una disminución en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (Rubler et al. 1972; Battiprolu et al. 2013; Poornima et al. 2006; Murarka & Movahed 2010). Ese endurecimiento se ha atribuido a la acumulación de fibras de colágeno que se intercalan entre las fibras musculares disminuyendo la elasticidad (Van Heerebeek et al. 2008). Sin embargo, recientemente ha sido demostrado por nuestro laboratorio en experimentos realizados en cardiomiocitos provenientes de ratones diabéticos que también ocurre una disminución de la elasticidad a nivel celular y se propuso que esa pérdida de elasticidad en el corazón diabético se debe en parte a modificaciones en el citoesqueleto celular (Benech et al. 2014).

El citoesqueleto es una estructura que colabora en el mantenimiento y organización interna de la células. Aporta asimismo soporte mecánico lo que permite el desarrollo de funciones celulares esenciales como la división y el movimiento. En las células eucariotas está constituido principalmente de proteínas filamentosas que forman tres clases principales de estructuras: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios. Los microtúbulos son los filamentos de mayor tamaño, tienen un diámetro cercano a los 25 nm y están compuestos por tubulina. Los filamentos de actina tienen un diámetro aproximado de 6 nm, se forman por la polimerización de la proteína globular G-actina y son los que cumplen la mayoría de las funciones biológicas (Korn et al. 1987). Los filamentos intermedios poseen un diámetro de aproximadamente 10 nm y están constituidos por un número de diferentes subunidades proteicas. Todos estos filamentos tienen roles importantes en el arreglo y mantenimiento de la integridad de los compartimientos celulares. Se organizan en redes que resisten la deformación y pueden reorganizarse en respuesta a fuerzas aplicadas externamente sobre la célula (Fletcher & Mullins 2010). Varios estudios han sugerido que la hiperglucemia e hiperlipidemia (concentraciones de lípidos en sangre superiores a la normal) están relacionadas con modificaciones sobre las fibras del citoesqueleto (Kita et al. 1996; Dyntar et al. 2001; Kemeny et al. 2013; Benech et al. 2014). Estas modificaciones podrían ser responsables de la pérdida de elasticidad celular, lo cual constituye parte de los objetivos de estudio en el presente trabajo.

Para el estudio de los efectos de la DM en animales se han utilizado varios modelos (revisado por Boudina & Abel 2007). Nuestro laboratorio ha empleado un modelo donde se ha inducido DM tipo 1 en ratones mediante la inyección de estreptozotocina. Esta droga es tóxica para las células beta del páncreas y su administración en dosis adecuadas provoca la

eliminación de las mismas, lo que trae como consecuencia la falta de producción de insulina y la consecuente diabetes. En este modelo, los ratones deben ser mantenidos durante al menos tres meses para estar en condiciones de tomar las muestras. Esto implica un proceso laborioso ya que durante este período los animales requieren cuidados especiales debido a que su calidad de vida se ve muy afectada por la enfermedad y su mortalidad es muy elevada (cercana al 80%). Existen en la literatura varios ejemplos en los cuales se emplearon cultivos de células neonatales o líneas celulares como una aproximación al estudio de la CD en animales (Dyntar et al. 2001; Cai et al. 2002; Pu et al. 2011; Michaelson et al. 2014). La mayoría de los trabajos publicados se han enfocado en analizar el efecto de las condiciones hiperglucémicas (y en menor medida las condiciones hiperlipídicas) en la alteración de procesos bioquímicos como apoptosis, señalización de calcio y producción de especies reactivas. Sin embargo no se ha hecho extensivo el uso de modelos *in vitro* para estudiar el efecto de las condiciones hiperglucémicas e hiperlipídicas sobre propiedades estructurales de las células como la elasticidad, la cual contribuye directamente a la reducción de la función ventricular durante la falla cardíaca en la CD. Por otra parte, el uso de modelos *in vitro*, además de evitar la utilización de animales de experimentación, tiene la ventaja de posibilitar el desarrollo de experimentos en condiciones donde las variables pueden ser controladas de manera precisa.

Varios estudios han mostrado que en condiciones de hiperlipidemia, los niveles altos crónicos de ácidos grasos en sangre pueden provocar que el organismo pierda la capacidad de respuesta a la insulina. Esto se conoce como resistencia a la insulina y produce una reducción de la incorporación de glucosa a las células (McGarry 1992; Folsom et al. 1996; Lovejoy et al. 2002; Savage et al. 2007). En condiciones de hiperlipidemia, los ácidos grasos son incorporados por las células musculares y almacenados en forma de triglicéridos intramiocelulares (TIMC) en cuerpos lipídicos. La hiperlipidemia induce el almacenaje de un exceso de TIMC lo que juega un rol importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Manco et al. 2000). Por otro lado, en las células beta del páncreas en individuos genéticamente predispuestos, los ácidos grasos libres (AGL) desencadenan múltiples mecanismos de toxicidad (lipotoxicidad), incluyendo un aumento en la oxidación y esterificación de los mismos, síntesis acelerada de ceramidas, estrés del retículo endoplásmico e inducción de la apoptosis (Del Prato 2009; Xu et al. 2012). Varios estudios han señalado que la presencia en plasma de ácidos grasos saturados y en particular los de

cadena par entre los que se encuentran el ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), están correlacionados positivamente con la incidencia de DM de tipo 2. Dentro de estos, el ácido palmítico ha sido señalado como uno de los que juega un rol más importante en el efecto lipotóxico (Manco et al. 2000; Lovejoy et al. 2002; Forouhi et al. 2014). Si bien los AGL son necesarios para provocar la liberación normal de insulina (Itoh et al. 2003), la hiperlipidemia contribuye al desarrollo de la resistencia a la insulina en el músculo e impide que las células beta del páncreas compensen esa resistencia mediante el aumento en la secreción de insulina (Bergman & Ader 2000). En condiciones normales el corazón no acumula cantidades significativas de lípidos, sin embargo se ha demostrado que el aumento en la disponibilidad de lípidos en hiperlipidemia hace que los triglicéridos sean acumulados en los cardiomiocitos en forma de cuerpos lipídicos (Sharma et al. 2004; Szczepaniak et al. 2007). El efecto lipotóxico producido durante esta condición puede actuar entonces de forma sinérgica con la hiperglucemia para provocar daños aún mayores en las células, lo que se conoce como glucolipototoxicidad (Boden 2001; Kahn et al. 2006; Savage et al. 2007; Walther & Farese 2012).

Varios estudios mostraron que la hiperglucemia e hiperlipidemia aumentan los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células de corazón y reportaron una relación directa entre éstas y la muerte celular (Battiprolu et al. 2010; Cai & Kang 2003; Diogo et al. 2013). El término ROS se refiere a moléculas que pertenecen al grupo de los radicales libres. Estas moléculas poseen un electrón desapareado en su orbital más externo lo que determina que las mismas sean altamente reactivas al intentar ya sea donar ese electrón o aceptar un protón de otro compuesto para obtener un par de electrones estable. Esta alta reactividad produce la formación de enlaces entre los ROS y otros compuestos celulares lo que puede alterar la estructura y la función de un tejido, así como dañar componentes celulares como la membrana plasmática u organelos. La glucosa y los ácidos grasos pueden ser transportados a la mitocondria para ser oxidados y producir ATP. Si bien en condiciones normales la oxidación de ácidos grasos es la principal fuente de ATP en el corazón, en condiciones diabéticas se observa un aumento de este tipo de metabolismo ya que el efecto provocado por la resistencia a la insulina impide la utilización de glucosa como fuente de energía (Cai & Kang 2003). Los ácidos grasos pueden ser oxidados también en el citosol en peroxisomas (Reszko et al. 2004; Marín-García & Goldenthal 2002) o incorporados a triglicéridos intracelulares (Duncan 2011). En condiciones de hiperglucemia e hiperlipidemia

crónicas se promueve una producción excesiva de ROS en la cadena de transporte de electrones mitocondrial debido al incremento en la oxidación de la glucosa y la beta oxidación de los ácidos grasos (Cai et al. 2002; Fillmore et al. 2014). La producción excesiva de ROS provoca un desbalance entre su generación y su degradación mediante los mecanismos de protección celulares. Las defensas antioxidantes de la célula se ven saturadas y se genera así estrés oxidativo, que puede contribuir a un aumento en el daño del aparato contráctil (Duncan 2011; Buchanan et al. 2005). Este efecto ha sido reportado tanto en DM tipo 1 como en tipo 2 (Barouch et al. 2003; Wold & Ren 2004; Kemeny et al. 2013).

En este trabajo se utilizó la Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) para estudiar las propiedades mecánicas celulares y posibles cambios en el citoesqueleto inducidos por condiciones hiperglicémicas e hiperlipídicas. La MFA es una herramienta muy poderosa para la investigación en las ciencias biológicas y biomédicas. El funcionamiento del Microscopio de Fuerza Atómica se basa en la utilización de una sonda (o punta) para escanear la superficie de la muestra analizada. La punta es muy fina, o sea contiene pocos átomos, y esto permite la interacción con la muestra a diferentes fuerzas. Una de las características de la MFA incluye su habilidad de obtener imágenes de topografía de superficie de muestras biológicas a resolución nanométrica (Kuznetsova et al. 2007), y que además permite hacerlo en condiciones fisiológicas (Graham et al., 2010). Por MFA pueden estudiarse las propiedades dinámicas y mecánicas de células vivas y analizarse diferentes tipos de eventos celulares como la locomoción, la diferenciación, el envejecimiento, la activación fisiológica, la electromotilidad, así como el efecto de patologías a nivel celular (Kuznetsova et al. 2007; Muller & Dufrene 2011). Las propiedades visco-elásticas de diferentes tipos celulares ya han sido analizadas por MFA en el pasado (Kuznetsova et al. 2007; Muller & Dufrene 2011). Nuestro grupo ha sido pionero en el estudio del efecto de la diabetes sobre las propiedades nanomecánicas de cardiomiocitos vivos utilizando MFA (Benech et al. 2014). En el trabajo citado, se constató que la DM inducida en ratones por inyección de streptozotocina (tipo 1) altera las propiedades nanomecánicas y viscoelásticas de cardiomiocitos vivos haciéndolos más rígidos y adhesivos al compararlos con aquellos obtenidos de corazones de ratones sanos de la misma edad, sin DM inducida. Se sugirió así que la DM modifica las propiedades nanomecánicas intrínsecas del cardiomiocito y que los cambios medidos en la elasticidad celular podrían ser explicados por cambios en la distribución de los filamentos de actina (Benech et al. 2014; Benech et al. 2015). Además de los resultados previos de nuestro

laboratorio, varios otros estudios también han mostrado evidencias que vinculan la falla cardíaca y elasticidad del ventrículo izquierdo con remodelamientos de los filamentos de actina en corazones de ratas (Kita et al. 1996; Liu et al. 1996; Machackova et al. 2005).

En el presente trabajo de Tesis, el modelo animal fue sustituido por la utilización de la línea celular H9c2 derivada de corazón de rata. Corresponden a células murinas embrionarias e indiferenciadas las cuales han sido ampliamente caracterizadas demostrándose que presentan propiedades fisiológicas características de células cardíacas (Kimes & Brandt 1976; Hescheler et al. 1991). Para emular las condiciones diabéticas las células fueron cultivadas en un medio conteniendo alta glucosa y ácido palmítico (medio HGPA). A su vez, para evaluar si dichas condiciones experimentales afectan la elasticidad celular, se determinó el módulo elástico aparente ( $E^*$ ) por MFA en células cultivadas en medio HGPA comparándose con el correspondiente a células cultivadas en un medio control. Para realizar las medidas del  $E^*$ , se utilizó el método de nano-indentación, que consiste en hacer penetrar la punta rígida asociada a un cantiléver flexible, una cierta distancia en la muestra y registrar la relación entre la fuerza ejercida y la indentación. Para tal fin se utiliza un láser que registra la deflexión o deformación del cantiléver mientras la punta interactúa con la superficie celular. El impulsor del movimiento del cantiléver es un cerámico capaz de cambiar su tamaño en respuesta a la aplicación de un voltaje (piezoeléctrico). El  $E^*$  fue calculado así a partir de la relación entre la fuerza aplicada sobre la superficie celular y la deflexión del cantiléver usando una adaptación del modelo de contacto de Hertz (Sirghi et al. 2008). De esta manera, un mayor  $E^*$  implica una mayor rigidez celular.

Como aproximación para evaluar la importancia de la actina en el  $E^*$ , se trató también a las células con una sustancia disruptiva de las fibras de actina y se compararon los valores del  $E^*$  antes y después del tratamiento.

## **Hipótesis y objetivos generales y específicos**

Una de las moléculas posiblemente afectadas y que podría ser responsable de las modificaciones nanomecánicas en el cardiomiocito diabético es la actina. En este trabajo esperamos obtener evidencias experimentales directas que muestren que la actina es un componente importante del  $E^*$  medido por MFA en la línea celular de mioblastos de embriones de rata H9c2. Esperamos observar un  $E^*$  menor en las células cultivadas en medio control que el obtenido en medio HGPA. Asimismo, intentaremos comprobar si estas diferencias en el  $E^*$  se deben a diferencias en la distribución del citoesqueleto de actina.

### **Objetivo general**

Utilizar el modelo de cultivo de células H9c2 (mioblastos) para estudiar en forma controlada los cambios morfológicos, muerte celular y alteraciones del citoesqueleto de actina provocados por la hiperglucemia e hiperlipidemia.

### **Objetivos específicos**

- Realizar una caracterización temporal de la morfología celular en el modelo.
- Analizar si el tratamiento produce muerte celular.
- Estudiar si el tratamiento produce un aumento en los niveles de ROS.
- Estudiar la disposición de las fibras de actina y de alfa tubulina en las células tratadas y control.
- Determinar el  $E^*$  y analizar diferencias entre la condición control y con tratamiento.
- Verificar experimentalmente utilizando drogas específicas que la actina contribuye en forma importante en el valor del  $E^*$  medido por MFA.

## **Materiales y métodos**

### *Cultivos celulares*

Se utilizó la línea celular de mioblastos derivados de corazón de embrión de rata H9c2 (ATCC). Las células se cultivaron en condiciones control con medio DMEM, conteniendo una concentración 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomycin y 10% de suero fetal bovino (SFB). La concentración de glucosa varió de acuerdo al tratamiento realizado, se utilizó una concentración de 1,0 g/L (5,6 mM) para los cultivos control (C) y 4,5 g/mL (25 mM) en los cultivos donde se realizó el tratamiento hiperglicémico/hiperlipídico (HGPA). Para emular el efecto de la diabetes se incorporó además al tratamiento ácido palmítico (PA, Sigma-Aldrich) en concentración 500 µM (Dyntar et al. 2001; Michaelson et al. 2014). Los cultivos se mantuvieron en una estufa con atmósfera húmeda controlada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El tiempo de incubación para los tratamientos fue de 20 horas en todos los casos.

### *Preparación del complejo PA/BSA en solución*

La naturaleza hidrofóbica del PA hace necesario que para su disolución en el medio de cultivo y su incorporación a las células el compuesto deba estar conjugado con una sustancia que permita su interacción con un medio acuoso. Fisiológicamente, los ácidos grasos libres se encuentran conjugados a seroalbúmina bovina (BSA), lo que facilita su biodisponibilidad. Para preparar la solución del conjugado PA/BSA se preparó una solución stock de PA 0,100 M en 0,100 M de NaOH(ac) en un baño a 70°C con agitación. Al mismo tiempo se preparó una solución acuosa de BSA (A3675, Sigma-Aldrich) al 10% m/v en un baño a 55°C con agitación. Luego se mezcló 0,5 mL de la solución de PA con 9,5 mL de la solución de BSA para obtener una solución stock 5 mM PA/10% BSA, mezclándose manualmente hasta la completa homogenización. A continuación se enfrió la solución stock a temperatura ambiente y se filtró con membrana miliporo (0,22 µ) para su esterilización. Previo a cada uso, la solución se precalentó a 37 °C y se mezcló en vortex. En cada placa con tratamiento HGPA se incorporó al medio DMEM de alta glucosa una dilución 1/10 de esta solución stock, generando una concentración final de PA de 500 µM/ 1 % BSA.

### *Medidas de especies reactivas del oxígeno (ROS)*

Para medir niveles relativos de ROS en nuestro modelo se usó el compuesto 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA), el cual es una sonda fluorescente utilizada para detectar y cuantificar la presencia de ROS intracelular (Sardão et al. 2007; Oyama et al. 2009; Cai et al. 2002). Esta sonda ingresa a la célula por difusión pasiva y una vez dentro del citosol, los grupos acetato son removidos para formar el derivado 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF), el cual no es fluorescente. Cuando este derivado es expuesto a ROS u otros oxidantes, experimenta una oxidación perdiendo dos electrones y como resultado se forma el compuesto diclorofluoresceína, que es altamente fluorescente. De esta forma la cantidad de fluorescencia de DCF puede ser usada como una medida del grado de estrés oxidativo, como el que ocurre cuando la generación de ROS intracelular excede la capacidad antioxidativa de la célula (Wardman 2007).

Para evaluar la generación de ROS se utilizaron dos métodos, microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo. En ambos procedimientos las células fueron incubadas según los diferentes tratamientos y al cabo de los mismos se cambió el medio correspondiente por uno sin SFB. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrógeno 300 µM. Se agregó H<sub>2</sub>DCF-DA en concentración 40 µM para los ensayos de microscopía de epifluorescencia y 10 µM para los ensayos de citometría de flujo. Transcurrido este tiempo se incubó durante 30 min y se lavó con PBS precalentado a 37° C. Para los estudios microscópicos se agregó medio DMEM sin SFB en las placas con las células y luego se analizaron al microscopio con un objetivo 20X. En los análisis citométricos, las células se decoloraron con tripsina 1X durante 5 min (37°C), y se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo DMEM con SFB. La suspensión se trasvasó a tubos cónicos de centrifuga de 15 mL, se centrifugó a 100 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante, se agregó 0,5mL de medio DMEM completo y se procedió a medir mediante citometría de flujo. Las longitudes de onda de la sonda oxidada son 492-495 nm para la excitación y 517--527 nm para la emisión, por lo que en el microscopio de epifluorescencia usado (Olympus IX81) se utilizaron los filtros dicroicos UMNIBA3 con excitación entre 470-495nm y emisión entre 510-550 nm.

### *Citometría de flujo*

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo y clasificador celular *FACSVantage* (Becton Dickinson, USA) de la Plataforma de Citometría de Flujo y Clasificación Celular

(SECIF) del IIBCE. El citómetro está equipado con un láser de alta potencia ion-argón (Innova 304, Coherent, USA) ajustado para emitir a 488 nm a 100 mW de potencia. Se seleccionó una boquilla de 70  $\mu\text{m}$  para realizar las medidas citométricas. Para la calibración del citómetro se realizó un ajuste estándar con *Chicken Red Blood Cells* (CRBC) fijados en glutaraldehído para optimizar la detección y resolución de los parámetros citométricos.

Las poblaciones celulares fueron claramente identificadas en gráficos de FSC vs SSC. Se estableció en cada caso una Región 1 que contenía las células y algunos restos. Se evaluó posteriormente la cantidad de eventos positivos/negativos en el canal de fluorescencia verde (FL1) operado con amplificación logarítmica con el fin de detectar células positivas para el tratamiento aplicado. La viabilidad celular fue estudiada mediante la incorporación del agente intercalante Ioduro de Propidio (IP, concentración final 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), dado que dicho compuesto no tiñe el ADN/ARN en células con la membrana celular intacta (indicador de viabilidad).

La fluorescencia verde emitida por los compuestos fluorescentes utilizados en los ensayos fue detectada en el canal FL1 usando un filtro de banda 530/30 y la fluorescencia emitida por IP fue detectada en el canal FL3 usando un filtro de banda 675/20. En ambos casos, y al igual que para las señales de dispersión lateral (Side Scatter, SSC - relacionado a la complejidad celular), se usaron tubos fotomultiplicadores (PMTs) para detectar y amplificar las señales obtenidas en cada canal. En cambio, para detectar las señales de dispersión frontal (Forward Scatter, FSC - proporcional al tamaño celular), se utilizó un fotodiodo. La adquisición y análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa *CELLQuest* (BD, USA). Por cada medición citométrica se adquirieron un total de 5000 eventos.

### *Microscopía de Fuerza Atómica*

Para comparar los módulos elásticos de células cultivadas en placas de Petri de cultivo celular en condiciones Control, HGPA, y sus respectivos tratamientos con drogas disruptivas del citoesqueleto, se usó la técnica de MFA según el método descrito en Benech et al. 2014. Para cada caso, el tratamiento se detuvo a las 20 h mediante la remoción del medio y sustitución por un medio DMEM sin SFB. Las células fueron entonces incubadas con IP en una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 5 min a temperatura ambiente. Luego de la incubación fueron lavadas con medio DMEM sin SFB y se procedió a tomar las medidas únicamente sobre células que no presentaban fluorescencia (células viables). Para obtener

las medidas se usó un Microscopio de Fuerza Atómica (BioScope Catalyst, Bruker), montado sobre un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX81). La platina contaba con un sistema de control de temperatura a 37°C. El cantiléver usado fue del tipo DNP-10 de nitruro-silicio con punta piramidal (Bruker) con una constante elástica de 0,06 N/m. La fuerza de indentación ( $F$ ) se calculó usando la ley de Hooke:

$$F = k \cdot \delta$$

Donde  $k$  es la constante elástica y  $\delta$  es la deflexión del cantiléver. La relación entre la fuerza ejercida por el cantiléver y la indentación depende del *Módulo de Young* del material estudiado, en este caso las células. El *Módulo de Young* o *módulo de elasticidad* es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, según la dirección en la que se aplica una fuerza. A la gráfica de fuerza en función de indentación se le denomina curva de fuerza. La ecuación que relaciona la fuerza con la indentación en una punta con geometría piramidal es:

$$F = 2E^*h^2 \sqrt{\frac{tg17.5(tg15 + tg25)}{\pi}}$$

donde  $F$  es la fuerza de indentación,  $h$  es la profundidad de indentación,  $tg$  es la tangente de los diferentes ángulos presentes en la punta piramidal utilizada y  $E^*$  es el Módulo de Young reducido o Módulo Elástico Aparente (Sirghi et al. 2008; Benech et al. 2014).

Las curvas de fuerza se obtuvieron colocando la punta en la región peri-nuclear de la célula, a una frecuencia de 1Hz, con un mínimo de 250 curvas por célula. La profundidad de indentación fue calculada por el software del equipo a partir del movimiento vertical del cantiléver debido al motor piezoeléctrico y su deflexión. Las poblaciones de datos obtenidos se analizaron con el programa Matlab, mediante un script desarrollado por el grupo de trabajo de nuestro laboratorio, donde a partir de las curvas de fuerza obtenidas y la relación entre la fuerza y la indentación se halló el  $E^*$  de cada curva. Con todas las curvas de fuerza para cada tipo de tratamiento (mínimo: 1800 curvas) se realizaron histogramas a partir de los cuales se hizo un ajuste gaussiano y se obtuvo el valor de  $E^*$  promedio para cada tratamiento y su desviación estándar. Estas propiedades fueron medidas en tres experimentos diferentes y en al menos tres células por experimento en cada condición.

### *Tratamiento disruptivo del citoesqueleto*

Las células H9c2 fueron incubadas en medios control y HGPA durante 20 horas y tratadas con Citocalasina B en concentración 100  $\mu$ M durante 30 min a 37°C. Luego de la incubación se procedió a la medición del E\* mediante MFA para cada caso. Al finalizar las medidas, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 1% para su posterior análisis mediante inmunocitoquímica en microscopía láser confocal.

### *Inmunocitoquímica*

Para estudiar las fibras de actina, se hizo una incubación con Faloidina conjugada a un compuesto fluorescente (Faloidina-Alexa Fluor® 633, A22284 Thermo-Fisher). La Faloidina es un péptido bicíclico que pertenece a la familia de toxinas obtenidas del hongo *Amanita phalloides*. Es capaz de unirse a la actina y se une de manera mucho más intensa a los filamentos que a los monómeros. La unión estabiliza los filamentos, lo que desplaza significativamente el equilibrio entre filamentos y monómeros hacia los filamentos. La Faloidina conjugada a compuestos fluorescentes se ha usado extensamente para la localización de los filamentos de actina en células vivas y fijadas (Spudich 1973). Para la tinción se cultivaron células sobre cubreobjetos de vidrio o en placas de Petri y luego se fijaron con PFA 1% en PBS. Luego se lavaron con PBS (3x) y se permeabilizaron con una solución al 0,1 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) en PBS durante 5 min. Luego de lavar nuevamente en PBS las células fueron incubadas en una solución de Faloidina conjugada en una concentración de 0,17  $\mu$ M en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y lavadas nuevamente en PBS (2x).

Para el estudio de la alfa-tubulina se utilizó un anticuerpo específico anti-alfa-tubulina conjugado con un compuesto fluorescente (Mouse anti-alpha-Tubulin-Alexa 488, 32-2588 Thermo-Fisher) en dilución 1/100. A continuación las células fueron lavadas en PBS (3x), se incubaron con una solución 1 mg/mL de Hoechst 33342 (Thermo-Fisher) durante 10 min a temperatura ambiente para tinción nuclear y finalmente se lavaron nuevamente en PBS (3x). Las células cultivadas sobre cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje (ProLong Antifade Kit P7481, Molecular Probes-Invitrogen) y fueron conservadas a -20°C. Las células cultivadas sobre placas de Petri (utilizadas para las medidas en MFA) se guardaron a 4° C en PBS para su posterior observación en el microscopio láser confocal.

Las muestras se analizaron en el microscopio láser confocal (MLC) por medio del empleo de los láseres 488 nm para la observación de los compuestos que emiten fluorescencia en el verde, 633 nm para el rojo y 405 nm para la observación de la fluorescencia azul. Las imágenes obtenidas fueron procesadas posteriormente mediante la aplicación ImageJ en su distribución Fiji (Schneider et al. 2012; Schindelin et al. 2012).

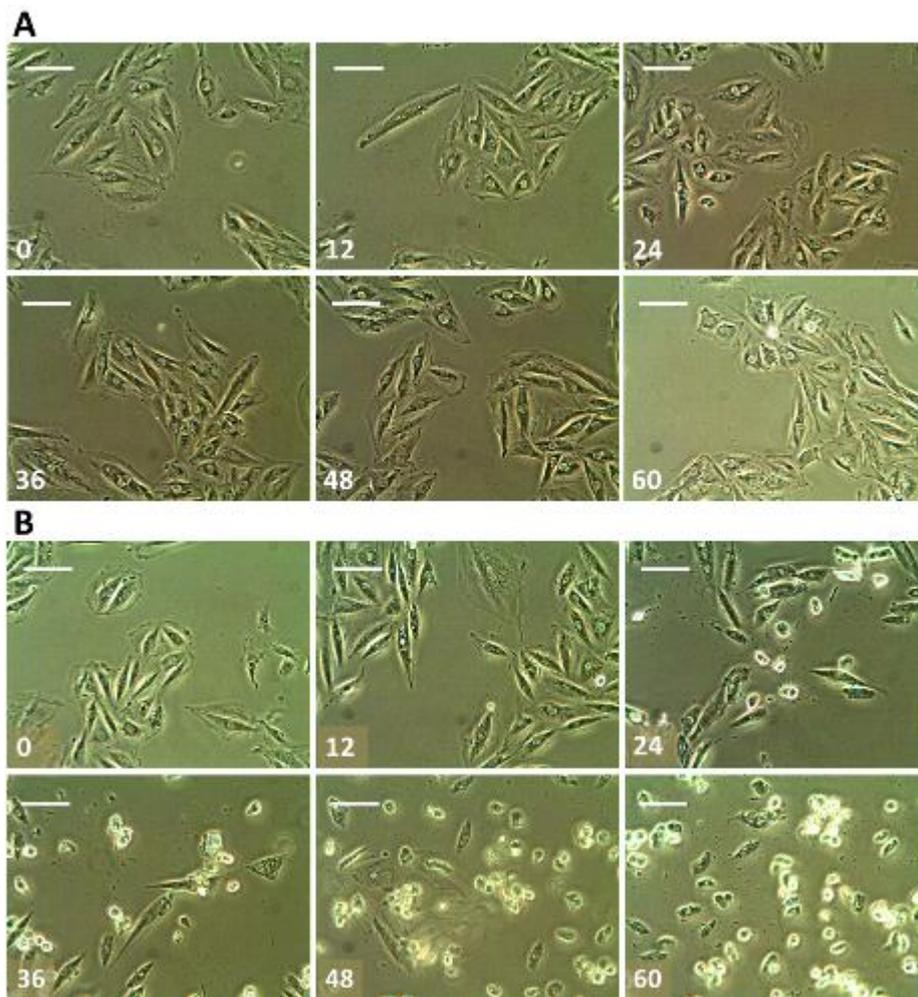
#### *Tratamiento estadístico de datos*

Para las comparaciones entre medidas de dos tratamientos se utilizó el test *t* de Student para datos pareados. Para comparar más de dos tratamientos se utilizó el test ANOVA de una vía. El número de experimentos independientes realizados se representan en los resultados con la letra *n*. Para la mayoría de los casos, se consideró que existe diferencia significativa con  $p < 0,05$ . Los datos para cada medida se presentan como valor medio +/- su desviación estándar (SD).

## Resultados

### *El tratamiento con HGPA y PA inducen muerte celular*

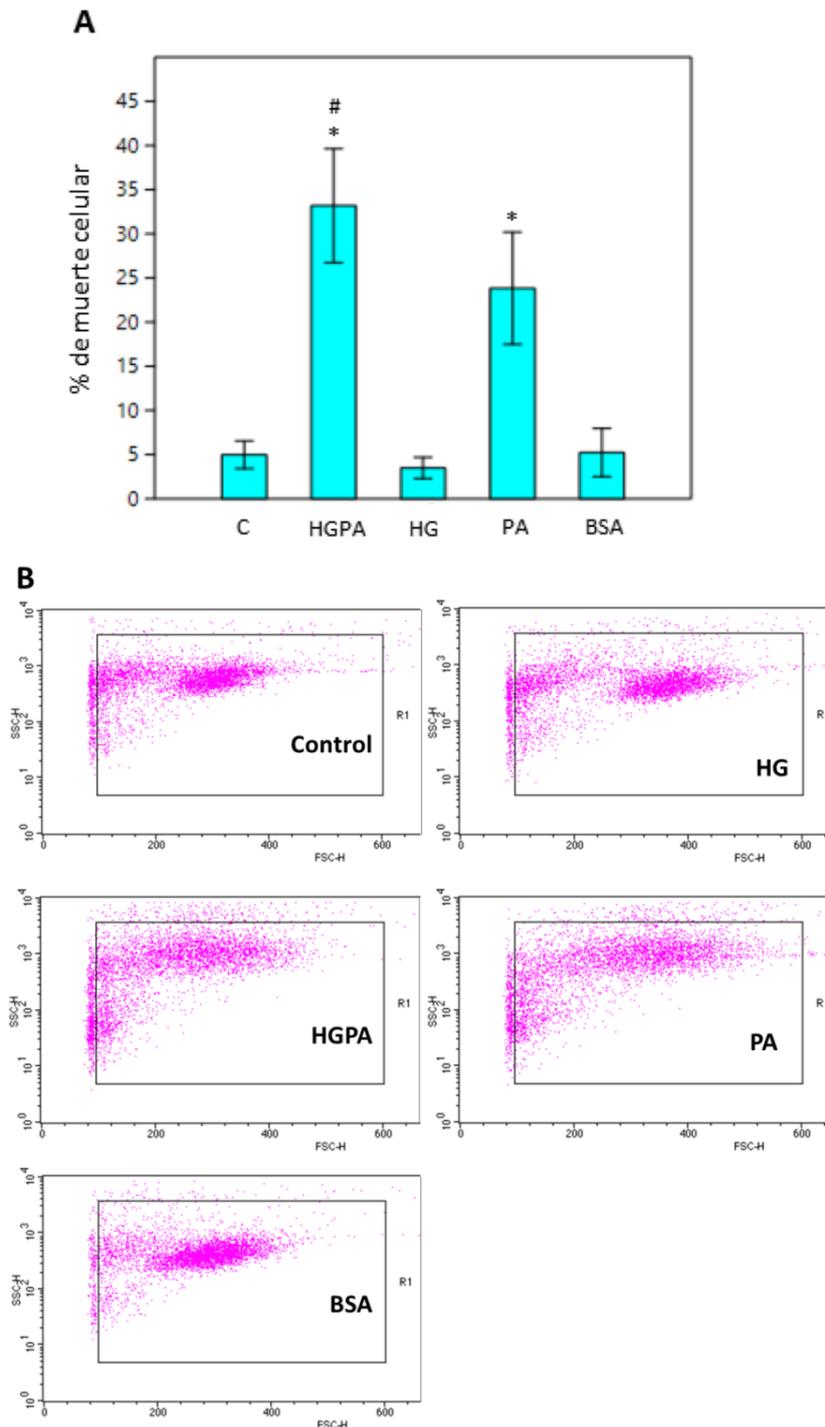
Para evaluar el efecto en la morfología y crecimiento del cultivo de células H9c2 se tomaron imágenes de luz transmitida de los cultivos celulares en medios Control y HGPA cada 12 h. En la condición Control (Fig. 1A) no se observaron cambios morfológicos ni indicios de muerte celular durante la duración de todo el experimento (60 h). En la condición HGPA (Fig. 1B) a las 12 h de tratamiento se pueden apreciar pequeños puntos refringentes dentro de las células. A las 24 h ya es posible detectar un importante cambio morfológico en algunas células que pierden su estructura fusiforme. Se observan células que se han separado del sustrato y aumentado su refringencia lo que implicaría un aumento en la muerte celular. A medida que incrementa el tiempo de incubación (36, 48 y 60 h), se verifica un aumento en células con estas características.



**Figura 1.** Imágenes de microscopía óptica de los cultivos H9c2. Los números indican el tiempo en horas de tomada la imagen, luego del inicio del tratamiento. **A)** Control. **B)** HGPA. La barra corresponde a 40  $\mu\text{m}$ .

Para analizar el porcentaje de muerte celular en cada tratamiento se utilizó la técnica de citometría de flujo (Fig. 2). El tratamiento control provocó un bajo porcentaje de muerte celular (5,0%) al igual que el tratamiento HG (glucosa 25 mM, 3,9% de muerte) o el control con seroalbúmina bovina (BSA, 5,9% de muerte). Para el tratamiento HGPA el porcentaje de muerte celular fue mayor y presentó una diferencia significativa con respecto al control alcanzando un 33,2%. Para las células tratadas solamente con ácido palmítico 0,5 mM (PA) presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos control y HGPA y alcanzó un valor de 23,8%.

En la figura 2B se muestra el resultado de citometría de flujo para cada tratamiento, donde se grafica en el eje Y la dispersión frontal y en el eje X la dispersión lateral. Los gráficos para las condiciones control, HG y BSA tienen un aspecto muy similar lo que muestra que esos tratamientos no indujeron cambios significativos en el tamaño celular ni en la complejidad interna de las células. El tratamiento con HGPA muestra un perfil similar al de PA provocando ambos tratamientos cambios notorios en la complejidad celular y en su tamaño. Esto sugiere que el PA sería el componente responsable de inducir esos cambios.



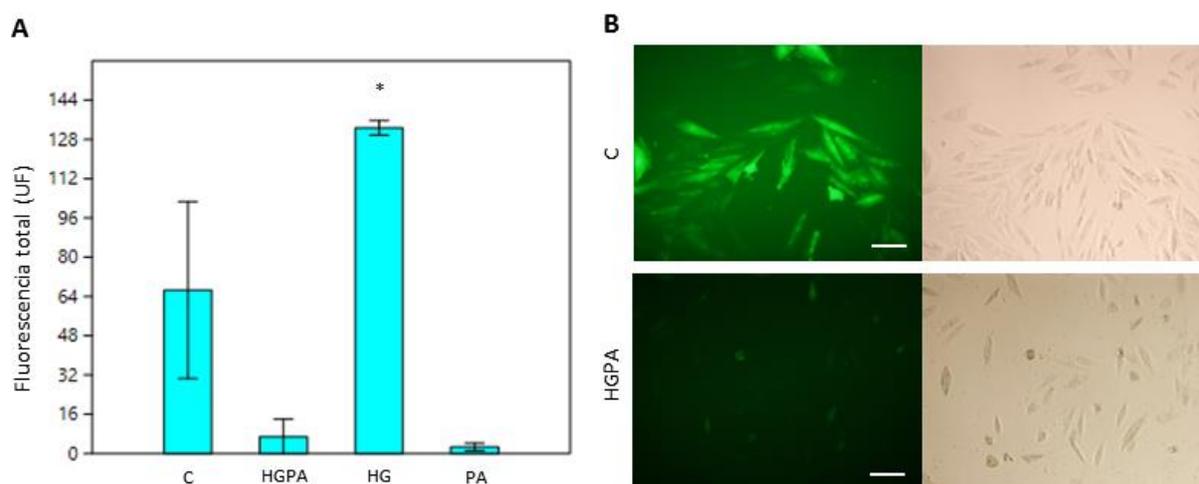
**Figura 2.** A. Gráfico de porcentajes de muerte celular con respecto al total de células analizadas en los cultivos de células H9c2 para cada tratamiento. Control: glucosa 5,6 mM, n=7; HGPA: glucosa 25 mM y ácido palmítico 500  $\mu$ M, n=7; HG: glucosa 25 mM, n=3; PA: ácido palmítico 500  $\mu$ M, n=3; BSA: seroalbúmina bovina 1%, n=3. Se representan las desviaciones estándar de cada medida. Para el análisis estadístico se utilizó el método de ANOVA de una vía y el test de comparación múltiple de Tukey (# indica diferencias significativas con respecto a PA con  $p \leq 0,05$ , \* indica diferencia significativa con C, HG y BSA con  $p \leq 0,01$ ). B. Gráficos representativos de dispersión lateral (*Side Scatter*, SSC) y de dispersión frontal (*Forward Scatter*, FSC) obtenidos por citometría de flujo para las distintas muestras analizadas.

### El tratamiento hiperglucémico induce la formación de ROS

Para estudiar la producción de especies reactivas del oxígeno las células fueron incubadas con la sonda H<sub>2</sub>DCFDA y analizadas posteriormente mediante microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo como se describió en la sección de materiales y métodos.

En la figura 3A se muestra el gráfico de barras con los resultados de fluorescencia total en unidades de fluorescencia para cada tratamiento medidos por citometría de flujo. Las medidas correspondientes al tratamiento control presentaron una alta variabilidad entre los ensayos (n=3). Por otro lado el tratamiento hiperglucémico (HG) presentó diferencias significativas con HGPA y PA ( $p < 0,01$ ) y con respecto al control ( $p = 0,05$ ). Sorprendentemente se observa también que el tratamiento PA disminuye la fluorescencia total con respecto al control.

En la figura 3B se muestran imágenes de microscopía de epifluorescencia (izquierda) y óptica (derecha) correspondientes a los tratamientos control y HGPA. El nivel de fluorescencia de H<sub>2</sub>DCFDA observada es notoriamente menor en la condición HGPA.

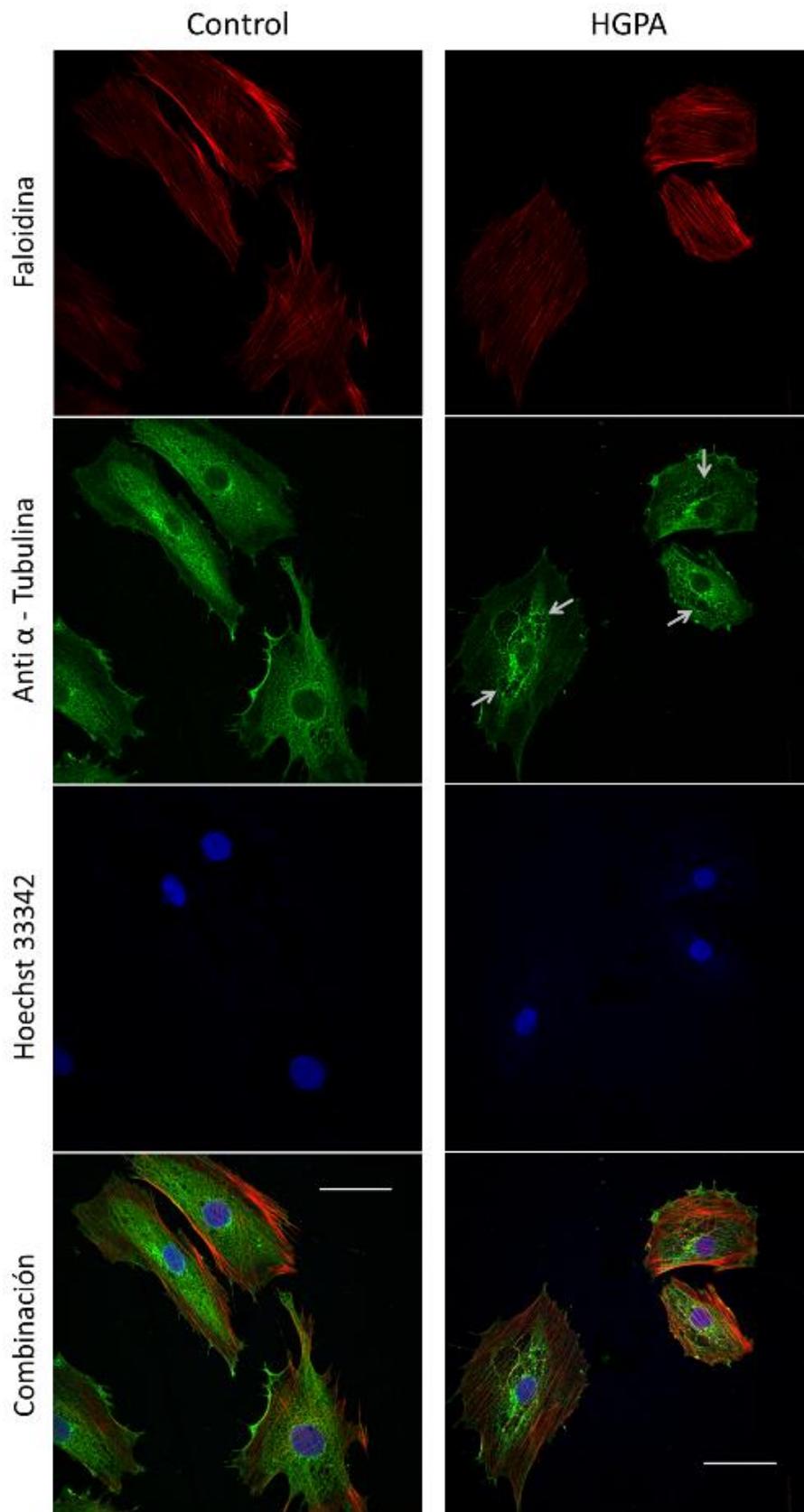


**Figura 3. A:** Gráfico de los datos obtenidos por citometría de flujo de medidas de fluorescencia total de células H9c2 incubadas en los tratamientos Control negativo (C), HGPA, HG y PA. La concentración de H<sub>2</sub>DCFDA fue de 10  $\mu$ M en cada caso. UF: Unidades de fluorescencia. Para el análisis estadístico se utilizó el método de ANOVA de una vía y el test de comparación múltiple de Tukey (\* indica diferencias significativas con HGPA y PA,  $p \leq 0,05$ ). Se muestran las desviaciones estándar para cada medida. **B:** Imágenes de microscopía de epifluorescencia (izquierda) y de luz transmitida (derecha) de células H9c2 incubadas en condiciones control (arriba) y HGPA (abajo). La concentración de H<sub>2</sub>DCFDA usada en este caso fue de 40  $\mu$ M. Las barras de escala corresponde a 50  $\mu$ m en cada caso.

### *La hiperglucemia e hiperlipidemia inducen cambios en la distribución de actina y alfa-tubulina en el citoesqueleto*

Lo siguiente que nos propusimos fue estudiar las fibras del citoesqueleto de las células en los distintos tratamientos con el objetivo de ver si existen diferencias entre ellos. Para esto las células H9c2 fueron incubadas con compuestos fluorescentes que se unen específicamente a las fibras de actina y alfa-tubulina. En la figura 4 se muestran imágenes representativas de los resultados del análisis mediante microscopía confocal de las células tratadas en condiciones control (columna izquierda) y HGPA (columna derecha). Las células en la condición control muestran fibras de actina (faloidina, rojo) delgadas y con una disposición reticular donde las fibras se cruzan en ángulos de 45 a 90 grados. En las células tratadas con HGPA se aprecian fibras de actina un poco más gruesas y ya no se observa la disposición reticular sino que todas las fibras muestran la misma orientación.

La tinción con anti-alfa-tubulina para el tratamiento control muestra fibras con una distribución citoplasmática relativamente uniforme que además rodean el núcleo. En las tratadas con HGPA sin embargo se pierde esa distribución uniforme ya que se muestran regiones en el citoplasma donde no hay marcación con el anticuerpo (señaladas con las flechas). Esto muestra que la tubulina también se ve alterada en condiciones de hiperglucemia e hiperlipidemia.



**Figura 4.** Imágenes representativas de microscopía confocal de células H9c2 en condiciones control y HGPA. Se muestra la tinción con Faloidina-Alexa Fluor® 633 (rojo), la tinción inmunocitoquímica con un anticuerpo específico para alfa-tubulina conjugado con el fluoróforo Alexa 488 (verde), la tinción de los núcleos con Hoechst 33342 (azul) y la combinación de las tres. La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m.

### *La hiperglucemia junto con hiperlipidemia producen un aumento en la rigidez celular*

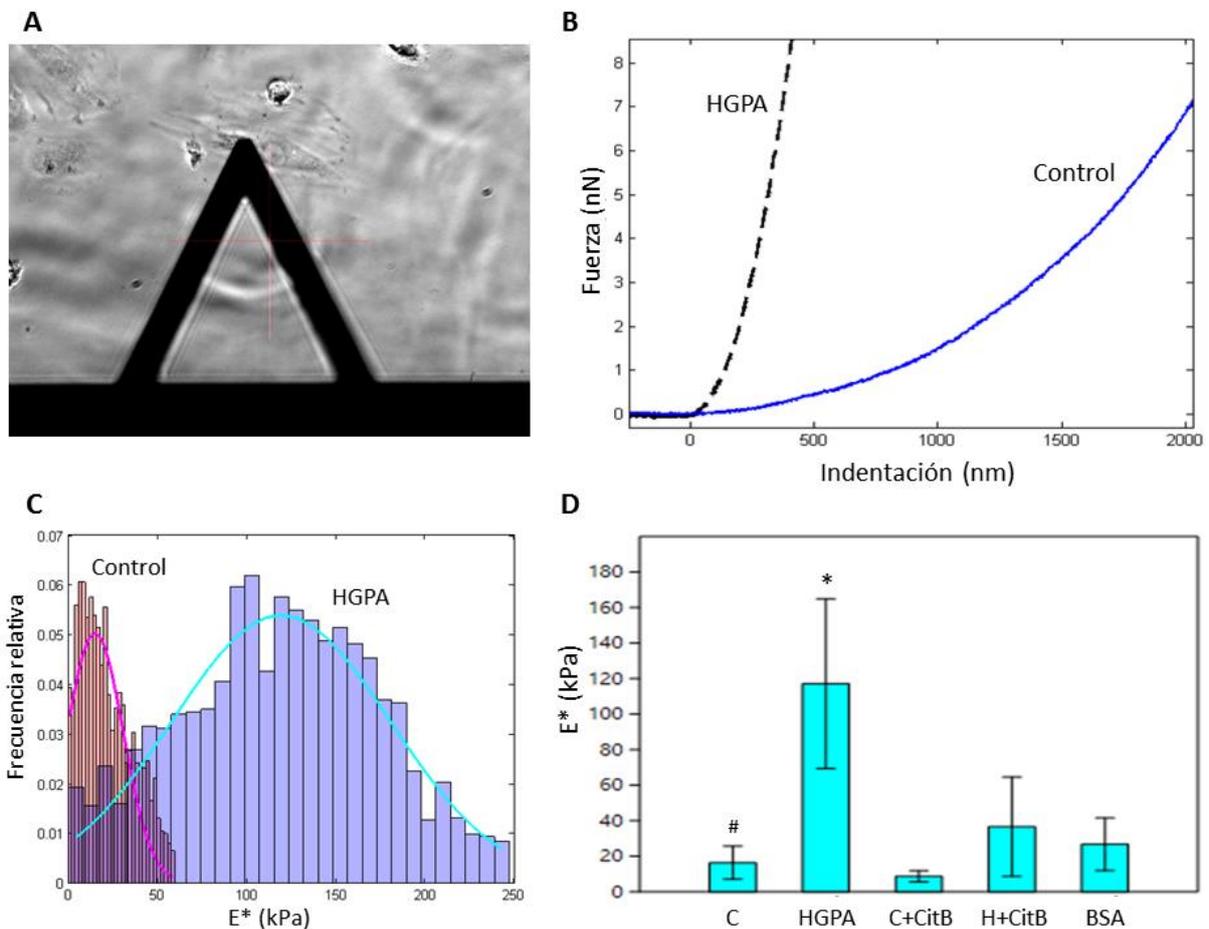
En la figura 5A se muestra la imagen del cantiléver del microscopio de MFA ubicándose sobre el citoplasma de una célula. En el vértice del triángulo se encuentra la punta piramidal cuyo extremo es muy delgado y es el que interacciona con la muestra a nivel atómico. La figura 5B muestra el gráfico de fuerza aplicada sobre la superficie celular en función de la profundidad de indentación. Se aprecia que a medida que aumenta la profundidad a la cual penetra la punta se produce un incremento en la fuerza necesaria para lograr esa indentación. La línea continua es representativa de las curvas tomadas sobre células control y la línea punteada es representativa de las células tratadas en la condición HGPA. En el gráfico se aprecia que al comparar las fuerzas realizadas para llegar a una misma indentación, es mayor la fuerza necesaria para penetrar una célula HGPA que una control.

En la figura 5C se muestran los histogramas obtenidos para las medidas de  $E^*$  en células tratadas en las condiciones control y HGPA, con los ajustes gaussianos correspondientes. En la Tabla 1 se muestran los  $E^*$  promedio para cada condición experimental. En la figura 5D se muestra el gráfico comparativo de los valores de  $E^*$  promedio para cada tratamiento, con su correspondiente desviación estándar. Se observa así que el tratamiento HGPA incrementó significativamente el  $E^*$  pasando de  $16 \pm 9$  KPa en la condición control a  $117 \pm 48$  KPa en la condición HGPA (Tabla 1 y Fig. 5D). Al comparar los  $E^*$ , el correspondiente al tratamiento HGPA fue significativamente mayor que el control, así como de las demás condiciones aplicadas.

**Tabla 1.** Valores de  $E^*$  promedio de las células y sus desviaciones estándar, medidos en KPa.

Tratamiento	$E^*$	DS
C	16	9
HGPA	117	48
C+CitB	9	3
H+CitB	37	28
BSA	23	16





**Figura 5.** **A:** Imagen de luz transmitida del cantilvér con la punta de nitruro-silicio ubicada sobre una célula H9c2 cultivada en medio control. **B:** Superposición de dos curvas de fuerza obtenidas mediante MFA. Se grafica la fuerza ejercida en función de la indentación de la punta en la célula. La línea continua corresponde a una curva representativa de una medida tomada en una célula control, la línea punteada corresponde a una curva representativa de una medida de una célula cultivada en la condición HGPA. **C:** Comparación de los histogramas obtenidos para las medidas de módulo elástico aparente ( $E^*$ ) tomadas sobre células control (rojo, izquierda,  $n=9$ ) y HGPA (azul, derecha,  $n=9$ ). Para cada caso se analizaron un mínimo de 1800 curvas de fuerza (200 curvas por célula analizada). Las líneas roja y azul corresponden a los ajustes gaussianos de cada histograma. Al comparar los valores medios de ambas poblaciones mediante el test  $t$  de Student se halló una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) **D:** Gráfico comparativo de los módulos elásticos medidos para cada tratamiento: Control ( $n=9$ ), HGPA ( $n=9$ ), C+CitB (células cultivadas en medio control y tratadas con Citocalasina B,  $n=9$ ), H+CitB (células cultivadas en medio HGPA y tratadas con Citocalasina B,  $n=7$ ) y BSA ( $n=9$ ). Las barras presentes en cada columna corresponden a la desviación estándar. Para el análisis estadístico en la comparación de todos los tratamientos a la vez se utilizó el método de ANOVA de una vía con el test de comparación múltiple de Tukey (\* indica diferencia significativa con todas las demás condiciones,  $p < 0,01$ ) y para la comparación del tratamiento C con C+CitB se utilizó el test  $t$  de Student (# indica diferencia significativa con C+CitB,  $p < 0,05$ ).

*Modificaciones en el citoesqueleto de actina provocan una disminución en el módulo elástico aparente*

Al incubar con citocalasina B células previamente tratadas en medio HGPA (H+CitB) el valor del módulo elástico disminuyó de  $117 \pm 48$  KPa a  $37 \pm 28$  KPa lo que representa un 69% (Tablas 1 y 2). Al comparar los valores de  $E^*$  obtenidos para las células control y control tratadas con citocalasina B (C+CitB) también se produjo una disminución significativa del  $E^*$  de un 47% (Tabla 2). En este caso el valor del módulo elástico pasó de  $16 \pm 9$  KPa en la condición control a  $9 \pm 3$  KPa con el agregado de citocalasina B (Tabla 1 y Fig. 5D).

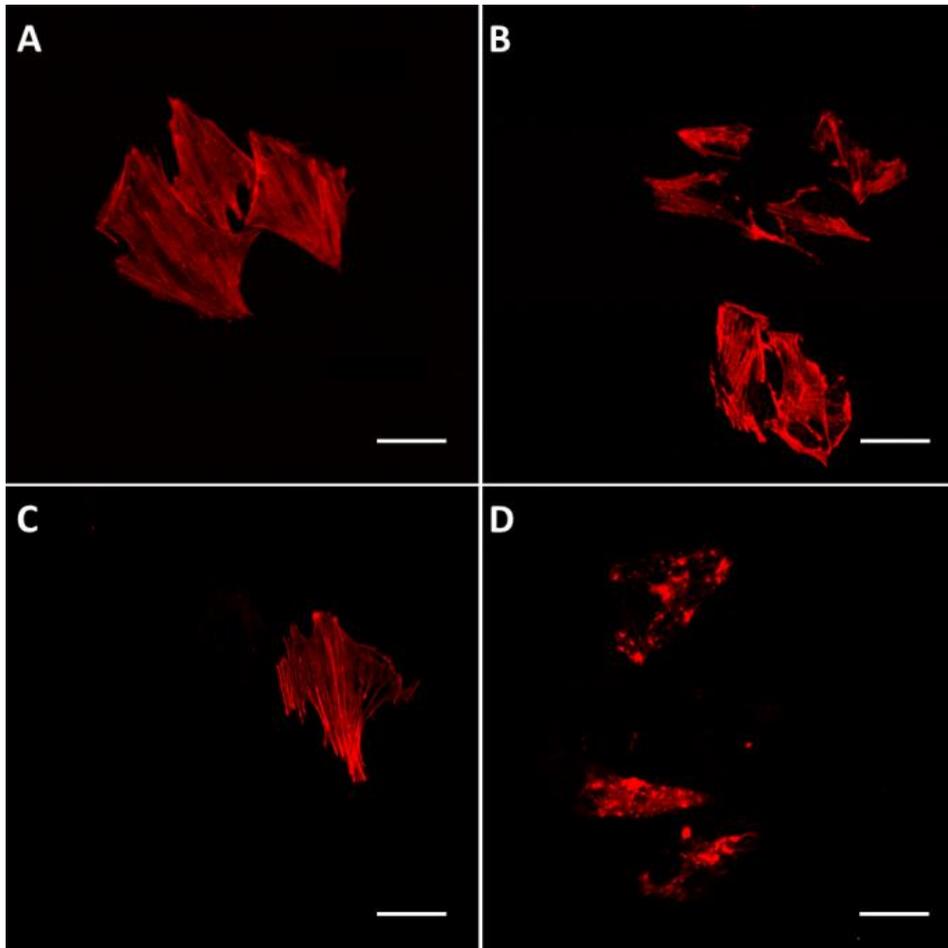
A continuación quisimos evaluar por microscopía confocal el estado del citoesqueleto de actina en las células tratadas con citocalasina durante el ensayo realizado en MFA para los tratamientos control y HGPA (Fig. 6). En la imagen se muestran células tratadas en ambas condiciones antes y después del tratamiento con citocalasina B respectivamente, luego de la incubación con faloidina conjugada al fluoróforo Alexa Fluor 633. Se observa claramente que la citocalasina desensambló las fibras de actina del citoesqueleto (Figs. 6B y 6D).

**Tabla 2.** Valores promedio de  $E^*$  para cada tratamiento y comparación entre los distintos tratamientos.

C	HGPA	
16	117	Aumento de 716%

C	C+CitB	
16	9	Disminución de 47%

HGPA	H+CitB	
117	37	Disminución de 69%



**Figura 6.** Imágenes de células H9c2 teñidas con Faloidina-Alexa Fluor® 633 obtenidas mediante microscopía confocal. **A y B:** células cultivadas en condición Control, antes (**A**) y después (**B**) del experimento de MFA luego del tratamiento con Citocalasina B. **C y D:** cultivadas en condición HGPA, antes (**C**) y después (**D**) del experimento de MFA luego del tratamiento con Citocalasina B. La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . Para obtener estas imágenes se utilizó un objetivo de inmersión 40X.

## Discusión

El presente trabajo de Tesis muestra evidencias experimentales originales de que el tratamiento hiperglucémico e hiperlipídico (medio HGPA) de células H9c2 (derivadas de corazón de embriones de rata) aumenta significativamente el Módulo Elástico Aparente de las células H9c2 (las torna más rígidas), cuando es comparado con las mismas células en la condición control. Además, el trabajo aporta una serie de evidencias experimentales que sugieren fuertemente la participación del citoesqueleto de actina como componente fundamental del aumento del valor del Módulo Elástico Aparente determinado por MFA. Se ha probado que las células de la línea H9c2 mantienen propiedades fisiológicas características de células cardíacas (Kimes & Brandt 1976; Hescheler et al. 1991), razón por la cual han sido utilizadas en varios estudios como modelo de miocitos cardíacos (Ménard et al. 1999; Cai & Kang 2003; Zordoky & El-Kadi 2007; Kageyama 2002; Umadevi et al. 2012; Park et al. 2015). Utilizando estas células, varios trabajos han demostrado el aumento en la generación de ROS cuando las mismas fueron incubadas en condiciones de alta glucemia (Cai et al. 2002; Yu et al. 2006; Li et al. 2015). Cai et al. 2002 mostró que al cultivar las células en 22 o 33 mM de glucosa, los niveles de ROS aumentaban significativamente al ser comparados con la condición control (5.5 mM de glucosa). Esto está de acuerdo con nuestra observación de un aumento en la generación de ROS promovido por la alta glucemia (25 mM) detectado utilizando citometría de flujo y la sonda H<sub>2</sub>DCFDA (Fig. 3). Además, los mencionados autores, detectaron alta viabilidad celular (similares a la condición control) por ensayos de MTT en las condiciones de alta glucosa (22 y 33 mM) en tratamientos de hasta 96 horas, y una significativa reducción en la viabilidad celular a concentraciones de glucosa de 60 mM. Este resultado también es coincidente con nuestras observaciones, ya que en condiciones de alta glucosa (25 mM) la muerte celular no fue significativamente diferente a la cuantificada en la condición control por citometría de flujo con ioduro de propidio (Fig. 2). Los mencionados autores, destacan un aumento en el número de células que respondieron positivas a la técnica TUNEL (muerte celular apoptótica) en la condición HG después de 4 días de tratamiento. Varios otros trabajos reportaron también el aumento de apoptosis debido a condiciones de alta glucosa en H9c2 (Li et al. 2015; Diao et al. 2016). En nuestro caso, intentamos cuantificar muerte celular apoptótica por la técnica de Anexina V en la condición HGPA (hiperglucémica + hiperlipídica), pero no fue posible porque tuvimos resultados positivos en el control con seroalbúmina bovina. Varias publicaciones reportaron

que el ácido palmítico induce la muerte celular mediante mecanismos que incluyen la apoptosis y la necrosis, dependiendo del tiempo de exposición y la concentración del mismo (Park et al. 2015; Liu et al. 2015; Khan et al. 2012). Liu et al. (2015) y Park et al. (2015) reportaron un aumento significativo de la apoptosis medida por Anexina V en H9c2 a un tiempo de incubación de 12 horas. Khan et al. (2012) reportó que el ácido palmítico provoca necrosis en células endoteliales a partir de las 18 horas de incubación. Para obtener resultados específicos para nuestro modelo se debería repetir el experimento con Anexina V utilizando seroalbúmina bovina recomendada especialmente para cultivo celular. También podrían utilizarse otras técnicas como TUNEL o triple tinción para confirmar el tipo de muerte celular en nuestro modelo experimental.

En nuestro trabajo observamos drásticos cambios morfológicos (Fig. 1), de tamaño y de complejidad interna celular (Fig. 2B). También constatamos una significativa muerte celular en el medio hiperlipídico (PA) que alcanzó un 23,8% del total de células analizadas. Este porcentaje fue aún mayor en el medio HGPA (Fig. 2A) alcanzando un 33,2% del total de células analizadas en esa condición. Este resultado sugiere que la alta glucosa potencia el efecto de la hiperlipidemia sobre la muerte de las células cardíacas, lo que confirmaría el efecto conocido como glucolipototoxicidad en nuestro modelo (Kahn et al. 2006).

Varios estudios muestran que la hiperglucemia aumenta los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células de corazón. Otros autores sugieren que la hiperlipidemia provoca el mismo efecto (Boudina et al. 2007). Se ha reportado una relación directa entre la hiperglucemia e hiperlipidemia y la muerte celular (Battiprolu et al. 2010; Cai & Kang 2003; Diogo et al. 2013). En lo que respecta a la producción de ROS, observamos un aumento en las células tratadas en la condición HG, lo cual condice con varios reportes publicados (Cai et al. 2002; Yu et al. 2006). En el trabajo de Boudina y Abel (2010) se observó que el aumento en el estrés oxidativo a nivel celular se correlaciona con la acumulación de lípidos *In vivo*, lo que implicaría que los ácidos grasos libres cumplen también un rol en la acumulación de ROS (Boudina & Abel 2010). Sin embargo en nuestro modelo no pudimos observar aumento de ROS en el medio HGPA ya que la inclusión en el medio hiperglucémico del complejo ácido palmítico:BSA ocasionó una gran disminución de la señal de fluorescencia de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA (Fig. 3). Este efecto fue observado por microscopía de epifluorescencia y por citometría de flujo. Una posible causa para esto es que el complejo ácido palmítico:BSA agregado al medio de cultivo esté interfiriendo con la absorción o emisión de la sonda. De

hecho, en un trabajo previo los autores describen el mismo problema (Michaelson 2014). Algunos de los trabajos que sugieren un aumento en los niveles de ROS en condiciones hiperlipídicas, utilizaron una sonda similar a la empleada en nuestro trabajo (carboxi-DCFDA), aunque fueron desarrollados en modelos *in vivo* y no en cultivos de células como en nuestro caso (Bugger et al. 2008). Para alcanzar resultados concluyentes en nuestro modelo se debería intentar utilizar otro sistema para medición de ROS, como por ejemplo el uso de sensores fluorogénicos específicos para aniones superóxido producidos por la mitocondria (Zielonka et al. 2008) o medidas de la relación entre glutatión reducido y oxidado (Baker et al. 1990) o intentar con otra sonda citoplasmática como por ejemplo dihidroetidio (DHE) (Peshavariya et al. 2007).

Trabajos previos han utilizado MFA para estudiar las propiedades dinámicas y mecánicas de células vivas. Eventos como la locomoción, diferenciación y envejecimiento, así como diferentes eventos fisiológicos y patológicos pudieron ser analizados por MFA (Chen et al. 2013; Kuznetsova et al. 2007; Müller & Dufrêne 2011; Qiu et al. 2010; Wu et al. 2010; Zhu et al. 2012; Collinsworth et al. 2002). Por ejemplo, utilizando MFA, se ha estudiado el efecto del envejecimiento y la obesidad en la rigidez de Células de la Musculatura Lisa Vascular (CMLV)(Qiu et al. 2010; Chen et al. 2013), así como el efecto del envejecimiento en la rigidez de los cardiomiocitos (Lieber et al. 2004).

Qiu et al. 2010, reportaron que la rigidez (determinada como  $E^*$ ) fue 200% mayor en CMLV vivas obtenidas de la aorta de monos viejos comparados con CMLV obtenidas de monos jóvenes. El  $E^*$  reportado para CMLV de monos jóvenes fue de  $12.8 \pm 0.3$  KPa y para CMLV de monos viejos fue de  $41.7 \pm 0.5$  KPa. Este aumento en el  $E^*$  se vio revertido luego de tratar las células con Citocalasina D (Qiu et al. 2010).

Diversos trabajos han mostrado alteraciones funcionales y estructurales en corazones de animales con diabetes inducida por inyección de STZ (Lieber et al. 2004; Cooper et al. 2004; Nemoto et al. 2006). Existen evidencias experimentales de que la diabetes afecta el citoesqueleto de actina. En el trabajo de Cooper et al. 2004, utilizaron faloidina fluorescente para mostrar un remodelamiento del citoesqueleto de actina en cortes de corazones de ratas diabéticas. En el trabajo publicado por Nemoto et al. (2006), observaron que la tinción de actina estaba reducida, sugiriendo que su expresión estaba disminuida en corazones diabéticos. En nuestro trabajo la tinción con faloidina mostró un cambio en la distribución

de las fibras de actina en las células tratadas con el medio HGPA donde las fibras muestran una clara diferencia en su disposición comparada con el tratamiento control (Fig. 4).

La MFA ha mostrado su capacidad en detectar cambios a nivel del citoesqueleto celular (Vinckier & Semenza 1998). Nuestro laboratorio ha sido pionero en el estudio del efecto de la diabetes sobre las propiedades nanomecánicas de cardiomiocitos vivos utilizando MFA. En Benech et al. 2014 se constató que la DM inducida en ratones por inyección de streptozotocina (modelo de DM tipo 1) altera las propiedades nanomecánicas y viscoelásticas de cardiomiocitos vivos haciéndolos más rígidos y adhesivos al compararlos con aquellos obtenidos de corazones de ratones control de la misma edad. Se sugirió así que la DM modifica las propiedades nanomecánicas intrínsecas del cardiomiocito y que los cambios medidos en el  $E^*$ , podrían ser explicados por cambios en la distribución de los filamentos de actina (Benech et al. 2014; Benech et al. 2015).

En el presente trabajo encontramos que la condición HGPA aumentó significativamente el valor de  $E^*$  con respecto a las células control, resultado que está en concordancia con estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo. Aún más, el tratamiento posterior con citocalasina B disminuyó el valor de  $E^*$  en un 69% en el caso de HGPA y un 47% en el caso del control (Tabla 2). La despolimerización de las fibras de actina por la acción de esta droga pudo comprobarse en la imagen de microscopía confocal obtenida luego del tratamiento y las medidas de MFA mediante tinción con faloidina (Fig. 6).

En conjunto, estos resultados sugieren que el citoesqueleto de actina es un componente importante en el valor del  $E^*$  medido por el método de nanohendidura y MFA. En la condición HGPA, el citoesqueleto de actina mostró representar casi un 70% del  $E^*$  medido y en la condición control casi un 50%. Además el resultado sugiere que el valor del  $E^*$  podría ser afectado por modificaciones en la disposición del citoesqueleto de actina como las que fueron provocadas por el medio HGPA y que pudimos observar por microscopía confocal y faloidina (Fig. 4). Por lo tanto nuestros resultados experimentales sugieren fuertemente que la actina tiene una participación importante en el valor del Módulo Elástico Aparente en las células cardíacas estudiadas y que el medio HGPA alteraría la disposición espacial del citoesqueleto de actina tornando las células más rígidas. Según la bibliografía disponible, este es el primer trabajo que muestra evidencias directas de la implicancia de las fibras de actina del citoesqueleto en células cardíacas, como un componente importante del  $E^*$  y su

alteración en un medio que emula condiciones diabéticas a nivel celular. Esto podría brindar nuevos enfoques en el desarrollo de estrategias terapéuticas futuras para el tratamiento de la cardiomiopatía diabética.

Por otro lado, las fibras de tubulina sí se vieron afectadas por el tratamiento con HGPA (Fig. 4), el efecto de la diabetes sobre este componente del citoesqueleto y su participación en el aumento del  $E^*$  debería ser explorado en futuros trabajos. Si se realizara una incubación con una droga que desorganice los microtúbulos como por ej. Vincristina (Himes et al. 1976) en una concentración necesaria para lograr la despolimerización (entre 50 nM y 100 nM, Blajeski et al. 2002; Novichkova et al. 2003), podría estudiarse la contribución de la tubulina al  $E^*$  realizando mediciones del mismo antes y después del tratamiento.

Por otra parte sería interesante también como perspectiva a futuro probar el efecto sobre el  $E^*$  de drogas como metformina (Kabadi 2013), sustancia ampliamente usada en el tratamiento de DM tipo 2 y que también ha sido señalada como protectora de los efectos de la diabetes en ensayos previos realizados en la línea H9c2 (Hu et al. 2016) o resveratrol, que es un reconocido antioxidante que también ha sido estudiado como potencial agente terapéutico para esta patología (Hwang et al. 2008; Turan et al. 2012). El estudio de la elasticidad celular mediante MFA permitirá de esta manera realizar avances significativos en el conocimiento de la cardiomiopatía diabética así como del efecto de agentes terapéuticos potenciales.

## Referencias

- American Diabetes Association, 2008. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 31(SUPPL. 1), pp.55-60.
- Baker, M.A., Cerniglia, G.J. & Zaman, A., 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical Biochemistry*, 190(2), pp.360–365.
- Barouch, L.A. et al., 2003. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation*, 108(6), pp.754–759.
- Battiprolu, P.K. et al., 2013. Diabetic cardiomyopathy and metabolic remodeling of the heart. *Life Sciences*, 92(11), pp.609–615.
- Battiprolu, P.K. et al., 2010. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 7(2), pp.e135–e143.
- 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.
- Benech, J.C. et al., 2015. Intrinsic nanomechanical changes in live diabetic cardiomyocytes. *Cardiovascular Regenerative Medicine*; 2(e893) pp.1–8.
- Bergman, R.N. & Ader, M., 2000. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 11(9), pp.351–356.
- Blajeski, A.L. et al., 2002. G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *Journal of Clinical Investigation*, 110(1), pp.91–99.
- Boden, G., 2001. Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 30(4), pp.801–815.
- Boudina, S. et al., 2007. Mitochondrial Energetics in the Heart in Obesity-Related Diabetes: Direct Evidence for Increased Uncoupled Respiration and Activation of Uncoupling Proteins. *Diabetes*, 56(10), pp.2457–2466.
- 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.
- Buchanan, J. et al., 2005. Reduced Cardiac Efficiency and Altered Substrate Metabolism Precedes the Onset of Hyperglycemia and Contractile Dysfunction in Two Mouse Models of Insulin Resistance and Obesity. *Endocrinology*, 146(12), pp.5341–5349.
- Bugger, H. et al., 2008. Type 1 Diabetic Akita Mouse Hearts Are Insulin Sensitive but Manifest Structurally Abnormal Mitochondria That Remain Coupled Despite Increased Uncoupling Protein 3. *Diabetes*, 57(11), pp.2924–2932.
- Cai, L. et al., 2002. Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Mouse Myocardium: Mitochondrial

- Cytochrome c-Mediated Caspase-3 Activation Pathway. *Diabetes*, 51(6), pp.1938–1948.
- Cai, L. & Kang, Y.J., 2003. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Toxicology*, 3(3), pp.219–228.
- Chen, J.-Y. et al., 2013. Increased Aortic Stiffness and Attenuated Lysyl Oxidase Activity in Obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(4), pp.839–846.
- Collinsworth, A.M. et al., 2002. Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation. *AJP: Cell Physiology*, 283(4), pp.C1219–C1227.
- Cooper, G.J.S. et al., 2004. Regeneration of the Heart in Diabetes by Selective Copper Chelation. *Diabetes*, 53(9), pp.2501–2508.
- Diao, J. et al., 2016. Rosmarinic Acid suppressed high glucose-induced apoptosis in H9c2 cells by ameliorating the mitochondrial function and activating STAT3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp.3–9.
- Diogo, C. V. et al., 2013. Cardiac mitochondrial dysfunction during hyperglycemia—The role of oxidative stress and p66Shc signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(1), pp.114–122.
- Dokken, B.B., 2008. The Pathophysiology of Cardiovascular Disease and Diabetes: Beyond Blood Pressure and Lipids. *Diabetes Spectrum*, 21(3), pp.160–165.
- Duncan, J.G., 2011. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(7), pp.1351–1359.
- Dyntar, D. et al., 2001. Glucose and Palmitic Acid Induce Degeneration of Myofibrils and Modulate Apoptosis in Rat Adult Cardiomyocytes. *Diabetes*, 50(9), pp.2105–2113.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26 Suppl 1(suppl 1), pp.S5–20.
- Fillmore, N., Mori, J. & Lopaschuk, G.D., 2014. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), pp.2080–2090.
- Fletcher, D.A. & Mullins, R.D., 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), pp.485–492.
- Folsom, a R. et al., 1996. Relation between plasma phospholipid saturated fatty acids and hyperinsulinemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 45(2), pp.223–228.
- Forouhi, N.G. et al., 2014. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(10), pp.810–818.
- 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.
- Himes, R.H. et al., 1976. Action of the Vinca Alkaloids Vincristine, Vinblastine, and Desacetyl

- Vinblastine Amide on Microtubules in Vitro. *Cancer Research*, 1976 36(10):3798-3802 36(October), pp.3798–3802.
- Hu, M. et al., 2016. Metformin Protects H9C2 Cardiomyocytes from High-Glucose and Hypoxia/Reoxygenation Injury via Inhibition of Reactive Oxygen Species Generation and Inflammatory Responses: Role of AMPK and JNK. *Journal of Diabetes Research*, 2016, pp.1–9.
- Hwang, J.-T. et al., 2008. Resveratrol protects ROS-induced cell death by activating AMPK in H9c2 cardiac muscle cells. *Genes & Nutrition*, 2(4), pp.323–326.
- Itoh, Y. et al., 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 422(6928), pp.173–176.
- Kabadi, U.M., 2013. Comparative efficacy between glimepiride and metformin in preventing progression of prediabetes to type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Mellitus*, 03(03), pp.129–133.
- Kageyama, K., 2002. Overexpression of Calreticulin Modulates Protein Kinase B/Akt Signaling to Promote Apoptosis during Cardiac Differentiation of Cardiomyoblast H9c2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), pp.19255–19264.
- Kahn, S.E., Hull, R.L. & Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), pp.840–846.
- Kemeny, S.F., Figueroa, D.S. & Clyne, A.M., 2013. Hypo- and Hyperglycemia Impair Endothelial Cell Actin Alignment and Nitric Oxide Synthase Activation in Response to Shear Stress A. Zirlik, ed. *PLoS ONE*, 8(6), p.e66176.
- Khan, M.J. et al., 2012. Inhibition of Autophagy Rescues Palmitic Acid-induced Necroptosis of Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), pp.21110–21120.
- Kita, Y. et al., 1996. Correlation between myocardial dysfunction and changes in myosin isoenzymes in diabetic rat hearts. *Journal of Diabetes and its Complications*, 10(1), pp.38–42.
- Korn, E.D., Carrier, M.F. & Pantaloni, D., 1987. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4827), pp.638–644.
- Kuznetsova, T.G. et al., 2007. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 38(8), pp.824–833.
- Li, K. et al., 2015. Glutamine Reduces the Apoptosis of H9C2 Cells Treated with High-Glucose and Reperfusion through an Oxidation-Related Mechanism K. Eller, ed. *PLoS ONE*, 10(7), p.e0132402.
- Lieber, S.C. et al., 2004. Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(2), pp.H645–651.
- Liu, J. et al., 2015. Palmitate promotes autophagy and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK. *Biochemical and biophysical research communications*, 463(3),

pp.262–267.

- Liu, X., Takeda, N. & Dhalla, N.S., 1996. Troponin I phosphorylation in heart homogenate from diabetic rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1316(2), pp.78–84.
- Lovejoy, J.C. et al., 2002. Effects of diets enriched in saturated (palmitic), monounsaturated (oleic), or trans (elaidic) fatty acids on insulin sensitivity and substrate oxidation in healthy adults. *Diabetes Care*, 25(8), pp.1283–1288.
- Machackova, J., Barta, J. & Dhalla, N.S., 2005. Molecular defects in cardiac myofibrillar proteins due to thyroid hormone imbalance and diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 83(12), pp.1071–1091.
- Manco, M. et al., 2000. Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(2), pp.220–224.
- Marín-García, J. & Goldenthal, M.J., 2002. Fatty acid metabolism in cardiac failure: biochemical, genetic and cellular analysis. *Cardiovascular Research*, 54(3), pp.516–527.
- McGarry, J.D., 1992. What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5083), pp.766–770.
- Ménard, C. et al., 1999. Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2 cardiac cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(41), pp.29063–29070.
- Michaelson, J., 2014. *Quantifying Structural and Functional Changes in Cardiac Cells in an In Vitro Model of Diabetic Cardiomyopathy (Doctoral dissertation)*. University of Columbia, NY, USA.
- Michaelson, J., Hariharan, V. & Huang, H., 2014. Hyperglycemic and hyperlipidemic conditions alter cardiac cell biomechanical properties. *Biophysical Journal*, 106(11), pp.2322–9.
- Mozaffarian, D. et al., 2015. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 131(4), pp.e29–322.
- Müller, D.J. & Dufrêne, Y.F., 2011. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology*, 21(8), pp.461–469.
- Murarka, S. & Movahed, M.R., 2010. Diabetic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*, 16(12), pp.971–979.
- Nemoto, O. et al., 2006. Left ventricular dysfunction and remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 70(3), pp.327–334.
- Novichkova, E. a, Onishchenko, G.E. & Shtil, a a, 2003. Microtubule depolymerization by vincristine causes cell death after transition from C mitosis to interphase. *Doklady Biological Sciences : Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Sections* (translated from Russian), 393(1-6), pp.575–578.

- Oyama, K., Takahashi, K. & Sakurai, K., 2009. Cardiomyocyte H9c2 Cells Exhibit Differential Sensitivity to Intracellular Reactive Oxygen Species Generation with Regard to Their Hypertrophic vs Death Responses to Exogenously Added Hydrogen Peroxide. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45(3), pp.361–369.
- Park, M. et al., 2015. Palmitate induces ER stress and autophagy in H9c2 cells: implications for apoptosis and adiponectin resistance. *Journal of Cellular Physiology*, 230(3), pp.630–639.
- Peshavariya, H.M., Dusting, G.J. & Selemidis, S., 2007. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radical Research*, 41(6), pp.699–712.
- Poornima, I.G., Parikh, P. & Shannon, R.P., 2006. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circulation Research*, 98(5), pp.596–605.
- Del Prato, S., 2009. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabetic Medicine*, 26(12), pp.1185–1192.
- Pu, J. et al., 2011. Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells. *Journal of Lipid Research*, 52(7), pp.1319–1327.
- Qiu, H. et al., 2010. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circulation Research*, 107(5), pp.615–619.
- Reszko, A.E. et al., 2004. Peroxisomal fatty acid oxidation is a substantial source of the acetyl moiety of malonyl-CoA in rat heart. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(19), pp.19574–19579.
- Rosa, C.M. et al., 2013. Diabetes mellitus activates fetal gene program and intensifies cardiac remodeling and oxidative stress in aged spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Diabetology*, 12, p.152.
- Rubler, S. et al., 1972. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, 30(6), pp.595–602.
- Sardão, V.A. et al., 2007. Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide--characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biology*, 8(1), p.11.
- Savage, D.B., Petersen, K.F. & Shulman, G.I., 2007. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological Reviews*, 87(2), pp.507–520.
- Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.676–682.
- Schneider, C. a, Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.671–675.
- Sharma, S. et al., 2004. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB journal : official publication of the Federation*

- of American Societies for Experimental Biology*, 18(14), pp.1692–1700.
- Sirghi, L. et al., 2008. Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *European Biophysics Journal : EBJ*, 37(6), pp.935–945.
- Spudich, J.A., 1973. Effects of Cytochalasin B on Actin Filaments. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 37(0), pp.585–593.
- Stone, P.H. et al., 1989. 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. *Journal of the American College of Cardiology*, 14(1), pp.49–57.
- Szczepaniak, L.S. et al., 2007. Forgotten but not gone: the rediscovery of fatty heart, the most common unrecognized disease in America. *Circulation Research*, 101(8), pp.759–767.
- Thackeray, J.T., Beanlands, R.S. & Dasilva, J.N., 2012. Altered sympathetic nervous system signaling in the diabetic heart: emerging targets for molecular imaging. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2(3), pp.314–334.
- Turan, B., Tuncay, E. & Vassort, G., 2012. Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(2), pp.281–296.
- Umadevi, S. et al., 2012. Studies on the cardioprotective role of gallic acid against AGE-induced cell proliferation and oxidative stress in H9C2 (2-1) cells. *Cardiovascular Toxicology*, 12(4), pp.304–411.
- Vinckier, A. & Semenza, G., 1998. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Letters*, 430(1-2), pp.12–16.
- Walther, T.C. & Farese, R. V., 2012. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 81, pp.687–714.
- Wardman, P., 2007. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(7), pp.995–1022.
- Wild, S. et al., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5), pp.1047–1053.
- Wold, L.E. & Ren, J., 2004. Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(4), pp.1066–1071.
- World Health Organization, 2016. Global Report on Diabetes.
- Wu, X. et al., 2010. Cardiomyocyte contractile status is associated with differences in fibronectin and integrin interactions. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 298(6), pp.H2071–2081.
- Xu, J. et al., 2012. Endoplasmic reticulum stress and diabetic cardiomyopathy. *Experimental*

*Diabetes Research*, 2012, p.827971.

Yu, T., Robotham, J.L. & Yoon, Y., 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), pp.2653–2658.

Zhu, Y. et al., 2012. Temporal analysis of vascular smooth muscle cell elasticity and adhesion reveals oscillation waveforms that differ with aging. *Aging Cell*, 11(5), pp.741–750.

Zielonka, J., Vasquez-Vivar, J. & Kalyanaraman, B., 2008. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nature Protocols*, 3(1), pp.8–21.

Zordoky, B.N.M. & El-Kadi, A.O.S., 2007. H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(3), pp.317–322.