



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis para optar al Título de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Opción Biología Molecular

ESTUDIO DE LA VINCULINA EN EL CORAZÓN DE UN MODELO

MURINO DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

Camila Espasandín Cola

Orientador: Dr. Juan Claudio Benech

Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

2019

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
PALABRAS CLAVE	2
INTRODUCCIÓN	3
Diabetes mellitus	3
DM tipo 1	4
DM tipo 2	7
Otros tipos de DM	8
Comorbilidad ligada a la DM	8
Miocardiopatía diabética	10
El miocardio y los cardiomiocitos	14
Adhesiones célula-célula y célula-MEC	21
Fascia adherens	22
Costámeros	24
Mecanotransducción	28
Vinculina	36
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	41
Objetivo general	41
Objetivos específicos	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42
Modelo de trabajo	42
Inducción de DM1 y creación de grupos	43
Obtención de muestras	43
Preparación de muestras para Western blot	44
Homogeneizados de VI	44
Cuantificación de proteínas totales	45
SDS-PAGE	46
Transferencia e incubación con anticuerpos	47
Cuantificación de vinculina	49

Preparación de muestras para cortes histológicos	49
Inmunohistoquímica	50
Microscopía Láser Confocal	51
Cuantificación de fluorescencia	51
Disposición espacial de la vinculina	52
Análisis Estadístico	53
RESULTADOS	54
Caracterización de los ratones utilizados	54
Expresión de vinculina	55
Cuantificación de proteínas totales	55
Western blot	58
Cuantificación de fluorescencia	59
Disposición espacial de la vinculina	60
DISCUSIÓN	69
Niveles de glicemia	69
Miocardopatía diabética	69
Expresión de vinculina	72
Disposición espacial de la vinculina	74
CONCLUSIONES	85
PERSPECTIVAS	87
AGRADECIMIENTOS	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico de múltiples etiologías, que se caracteriza por la presencia de hiperglicemia crónica, consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. La DM afecta a millones de personas en el mundo, siendo la insuficiencia cardíaca la principal causa de muerte entre pacientes diabéticos, posiblemente debido a la existencia de una miocardiopatía diabética. Los mecanismos que conducen al desarrollo de dicha cardiopatía son aún poco conocidos. Sin embargo, se ha reportado que el aumento de la rigidez celular intrínseca en los cardiomiocitos podría contribuir en forma importante. Los costámeros, estructuras supramoleculares asociadas al sarcolema lateral, permiten la adhesión muscular a la matriz extracelular (MEC). Las *fascia adherens* (FA), complejos proteicos que forman parte de los discos intercalares (DI), median la adhesión intercelular. Ambas estructuras tienen un papel fundamental en la mecanotransducción, la cual implica la conversión de estímulos mecánicos en señales bioquímicas que inducen cambios en la estructura y función celular. La vinculina es una proteína citoesquelética que se localiza en estos sitios de adhesión y presenta roles tanto estructurales como de señalización. Hasta ahora no se ha estudiado si dicha proteína se ve afectada por la DM en el corazón. En el presente trabajo de tesis se estudió el efecto de la DM en la expresión de la vinculina,

a partir de homogeneizados de ventrículo izquierdo (VI) provenientes de ratones CD1 con DM inducida por estreptozotocina (STZ). Por otro lado, utilizando Microscopía Láser Confocal se estudió, en cortes histológicos de VI, el efecto de la patología en la distribución de esta proteína. Los niveles de expresión proteica de vinculina no se vieron afectados. Sin embargo, se constató un cambio en su distribución, ya que la misma deja de localizarse en los DI de los cardiomiocitos, dirigiéndose exclusivamente al sarcolema lateral. Por lo tanto, este trabajo muestra por primera vez, evidencias experimentales de que en el modelo de DM1 utilizado, ocurren cambios intracelulares relacionados con la comunicación célula-célula y célula-MEC, pudiendo afectarse las vías mecanotransductoras, y contribuyendo al desarrollo de mecanismos patogénicos cardíacos posiblemente vinculados con la miocardiopatía diabética.

Palabras clave: diabetes mellitus tipo 1; miocardiopatía diabética; mecanotransducción; costámero; discos intercalares; vinculina.

INTRODUCCIÓN

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) se define como un desorden metabólico de múltiples etiologías (Alberti & Zimmet, 1998), asociado a factores tanto genéticos como ambientales (Villeneuve et al., 2011). Se caracteriza por la existencia de una disfunción celular en el transporte y la utilización de glucosa, consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la hormona insulina, lo que resulta en un estado de hiperglicemia crónica (American Diabetes Association, 2014).

Dicha hormona es de gran importancia ya que media cascadas de señalización responsables de la captación de glucosa a nivel fisiológico. Bajos niveles de insulina o de sus receptores, defectos en los sistemas de transducción de señales, o defectos genéticos, causan anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, y proteínas (Kharroubi & Darwish, 2015).

La DM es una de las enfermedades crónicas más comunes prácticamente en todos los países, y la prevalencia en adultos ha ido en aumento en las últimas décadas (Whiting et al., 2011). Esto es debido al crecimiento poblacional, al envejecimiento (Wild et al., 2004) y al hecho de que el desarrollo económico y la urbanización conducen a estilos de vida

caracterizados por una actividad física reducida y un aumento de la obesidad (Wild et al., 2004; Gil-Ortega & Kaski, 2006; Whiting et al., 2011). En 2013, se estimaba que 382 millones de personas padecían DM; este número se espera que llegue a 592 millones para el año 2035 (Guariguata et al., 2014), e incluso que alcance los 642 millones en el 2040 (Ogurtsova et al., 2017).

La DM puede clasificarse en diferentes categorías: DM tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), gestacional, y otros tipos que se deben a causas específicas y que presentan menor prevalencia (Alberti & Zimmet, 1998; American Diabetes Association, 2015).

DM tipo 1

La DM1 resulta en una insuficiencia de la producción de insulina (Maahs et al., 2010). Se conocen alrededor de 40 loci que afectan la susceptibilidad a la enfermedad (Concannon et al., 2009), existiendo una fuerte asociación con la región HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) del cromosoma 6, ligado a los genes DR y DQ (American Diabetes Association, 2014). De los muchos tipos de HLA, los de clase II muestran la mayor asociación con la DM1, donde los haplotipos DRB1*0401-DQB1*0302 y DRB1*0301-DQB1*0201 confieren la mayor susceptibilidad, y DRB1*1501 y DQA1*0102-DQB1*0602 proveen resistencia a la enfermedad (Erich et al.,

2008). Dentro de la DM1, se han reportado tres subclasificaciones: autoinmune, idiopática y fulminante.

La DM autoinmune representa aproximadamente el 5-10% de los casos de DM (Daneman, 2006; Maahs et al., 2010; Waddingham et al., 2015) y se desencadena por una destrucción autoinmune de las células β del páncreas, productoras de insulina (Devendra et al., 2004; Daneman, 2006; Atkinson et al., 2014), principalmente a través de una respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T así como una respuesta humoral por los linfocitos B (Devendra et al., 2004). Se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos que pueden reaccionar tanto contra células de los islotes de Langerhans o contra la insulina, como también contra la enzima descarboxilasa del ácido glutámico, proteínas tirosin fosfatasas y la proteína transportadora de zinc. Estos autoanticuerpos pancreáticos, cuyo rol en la patogenia de la enfermedad no está claro, pueden ser detectados en el suero de pacientes meses o años antes del inicio de la misma (Couper & Donaghue, 2009).

A menudo se desarrolla de manera repentina y puede producir síntomas como polidipsia, poliuria, enuresis, falta de energía, cansancio extremo, polifagia, pérdida de peso repentina, curación lenta de heridas, infecciones frecuentes, visión borrosa, deshidratación severa, y cetoacidosis diabética en niños y adolescentes (Kharroubi & Darwish, 2015).

Además de la importancia de la predisposición genética, diversos factores ambientales han sido implicados en la etiología de la enfermedad (Couper & Donaghue, 2009) como por ejemplo infecciones virales, bajos niveles de vitamina D, exposición prenatal a contaminantes, o la resistencia a la insulina en la primera infancia (debido a la obesidad o el aumento en la velocidad de crecimiento). También se cree que la mejora de las condiciones de higiene y de vida ha disminuido las infecciones infantiles en países con alto nivel socioeconómico, conduciendo a un aumento en las enfermedades autoinmunes. Sin embargo, el papel de los factores ambientales sigue siendo controversial (Kharroubi & Darwish, 2015).

Por otro lado, la DM idiopática es una forma inusual de DM1, de origen desconocido (idiopático) y menos severo que la DM autoinmune. Individuos con este tipo de DM presentan mayormente descendencia africana o proveniente de Asia y sufren grados variables de deficiencia de insulina y cetoacidosis episódica (Daneman, 2006).

La DM fulminante es una forma diferente de DM1 y tiene algunas características comunes con la DM idiopática (no mediada por autoinmunidad). Se caracteriza por altos niveles de glucosa en sangre y la aparición de cetoacidosis poco después del inicio de la hiperglicemia. Tanto factores genéticos como ambientales, especialmente la infección viral, han sido implicados en la enfermedad. La respuesta inmune antiviral puede

desencadenar la destrucción de las células β pancreáticas a través de una reacción inmune acelerada sin autoanticuerpos detectables contra las células β pancreáticas (Kharroubi & Darwish, 2015).

DM tipo 2

La DM2 representa el 90-95% de los casos de DM y es iniciado por la interacción de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida (Waddingham et al., 2015). Aunque la etiología específica no se conoce, no ocurre destrucción autoinmune de las células β , y no se da por ninguna de las causas conocidas de DM. Involucra individuos que tienen resistencia a la insulina y generalmente deficiencia relativa de insulina (no absoluta) (American Diabetes Association, 2015). Se desarrolla debido a mecanismos descompensatorios en la secreción de insulina, inducidos por dicha resistencia (Maahs et al., 2010; Villeneuve et al., 2011). A pesar de que los pacientes con este tipo de DM puedan llegar a tener niveles de insulina normales o incluso elevados, se esperaría que el aumento en los niveles sanguíneos de glucosa resultase en valores de insulina aún más altos si la función de las células β fuera normal. En consecuencia, la secreción de insulina es defectuosa e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina (American Diabetes Association, 2015). Esta respuesta maladaptativa resulta en niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglicemia).

Otros tipos de DM

La DM gestacional es otro tipo de DM, que se diagnostica en el segundo o tercer trimestre de embarazo. No es una DM claramente manifiesta (American Diabetes Association, 2015).

Hay también otros tipos de DM, los cuales se deben a causas específicas: defectos monogénicos que causan disfunción de las células β , como la DM del neonato y la DM que se da en la madurez (*Maturity-Onset Diabetes of the Young* o MODY), representan menos del 5% de los pacientes con DM, y se caracterizan por la aparición abrupta de hiperglicemia, generalmente antes de los 25 años (American Diabetes Association, 2015). La DM relacionada con la fibrosis quística (CFRD) se da en alrededor de un 20% de adolescentes y 40-50% de adultos con dicha enfermedad; la insuficiencia de insulina relacionada con la destrucción fibrótica parcial de los islotes de Langerhans es el defecto primario en la CFRD (American Diabetes Association, 2015).

Comorbilidad ligada a la DM

Tanto la DM1 como la DM2 se asocian con tasas significativamente elevadas de enfermedades macrovasculares como la aterosclerosis coronaria y de grandes arterias (carótidas, aorta, y arterias femorales) (García et al., 1974; Boudina & Abel, 2007), la hipertensión, y el accidente cerebrovascular, y complicaciones microvasculares como la neuropatía, la

retinopatía y la nefropatía (Villeneuve et al., 2011). Sin embargo, la insuficiencia cardíaca es la principal causa de muerte entre pacientes diabéticos (Belke et al., 2004; Gil-Ortega & Kaski, 2006), siendo la DM un factor de riesgo muy reconocido para el desarrollo de la misma.

El *Framingham Heart Study* mostró que la insuficiencia cardíaca es dos veces más frecuente en hombres diabéticos y cinco veces más frecuente en mujeres diabéticas, en comparación con individuos no diabéticos de la misma edad (Kannel & McGee, 1979). Estudios posteriores reportaron que pacientes con DM tienen diez veces mayor riesgo de presentar infarto de miocardio, angina, y necesidad de revascularización de la arteria coronaria (Atkinson et al., 2014).

Entre las patologías cardíacas que se asocian a la DM se incluyen: cardiomegalia, disfunción del ventrículo izquierdo (VI) y remodelamiento eléctrico ventricular (Boudina & Abel, 2007). La disfunción diastólica (de la fase de relajación) del VI, inducida por la DM, se reconoce cada vez más como un importante determinante de morbilidad y mortalidad en la insuficiencia cardíaca (van Heerebeek et al., 2008).

Se ha reportado que la mayor propensión a desarrollar insuficiencia cardíaca, de pacientes diabéticos en comparación con pacientes no diabéticos, a pesar de presentar enfermedad arterial coronaria de

comparable gravedad, posiblemente se deba a la existencia de una miocardiopatía diabética (Zarich & Nesto, 1989).

Miocardiopatía diabética

La miocardiopatía diabética fue descrita por primera vez en 1972 por Rubler y colaboradores. Se caracteriza por presentar con el tiempo, un aumento en la masa cardíaca, hipertrofia miocárdica, fibrosis intersticial y perivascular en la fase tardía, y apoptosis de los cardiomiocitos del VI (Devereux et al., 2000; Shiomi et al., 2003; Wang et al., 2006), causando rigidez en el miocardio. Dichos cambios en la estructura y función del miocardio, no se atribuyen directamente a factores como la enfermedad arterial coronaria o la hipertensión (Boudina & Abel, 2010), sino a características propias de la DM, las cuales deben contribuir al daño del músculo cardíaco (Wang et al., 2006).

En humanos, las primeras etapas de la miocardiopatía diabética se asocian con una reducción de la función diastólica en 30-70% de los pacientes diabéticos asintomáticos (Zarich et al., 1988; Wang et al., 2006). En etapas posteriores la disfunción sistólica (de la fase de contracción) y la insuficiencia cardíaca se hacen evidentes (Zarich & Nesto, 1989; Shiomi et al., 2003).

Los mecanismos que conducen al desarrollo de la miocardiopatía diabética son aún poco conocidos. Existe un acuerdo general de que la patogenia es multifactorial (Spector, 1998), y varios mecanismos han sido implicados en su desarrollo. Las hipótesis propuestas incluyen desde disfunción autonómica, trastornos metabólicos, anomalías en la homeostasis iónica, alteración de proteínas estructurales y de la integridad de estructuras del citoesqueleto, hasta la disfunción de los sarcómeros (Spector, 1998; Berg et al., 1999). Todas estas alteraciones subcelulares contribuirían a una disfunción contráctil con los consecuentes problemas cardíacos (Waddingham et al., 2015).

En modelos animales de DM1 y 2, se han documentado varias alteraciones cardíacas funcionales y estructurales o trastornos del músculo cardíaco (Boudina & Abel, 2007), así como defectos en la señalización y el metabolismo del calcio (Ca^{2+}), que podrían preceder a la miocardiopatía diabética clínicamente manifiesta (Boudina & Abel, 2010). La homeostasis intracelular anormal del Ca^{2+} se atribuye a alteraciones funcionales de múltiples proteínas involucradas en la liberación y la captación de Ca^{2+} a través del sarcolema y el retículo sarcoplásmico (RS) (Boudina & Abel, 2007). Entre ellas se encuentra la expresión reducida de la ATPasa cálcica del RS (SERCA2a), que se presenta tanto en la DM1 como en la DM2 (Belke et al., 2004; Sulaiman et al., 2010; Benech et al., 2014).

Por otro lado, la hiperglicemia prolongada puede generar cambios en las propiedades de la matriz extracelular (MEC): aumenta la glicación de proteínas intersticiales como el colágeno y la deposición de productos finales de glicación avanzada (*Advanced Glycation End products*, o AGEs) (Berg et al., 1999; Gil-Ortega & Kaski, 2006; Boudina & Abel, 2007), resultando en un aumento en la rigidez del miocardio y una alteración de la contractilidad (Boudina & Abel, 2007).

En pacientes diabéticos con una fracción de eyección del VI (FEVI) reducida, se ha reportado que la deposición de AGEs y de colágeno son determinantes importantes en la mayor rigidez de VI (van Heerebeek et al., 2008).

Por otro lado, Borbély y colaboradores (2005) reportaron una alta tensión en reposo en cardiomiocitos hipertróficos de muestras de biopsias de VI, de pacientes con insuficiencia cardíaca con FEVI normal, y lo correlacionaron con una mayor rigidez diastólica del VI *in vivo*. Por lo tanto, se cree que una rigidez celular intrínseca de los cardiomiocitos también contribuye al aumento de la rigidez del miocardio en la DM, llevando a una disfunción diastólica (van Heerebeek et al., 2008). Evidencia reciente también apoya fuertemente esta idea. En 2014, Benech y colaboradores utilizaron el método de nanoindentación de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) para comparar las propiedades materiales de cardiomiocitos vivos

aislados del VI de ratones normales y diabéticos, reportando una mayor rigidez por parte de los cardiomiocitos diabéticos.

También se ha visto que otros cambios que preceden a la remodelación de la MEC, como interacciones célula-MEC y cambios estructurales dentro del sarcómero y del citoesqueleto, como la desorganización del citoesqueleto de actina, contribuirían de manera importante a la disfunción diastólica en la DM (Benech et al., 2014; Meininger, 2014; Waddingham et al., 2015).

Las propiedades nanomecánicas de los cardiomiocitos se ven afectadas por patologías como la DM, incluida la fuerza de adhesión del sarcolema. Benech y colaboradores (2014) detectaron una mayor fuerza de adhesión en cardiomiocitos provenientes de ratones CD1 luego de tres meses de DM1 inducida con estreptozotocina (STZ), y plantearon que podría estar ocurriendo un aumento en el número y/o estado de activación de moléculas de adhesión que se encuentran en la superficie de los cardiomiocitos. Los cambios resultantes en la adhesión y la elasticidad del tejido del corazón pueden afectar el volumen de sangre que llena dicho órgano (Hersch et al., 2012), por lo tanto, podrían estar involucrados en el desarrollo de la miocardiopatía diabética.

En la figura 1 se resumen los mecanismos que posiblemente contribuyen al aumento de la rigidez del miocardio y la disfunción ventricular en el corazón.

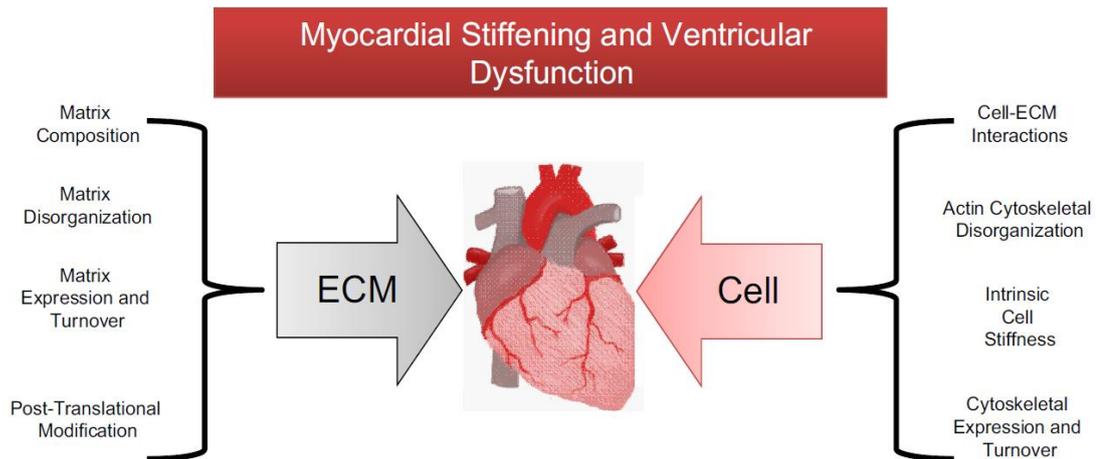


Figura 1. Posibles mecanismos que intervienen en el aumento de la rigidez y la disfunción ventricular en el corazón. Tomado de Meininger, 2014.

El miocardio y los cardiomiocitos

El corazón es un órgano cinético cuya forma cambia considerablemente durante el desarrollo y la enfermedad, y requiere que los cardiomiocitos sean mecánicamente durables y capaces de fusionar una variedad de señales ambientales en diferentes escalas de tiempo (McCain & Parker, 2011). Los cardiomiocitos son responsables del flujo sanguíneo permanente mediante contracciones cardíacas coordinadas (Hersch et al., 2012). Son el tipo de célula más activo mecánicamente en los mamíferos. Un cardiomiocito ventricular experimenta cambios en la longitud y la carga

durante cada latido del corazón. La contracción los acorta físicamente durante la sístole, mientras que la sangre que ingresa a las cámaras cardíacas durante la diástole alarga o deforma las células (Russell et al., 2010).

Los cardiomiocitos son células cilíndricas, con un diámetro que ronda entre los 10-15 μm y un largo de alrededor de 100 μm . En general presentan uno o dos núcleos levemente elongados que se localizan centralmente (Sarantitis et al., 2012). Por microscopía óptica ya se evidencia su alto grado de organización, las células aisladas presentan una forma más o menos rectangular, y una apariencia estriada en contraste de fase, que se debe a la disposición paracristalina de los elementos contráctiles, las miofibrillas (Ehler, 2015). La disposición de los cardiomiocitos lleva a la formación de un sincitio funcional, el cual constituye el músculo cardíaco (Sarantitis et al., 2012). Esta organización es crucial para la propagación dirigida de señales eléctricas a través de cadenas en serie de cardiomiocitos (Ehler, 2015).

Durante décadas, estas células bombean volúmenes de sangre casi constantes (Jacot et al., 2008) aunque las propiedades del corazón, como su elasticidad, cambian drásticamente con el envejecimiento o como resultado de enfermedades (Hersch et al., 2012). Esto se debe a que los cardiomiocitos de mamíferos adultos tienen un limitado potencial regenerativo (Matsushita et al., 1999).

Con respecto al sarcolema de estas células, en él se pueden distinguir dos subáreas diferentes: los discos intercalares (DI) y el sarcolema lateral (Sarantitis et al., 2012).

Los DI representan una parte especializada de la membrana celular. Usualmente los cardiomiocitos se bifurcan y conectan a cardiomiocitos adyacentes, a lo largo del eje longitudinal, a través de los DI. Proporcionan conexión y comunicación adecuadas entre las células del miocardio (Kostin et al., 1998-a; Pyle & Solaro, 2004) manteniendo la integridad estructural y la función sincronizada del corazón. Consisten en desmosomas, *fascia adherens* (FA) y uniones GAP (Sarantitis et al., 2012). Las uniones GAP facilitan la conducción del impulso cardíaco de modo que todo el corazón se comporte eléctricamente como un sincitio, mientras que los desmosomas y las FA aseguran la transmisión de la tracción generada por las células individuales a través del miocardio (Matsushita et al., 1999).

Por otro lado, el sarcolema lateral se compone del área del sarcolema que no forma parte de los DI, presentando una topografía diferente (Sarantitis et al., 2012). En él se reconocen áreas especializadas del cardiomiocito llamados costámeros (Kostin et al., 1998-a; Bloch & Gonzalez-Serratos, 2003; Ervasti, 2003). Además, hay invaginaciones de membrana, los túbulos transversos o túbulos-T, que están flanqueados por el RS y forman la estructura de la díada, necesaria para el acoplamiento excitación/contracción (Ehler, 2015).

En la figura 2 se esquematiza las estructuras internas de un cardiomiocito ventricular.

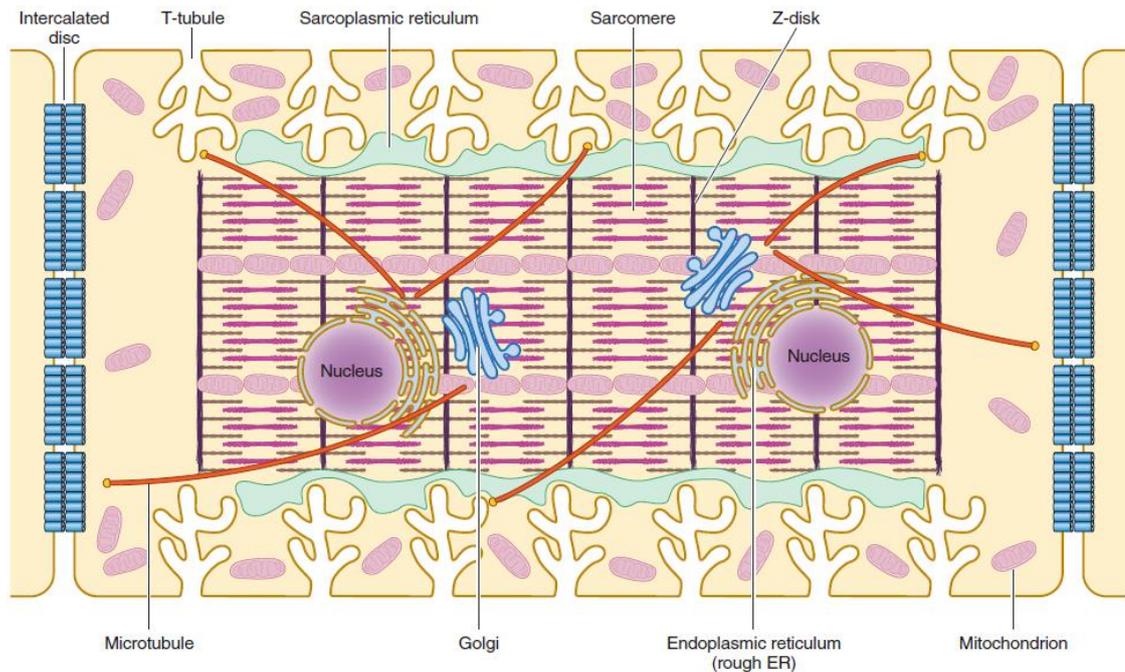


Figura 2. Esquema de las estructuras internas de un cardiomiocito ventricular adulto. Se muestra diferencias en la topografía de la membrana plasmática a nivel de los discos intercalares y el sarcolema lateral. Tomado de Hong & Shaw, 2017.

Los cardiomiocitos se componen, además, de una gran variedad de proteínas, las cuales pueden clasificarse según las propiedades estructurales y funcionales (Kostin et al., 1998-a).

El citoesqueleto de los cardiomiocitos es una estructura subcelular altamente organizada y compleja, que proporciona soporte mecánico a la célula, conservando la integridad estructural y funcional, y contribuyendo a

la disposición espacial de otros elementos subcelulares (Solaro & Van Eyk, 1996). Presenta una clara división funcional entre la parte contráctil y las partes no contráctiles que transmiten la fuerza desarrollada y garantizan la integridad estructural de la célula y el sincitio funcional; algunas proteínas del citoesqueleto participan en diversos procesos celulares, entre ellos se cree que desempeña un papel importante en la transducción de señales mecánicas de la célula (Solaro & Van Eyk, 1996).

Durante el crecimiento fisiológico, los cardiomiocitos se remodelan adaptativamente en relación a las cargas mecánicas. Sin embargo, los estímulos patológicos pueden inducir una remodelación mal adaptada. En ambas condiciones, el citoesqueleto desempeña un papel fundamental tanto en la detección del estrés mecánico o como mediador del remodelado estructural y de las respuestas funcionales dentro del cardiomiocito (McCain & Parker, 2011).

Los cardiomiocitos están compuestos de miofibrillas que contienen los componentes contráctiles del músculo estriado, responsable de la conversión de energía química en energía mecánica, para realizar trabajo y generar fuerza. Paralelamente al eje longitudinal de la célula, las miofibrillas están definidas por una sucesión homogénea de líneas transversales, que contienen unidades individuales repetitivas llamadas sarcómeros (Sequeira et al., 2014). El citoesqueleto sarcomérico consiste en filamentos delgados de actina, filamentos gruesos de miosina y discos

Z. Un sarcómero está limitado por dos discos Z (Kostin et al., 1998-a), conectados en serie para formar una miofibrilla. Entre los filamentos de actina, se disponen filamentos gruesos de miosina, ambos elementos importantes para la ejecución del ciclo de contracción (Sarantitis et al., 2012). En la figura 3 se ilustra de manera esquemática cómo se disponen las miofibrillas y los sarcómeros.

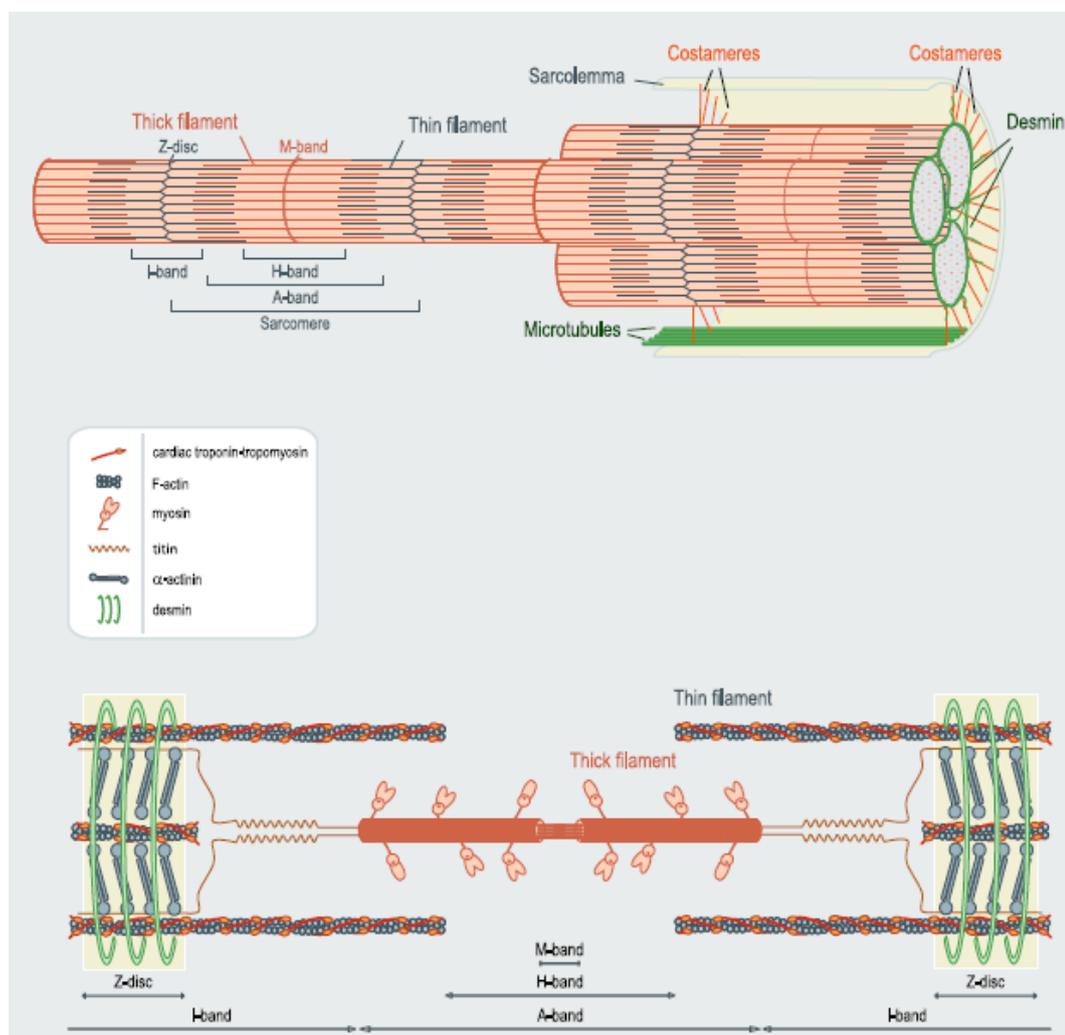


Figura 3. Ilustración esquemática de grupo de miofibrillas conectadas al sarcolemma mediante la red costamérica (arriba) y de un sarcómero individual (abajo). Tomado de Sequeira et al., 2014.

El citoesqueleto extra-sarcomérico consiste en filamentos intermedios de desmina, microfilamentos de actina y microtúbulos (Kostin et al., 1998-a). Conecta el sarcómero con el sarcolema y la MEC a través del disco Z y el citoesqueleto de la sub-membrana. De esta manera se asegura la transmisión de la energía producida por los sarcómeros (Kostin et al., 1998-a). También brinda apoyo a las estructuras subcelulares, organiza el citoplasma, regula la topografía de la membrana celular, y transmite señales mecánicas y químicas, tanto dentro de las células como entre ellas (Sarantitis et al., 2012).

El citoesqueleto de la sub-membrana consiste en el complejo distrofina-glicoproteína (DGC), el complejo integrina-talina-vinculina y el complejo de espectrina (Kostin et al., 1998-a). Estas estructuras se consideran pertenecientes al citoesqueleto, pero generalmente se mencionan como un grupo separado de proteínas, ya que tienen un papel funcional específico (Kostin et al., 1998-a). Estas proteínas sirven para la conexión de los sarcómeros con el área del sarcolema lateral y la estabilización del sistema-T. También intervienen en la conexión entre el entorno intracelular y la MEC (Sarantitis et al., 2012). Estos tres complejos proteicos forman los llamados costámeros.

El citoesqueleto forma el andamiaje de los cardiomiocitos, ya que regula la forma de las células, proporciona integridad mecánica y resistencia, y

estabiliza las proteínas sarcoméricas. Es importante destacar que este marco estructural media la señalización biomecánica y bioquímica, tanto hacia adentro como hacia afuera de la célula, alterando la expresión génica, la síntesis de proteínas y la regulación postraducciona, y remodelando directamente el miocardio (Kostin et al., 2000).

Es importante marcar que, además de los cardiomiocitos, en el miocardio se encuentra una variedad de tipos celulares, como fibroblastos (que representan la mayoría de las células en el corazón normal), células endoteliales y células del músculo liso (Sarantitis et al., 2012).

Por otro lado, el tejido conjuntivo que rodea a los cardiomiocitos incluye, desde la capa más externa hasta la más interna, el epimisio, el perimisio y el endomisio (Borg et al., 1983); este último contiene la MEC, que se compone de colágeno tipo I, III y IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos, y presenta un papel clave en la interacción dinámica entre los cardiomiocitos (Sarantitis et al., 2012).

Adhesiones célula-célula y célula-MEC

Las células se adhieren entre sí y con la MEC a través de una maquinaria de adhesión celular específica, donde sitios de contacto subcelulares especializados de diferente composición molecular y estructural, formados por receptores transmembrana, se unen a ligandos extracelulares y

proveen un anclaje al citoesqueleto intracelular mediante proteínas adaptadoras. Estas uniones deben soportar el ensamblaje a largo plazo de tejidos con propiedades estructurales y mecánicas específicas (Chen et al., 2004).

Un tipo de uniones intercelulares que se encuentran en los cardiomiocitos son las FA, mientras que las uniones célula-MEC se dan a través de los costámeros.

Fascia adherens

Las FA, adhesiones intercelulares importantes para el desarrollo de la organización multicelular, fueron definidas originalmente como dominios de la membrana plasmática, que se encontraban reforzados por una densa placa citoplásmica a la que se adherían los microfilamentos de actina (Farquhar & Palade, 1963). Están especializadas en el acoplamiento mecánico entre células vecinas. Varios elementos citoesqueléticos y citoplásmicos se ensamblan para unir componentes del citoesqueleto de actina en células adyacentes.

Las FA se encuentran en células epiteliales y endoteliales, en las uniones sinápticas del sistema nervioso central y los DI de los cardiomiocitos (Michaelson & Huang, 2011). En éstos últimos, se organizan junto con los desmosomas y las uniones GAP, tal como se muestra en la figura 4.

En el corazón, los principales componentes que se encuentran unidos en las FA son las glicoproteínas transmembrana N-cadherinas, las cuales se unen intracelularmente a las proteínas citoplasmáticas α - y β -cateninas, que a su vez se unen a la vinculina, metavinculina, placoglobina, y filamentos de actina. También se encuentran allí una serie de proteínas que funcionan posiblemente como sensores de tensión (Kostin et al., 1998-a,b, Fatkin & Graham, 2002; Michaelson & Huang, 2011; Mezzano & Sheikh, 2012).

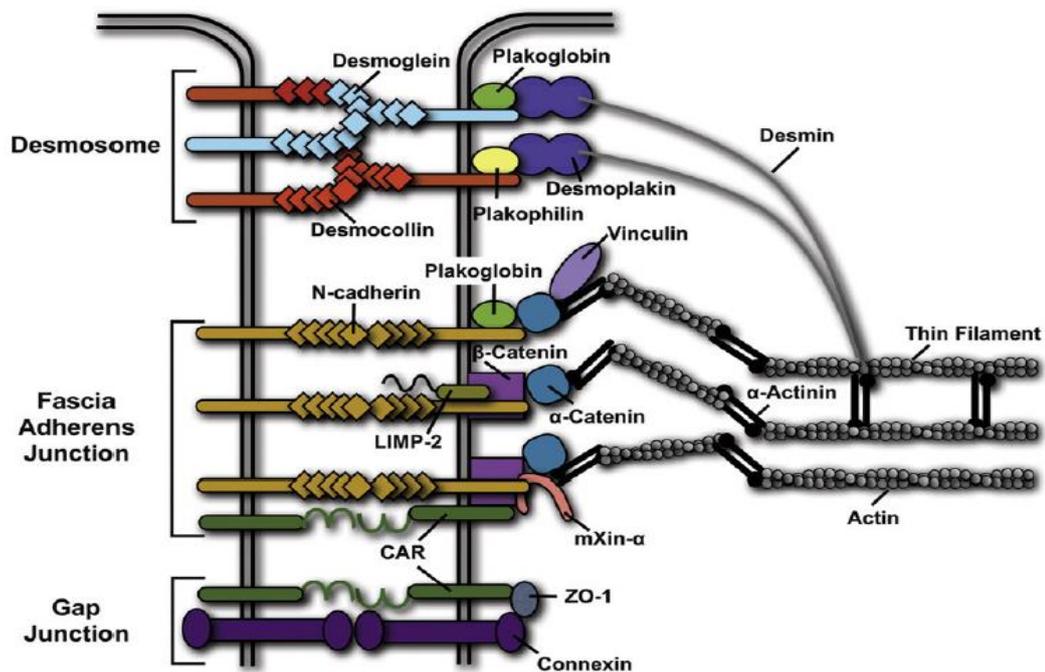


Figura 4. Esquema de los principales componentes de los discos intercalares: desmosomas, *fascia adherens* y uniones GAP. Tomado de Sheikh et al., 2009.

Las FA proveen un nexo mecánico entre dos cardiomiocitos. Esto es debido a que el dominio extracelular de las cadherinas de un cardiomiocito, media la adhesión intercelular al unirse a cadherinas de la célula adyacente. A su vez, estos complejos proteicos funcionan como sitios de anclaje para los sarcómeros terminales, asegurando así las miofibrillas (Li et al., 2019). Los filamentos gruesos de miosina y filamentos finos de actina se conectan con las proteínas de la FA que a su vez las sujeta a la membrana de los DI. Por otro lado, las FA representan un punto clave para la transmisión de fuerza entre cardiomiocitos vecinos. De esta manera contribuyen al mantenimiento de la integridad funcional y estructural del tejido, mejorando la fuerza y estabilidad del miocardio (Li et al., 2019).

Costámeros

El término “costámero” (del latín *costa*, costilla; del griego *meros*, parte) fue usado por primera vez por Pardo y colaboradores (1983-a) para describir bandas transversales en el sarcolema de músculo esquelético, con aspecto de costillas, que contenían vinculina y que rodeaban la fibra muscular de manera perpendicular al eje longitudinal.

Los costámeros se encuentran en células musculares cardíacas y esqueléticas (Pardo et al., 1983-a,b). Aquellos pertenecientes al músculo cardíaco son algo diferentes a los del músculo esquelético: los primeros

aparecen como una sola banda sobre el disco Z y generalmente son más estrechos que la banda I subyacente, observándose una mayor intensidad de tinción directamente sobre la línea Z, mientras que los segundos consisten en bandas dobles que flanquean el disco Z (Pardo et al., 1983-b).

Se encontró que están ubicadas a nivel de la sub-membrana (Pardo et al., 1983a) y que son responsables de la comunicación física entre el disco Z, el sarcolema y la MEC que cubre los cardiomiocitos individuales lateralmente (Craig & Pardo, 1983; Pardo et al., 1983-a,b; Danowski et al., 1992), encontrándose justo debajo de la membrana de los túbulos T (Hong & Shaw, 2017).

Los costámeros están compuestos de complejos de proteínas que interactúan y cuyas funciones incluyen el mantenimiento de la estructura celular y la transducción de señales mediada por sus proteínas constituyentes (Pardo et al., 1983-a). Comprenden tres complejos proteicos: el DGC, el complejo de espectrina y el sistema integrina-talina-vinculina (Danowski et al., 1992; Ervasti, 1993; Samarel, 2005; Ahmad et al., 2005). Las proteínas asociadas a la membrana en la cara citoplásmica de todos los complejos, forman colectivamente un enlace al aparato miofibrilar a través de interacciones proteína-proteína, que termina finalmente en el disco Z de las miofibrillas periféricas (Ervasti, 2003).

Con respecto al sistema integrina-talina-vinculina, como se muestra en la figura 5, los sarcómeros más cercanos al sarcolema interactúan con los dominios citoplasmáticos de dímeros de integrina, receptores transmembrana heterodiméricos compuestos de dos subunidades (α y β), a través de la talina y la vinculina, dos proteínas citoesqueléticas, esenciales en la unión de los filamentos de actina del citoesqueleto, al sarcolema. Los dominios extracelulares de las integrinas se unen a la fibronectina, laminina o colágeno de la MEC (Pardo et al., 1983-a; Ross & Borg, 2001; Sparrow & Schöck, 2009).

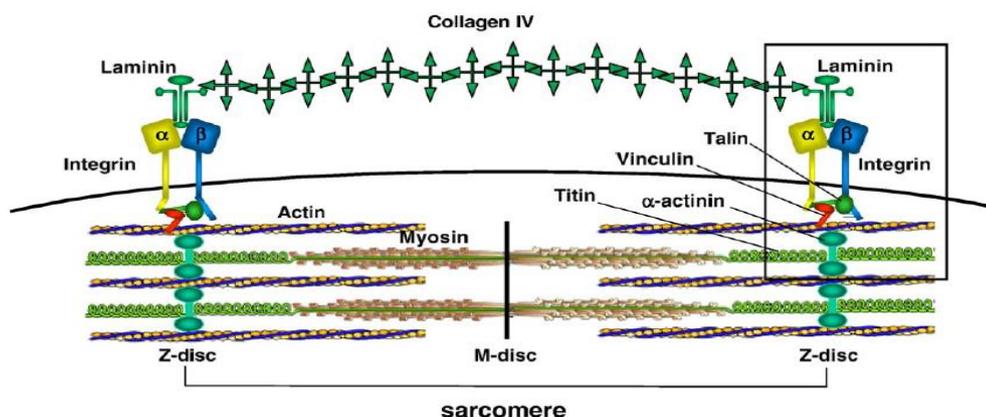


Figura 5. El sistema integrina-talina-vinculina en los costámeros, y su interacción con los sarcómeros a nivel del disco Z y con la matriz extracelular. Tomado de Brancaccio et al., 2006.

Sin embargo, para formar una unión continua entre las miofibrillas y la MEC, son necesarias proteínas adicionales o modificaciones postraduccionales de proteínas ya conocidas del costámero (Ervasti, 2003). Una lista creciente de otras proteínas citoesqueléticas y quinasas de señalización,

han sido localizadas en los costámeros, proporcionando así un enlace físico directo vía interacciones proteína-proteína, entre el aparato contráctil de las células musculares individuales y proteínas de la MEC dentro del intersticio cardiaco (Ervasti, 2003).

En la figura 6 se esquematiza las proteínas conocidas que conforman al disco Z y los tres complejos costaméricos.

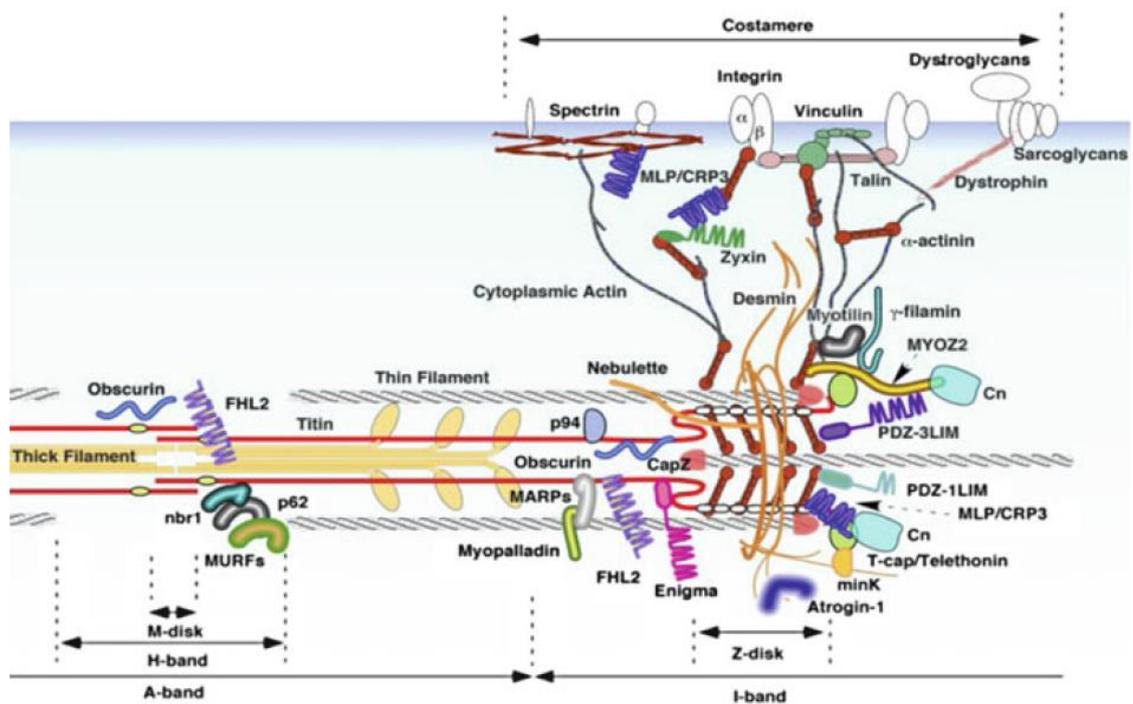


Figura 6. Complejos de proteínas citoesqueléticas en el costámero y disco Z de los cardiomiocitos. Se muestran proteínas estructurales y de señalización. Tomado de Hoshijima, 2006.

Los costámeros son similares a las adhesiones focales no musculares, de muchas maneras: 1) contienen vinculina, talina e integrina; 2) se localizan en sitios celulares cercanos al sustrato (Danowski et al., 1992); 3) proteínas

de la MEC se depositan en las superficies externas (Borg et al., 1983). Tanto los costámeros como las adhesiones focales se encuentran asociadas a la membrana, localizadas donde haces de los filamentos de actina se conectan al sarcolema (Geiger et al., 1980; Pardo et al., 1983-a), funcionando como una placa de adhesión a la MEC (Ervasti, 2003; Hoshijima, 2006).

Además, las adhesiones focales son lugares donde la fuerza contráctil de las células es transmitida a su sustrato, la MEC. Es por esto que fue sugerido que una función de los costámeros podría ser formar un enlace mecánico entre las miofibrillas contráctiles y el ambiente extracelular (Pardo et al., 1983-a,b; Craig & Pardo, 1983), y de esta manera asegurar la integridad de las fibras musculares durante los ciclos de contracción y relajación (Pardo et al., 1983-b; Danowski et al., 1992).

Mecanotransducción

La mayoría de las células en los órganos y tejidos están sometidas a múltiples estímulos mecánicos externos, que modulan varios aspectos de las funciones celulares y preservan la estructura y función de los tejidos (Alenghat & Ingber, 2002).

Las células musculares cardíacas tienen una capacidad intrínseca de detectar y responder a la carga mecánica a través de un proceso conocido como mecanotransducción. En el corazón, este proceso implica la conversión de estímulos mecánicos en señales bioquímicas que inducen cambios en la estructura y función celular. La mecanotransducción y sus efectos posteriores funcionan inicialmente como respuestas adaptativas que sirven como mecanismos compensatorios durante la adaptación a la carga inicial (Vogel & Sheetz, 2009; Lyon et al., 2015).

Generalmente, la mecanotransducción en la célula puede describirse como (a) la transmisión de la fuerza aplicada a estructuras especializadas, (b) la transducción de la fuerza en una señal detectable bioquímicamente, y (c) la respuesta subsiguiente de la célula (Alonso & Goldmann, 2016). Estas fases se conocen comúnmente como mecanotransmisión, mecanosensado y respuesta mecánica, respectivamente (Hoffman et al., 2011; Janostiak et al., 2014).

Respuestas iniciadas por la mecanotransducción son, por ejemplo, cambios en la afinidad de unión, alteraciones en el estado de fosforilación y/o cambios de conformación de proteínas, que activan vías de señalización, las cuales conducen a la expresión génica, la síntesis de proteínas y en última instancia, el cambio del fenotipo celular (Hoffman et al., 2011).

En el músculo cardíaco, se han propuesto varias proteínas como mecanosensores y mecanotransductores clave que detectan y responden directamente a las cargas mecánicas, desencadenando alteraciones estructurales, de señalización y funcionales, asociadas a diversos procesos celulares. Estos procesos pueden incluir la regulación de la electrofisiología a través de canales sensibles al estiramiento, propiedades materiales del miocardio, función contráctil y regulación del Ca^{2+} , y el efecto posterior de la señalización mecánica: hipertrofia y atrofia (Lyon et al., 2015).

En la red de mecanotransducción del corazón, señales de fuerza externa (como las impuestas durante la carga hemodinámica) se transmiten desde la MEC al citoesqueleto de los cardiomiocitos, mientras que al mismo tiempo los propios sarcómeros generan fuerzas, que se propagan en la dirección opuesta. El sarcómero es el motor molecular del cardiomiocito, y la fuerza generada por las interacciones actina-miosina se transmite de manera compleja a través del propio sarcómero, el disco Z y el citoesqueleto al sarcolema y, finalmente, a través de la MEC al miocardio circundante. A medida que las fuerzas del exterior de la célula se transmiten de vuelta al sarcómero, varias moléculas a nivel del sarcolema participan en la detección y transducción de fuerzas tanto internas como externas (Pyle & Solaro, 2004; Hoshijima, 2006).

Dentro de los actores moleculares que han sido identificados como participantes en la mecanotransducción celular se encuentra la MEC, receptores de membrana, estructuras del citoesqueleto y múltiples vías de señalización (Vogel & Sheetz, 2009). Las vías de transducción de señales que se activan en respuesta a fuerzas mecánicas incluye muchos componentes únicos, así como elementos compartidos por otras vías (Samarel, 2005).

Existen complejos proteicos cuya función es la de detectar estímulos mecánicos, que se acoplan al citoesqueleto, el cual integra los estímulos extracelulares, intracelulares e intercelulares (Ross & Borg, 2001). Además, debido a que hay proteínas mecanosensibles que se asocian con sub-estructuras citoesqueléticas específicas como el disco Z, la arquitectura del citoesqueleto proporciona a los miocitos, sesgos de señalización y filtros que atenúan la mecanosensibilidad y la mecanotransducción según la dirección, la fuente y la frecuencia temporal de los estímulos mecánicos (Ross & Borg, 2001). La producción de fuerza debe ser ajustada y bien controlada para evitar la disfunción, ya que afecta la regulación latido a latido del rendimiento cardíaco, pero además afecta la proliferación, diferenciación, crecimiento y sobrevivencia de los componentes celulares que comprenden el miocardio, siendo también el mecanismo predominante responsable del crecimiento adaptativo de los cardiomiocitos en respuesta al cambio de las cargas hemodinámicas

(Samarel, 2005). En la figura 7 se muestra las funciones desencadenadas en los cardiomiocitos, consecuencia de la activación de vías de señalización mecanotransductoras, en dirección de “afuera hacia adentro” o *outside-in*.

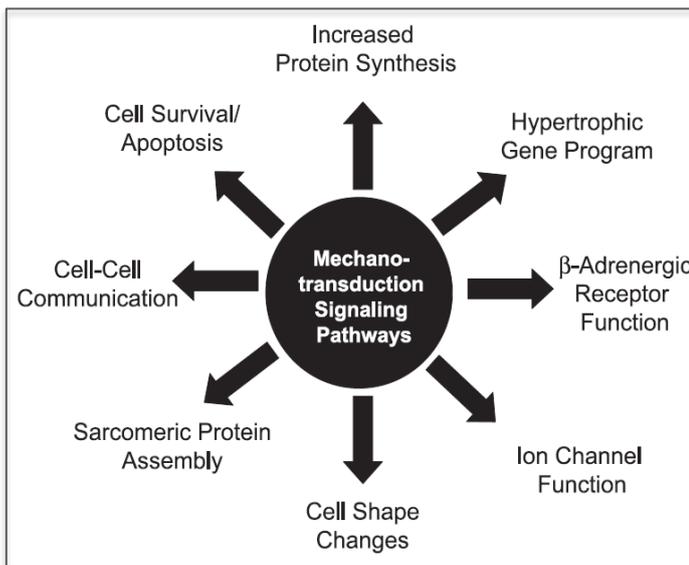


Figura 7. Funciones moduladas por vías de señalización mecanotransductoras activadas durante la señalización *outside-in* en los cardiomiocitos. Tomado de Samarel, 2005.

Las vías que vinculan los estímulos mecánicos con las señales bioquímicas en los cardiomiocitos no están claras, pero un creciente cuerpo de evidencia indica que los costámeros tienen un papel fundamental en la detección y transducción del estrés mecánico en señales bioquímicas que coordinan las respuestas de crecimiento a estímulos hipertróficos tanto en el músculo cardíaco como en el esquelético (Terracio et al., 1991; Borg et al., 2000; Ross & Borg, 2001; Sussman et al., 2002) y que afectan la función celular.

En 1992, Danowski y colaboradores demostraron por primera vez que los costámeros eran sitios donde las fuerzas contráctiles generadas dentro del cardiomiocito se transmitían directamente a la MEC circundante. También se sabe que los costámeros son sitios donde el desplazamiento longitudinal de la MEC se transmite directamente a la maquinaria contráctil de la célula (Mansour et al., 2004; Samarel, 2005; Peter et al., 2011). El costámero representa una vía de señalización de dos sentidos, unida entre el disco Z y la MEC, que puede modular el crecimiento y la contracción de las miofibrillas (Bloch & Gonzalez-Serratos, 2003).

El costámero es de importancia crítica tanto para la transmisión de fuerza como para la remodelación del sarcómero durante la adaptación a la sobrecarga hemodinámica. Se sabe que el costámero está involucrado en el crecimiento fisiológico o patológico de los cardiomiocitos como resultado de cargas mecánicas (Hoshijima 2006; Russell et al., 2010).

Con respecto al complejo integrina-talina-vinculina, éste es responsable de la transducción bidireccional de señales biomecánicas en respuesta al estrés o la sobrecarga de presión. Se encarga de la transmisión bidireccional de la fuerza contráctil entre el citoplasma de los cardiomiocitos y la MEC, con la vinculina como la proteína que une la membrana y el citoesqueleto de actina (Hong & Shaw, 2017). Un componente importante que contribuye al mecanosensado son las integrinas (Torsoni et al., 2003;

Neves et al., 2016). Además de su función estructural, las integrinas reclutan proteínas de señalización para la transducción de estímulos mecánicos (Wiesner et al., 2005) y mediadores de señales (Ervasti, 2003; Samarel, 2005). Es importante que los cambios que se producen en la MEC puedan influir y verse influidos por el tráfico de señalización entre el costámero, los discos Z periféricos, los discos Z centrales y el núcleo (Ervasti, 2003).

Por otro lado, las fuerzas mecánicas generadas por los sarcómeros pueden transmitirse en dirección longitudinal al sarcolema y luego a cardiomiocitos vecinos. Existe evidencia de dependencia direccional de la detección de estrés de los cardiomiocitos, por lo tanto, puede haber dependencia direccional de la mecanotransducción dentro de un miocito (Lyon et al., 2015).

Asímismo, los DI también son posibles sitios clave para la transducción de fuerzas mecánicas, ya que también existen conexiones longitudinales entre el citoesqueleto de actina y filamentos intermedios, con las FA y los desmosomas, respectivamente (Sheikh et al., 2009). Incluso, se han identificado uniones híbridas conocidas como *area composita*, compuestas por proteínas tanto de las FA como de los desmosomas, lo que destaca una convergencia de vías de señalización (Franke et al., 2006).

Se ha propuesto un rol mecanotransductor para las proteínas N-cadherina y α -catenina en las FA (Yonemura et al., 2010). En estos complejos de adhesión también reportan a la vinculina como proteína clave (Yonemura et al., 2010). La fuerza desarrollada dentro de los sarcómeros es transmitida longitudinalmente a estas uniones especializadas, las cuales tienen un rol clave en el mantenimiento del acoplamiento mecánico y eléctrico entre los cardiomiocitos (Sheikh et al., 2009).

El corazón tiene respuestas adaptativas para una gran variedad de factores, genéticos y extrínsecos, para mantener la función contráctil. Cuando las respuestas compensatorias no son suficientes, se produce una disfunción cardíaca que conduce a una miocardiopatía. Las respuestas compensatorias del corazón están mediadas por diferentes vías de señalización. Inicialmente, las vías de señalización mantienen la contractilidad normal, pero la activación persistente de estas vías conduce a una disfunción cardíaca (Harvey & Leinwand, 2011; Lyon et al., 2015). La lesión de los cardiomiocitos puede afectar la integridad estructural de los componentes del aparato mecanosensorial y perjudicar la generación de fuerza, la regulación del crecimiento y la supervivencia celular (Hongguangi & Vander Heide, 2010).

Vinculina

La vinculina es una proteína citoesquelética globular de 117 kDa (Coutu & Craig, 1988; Price et al., 1989) que contiene 1066 aminoácidos. Está compuesta de ocho α -hélices antiparalelas organizadas en cinco dominios diferentes, denominados 1–5 (D1–D5) por Bakolitsa y colaboradores (2004). Experimenta un cambio conformacional que expone tres regiones funcionales: una “cabeza” N-terminal ácida (punto isoeléctrico -pI- 5.4) de 90 kDa (residuos 1–835), una región bisagra flexible rica en prolina (residuos 836–895) y una “cola” C-terminal básica (pI 9.7) de alrededor de 27 kDa (residuos 896–1066) (Milam, 1985; Coutu & Craig, 1988; Price et al., 1989; Eimer et al., 1993; Winkler et al., 1996; Humphries et al., 2007; Bays & DeMali, 2017). El dominio “cabeza” se organiza en un arreglo plano trilobulado asociado con un tallo corto, que comprende los dominios D1-D3 y una pequeña porción de D4. La cola también es globular, comprende el dominio D5 y contiene 5 α -hélices antiparalelas (H1–H5) (Winkler et al., 1996; Bakolitsa et al., 2004).

La vinculina fue originalmente aislada en 1979 a partir de músculo liso de ave, siendo una molécula que co-purificaba con α -actinina (Geiger et al., 1979). La caracterización inicial, reveló que la proteína se localizaba en sitios especializados, donde los haces de microfilamentos interaccionaban con la membrana celular (Burrige & Feramisco, 1980; Geiger et al., 1980).

Por lo tanto, la proteína fue nombrada vinculina, proveniente del término latín *vinculum*, que significa la unión o unidad.

En el músculo cardíaco, la vinculina es componente de complejos de adhesión asociados a la membrana que unen tanto células adyacentes (interacciones célula-célula) como células a la MEC circundante (interacciones célula-MEC) (Danowski et al., 1992). Se localiza en las FA de los DI (Kostin et al., 1998-a; Wu et al., 2010), además de haberse descrito como la principal proteína de los costámeros del sarcolema lateral (Craig & Pardo, 1983; Pardo et al., 1983-a; Wu et al., 2010).

Desde la caracterización inicial de la vinculina, se han realizado muchos estudios que analizan la función de esta proteína en el músculo estriado. Se sabe que está involucrada en el enlace mecánico del citoesqueleto de actina al sarcolema, y existe evidencia que sugiere que la vinculina tiene un rol crítico en la regulación del acoplamiento o *clustering* de las integrinas (Humphries et al., 2007), la generación de fuerza y el fortalecimiento de la adherencia celular (Peng et al., 2011). Se ha demostrado que la vinculina y los complejos que la contienen son esenciales para las respuestas de estrés hemodinámico (Xu et al., 1998; Zemljic-Harpf et al., 2004), siendo importante para el normal funcionamiento del corazón (Peter et al., 2011).

La vinculina no tiene actividad enzimática, por lo tanto, su función está regida por interacciones proteína-proteína altamente reguladas, en parte por cambios conformacionales. La proteína existe en dos conformaciones (figura 8): una conformación auto-inhibida o inactiva, en la cual los sitios de unión para una cantidad de ligandos se encuentran enmascarados, y una conformación abierta o activa en la cual los sitios de unión se encuentran expuestos (Ziegler et al., 2006; Peng et al., 2011), permitiendo que la misma interaccione con una variedad de otras proteínas citoesqueléticas (Humphries et al., 2007).

El proceso de activación es crucial para que se logre la interacción directa con proteínas como talina (Burrige & Mangeat, 1984), α -catenina, β -catenina (Hazan et al., 1997), α -actinina (Geiger, 1979), en el dominio N-terminal; ponsina, vinexina, y fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP), en la región bisagra; F-actina, fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato, protein-quinasa C α (PKC α), raver1 y paxillina en el dominio C-terminal (Ziegler et al., 2006). Además, este dominio contiene dos residuos serina altamente fosforilables por PKC (Peng et al., 2011). Solamente la talina se une a la vinculina exclusivamente en adhesiones célula-MEC (Burrige and Mangeat, 1984), mientras que las α - y β -cateninas se unen exclusivamente en FA (Geiger, 1979; Hazan et al., 1997).

Se ha visto que algunas moléculas como fosfolípidos, talina y α -actinina permiten la activación de la vinculina, desenmascarando sitios de unión (Ziegler et al., 2006).

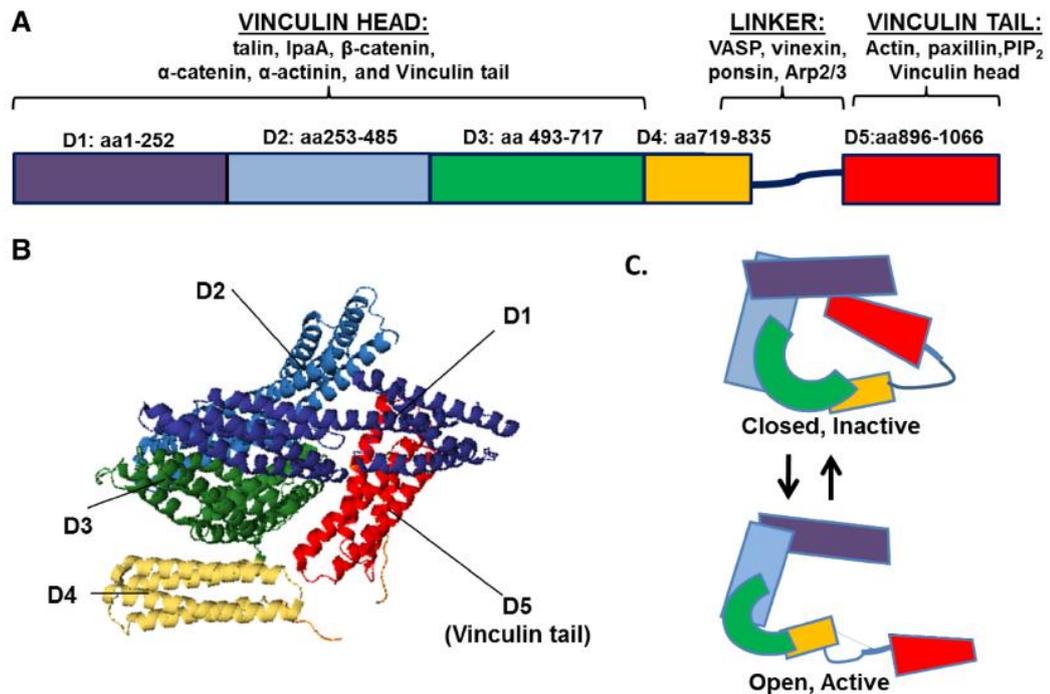


Figura 8. (A) Estructura de la vinculina, compuesta de α -hélices antiparalelas organizados en 5 dominios. Dominios D1–D3 y pequeña porción de D4 conforman la región “cabeza”, mientras que D5 conforma la región “cola”. Se mapeó los sitios de unión para varias proteínas. (B) Modelo de la estructura 3D de la vinculina humana en su forma auto-inhibida, donde D1 interacciona con D5. (C) Esquema de la vinculina en su forma cerrada (inactiva o autoinhibida) y abierta (activa). Tomado de Bays & DeMali, 2017.

Se ha establecido un rol para la vinculina en la regulación de muchos aspectos de la adhesión célula-MEC, ensamblado, y recambio de las adhesiones focales, así como la transmisión de fuerza por estas estructuras. También está emergiendo un rol como reguladora funcional de las adhesiones intercelulares mediadas por las cadherinas (Peng et al., 2011).

Estudios en modelos de ratones han demostrado que la vinculina es esencial para mediar la respuesta al estrés mecánico en el corazón (Xu et

al., 1998; Zemljic-Harpf et al., 2004). Por otro lado, se ha reportado que interacciones combinatorias de la proteína vinculina con otras proteínas sugiere la existencia de roles tanto estructurales como de señalización (Humphries et al., 2007). Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado si la vinculina presente en los cardiomiocitos del VI se ve afectada por la DM, o si está implicada en la miocardiopatía diabética.

HIPÓTESIS

Dado que los costámeros y DI son sitios mecanotransductores esenciales en los cardiomiocitos para lograr que el corazón funcione normalmente como sincitio funcional, sumado a que patologías como la DM afectan la nanomecánica de los cardiomiocitos del VI, así como la MEC que se relaciona con éstos, se plantea la siguiente hipótesis:

Proteínas que forman parte de sitios de señalización como las del sistema integrina-talina-vinculina (costámeros) y las FA (DI), entre ellas la vinculina, se ven afectadas en su expresión y localización celular en el corazón de un modelo murino de DM1, contribuyendo a la disfunción en la miocardiopatía diabética.

OBJETIVOS

Objetivo general

El trabajo tiene por objetivo profundizar el estudio en el corazón diabético en un modelo murino de DM1, e identificar a nivel molecular alteraciones producidas por la patología en proteínas del citoesqueleto del propio cardiomiocito, que puedan explicar los cambios intrínsecos ya detectados en la nanomecánica de los cardiomiocitos diabéticos.

Objetivos específicos

- Identificar si la expresión de la vinculina (proteína integrante del costámero y las FA), se ve afectada en muestras obtenidas de VI de corazones provenientes de ratones diabéticos, con respecto a muestras obtenidas de ratones control de la misma edad.
- Identificar si la distribución a nivel celular de la vinculina se ve modificada en cortes histológicos de VI de corazones provenientes de ratones diabéticos, con respecto a aquellos obtenidos de ratones control de la misma edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se utilizaron muestras obtenidas en el marco del proyecto FCE_1_2017_1_136045 “Bases Moleculares de los Cambios Nanomecánicos Intrínsecos Detectados en Cardiomiocitos Diabéticos”, el cual se está desarrollando desde el 2018, en el Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Modelo de trabajo

Se utilizaron ratones CD1 endocriados, machos adultos jóvenes. Luego de los 21 días del nacimiento se realizó el destete, y se los mantuvo en un ambiente controlado, con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 40-70% de humedad, con libre acceso al agua y alimento, además de realizarles un cambio de cama diario.

El protocolo de experimentación fue aprobado por la Comisión de Ética Animal del IIBCE, de acuerdo con las reglamentaciones nacionales de manipulación de animales.

Inducción de DM1 y creación de grupos

Para inducir la DM1, a los 1,5 meses de edad, un grupo de ratones fue inyectado vía intraperitoneal con una única dosis (150 mg/kg) de una solución de STZ (Sigma, St Louis, MO, USA) resuspendida en buffer citrato salino (pH 4,5), mientras que los animales control fueron inyectados solamente con buffer citrato salino. Para la creación de los grupos, los animales fueron pareados según el peso corporal. La glicemia de los animales fue medida de manera periódica utilizando *ACCU-CHECK Compact Plus System* (Roche Diagnostics, Indianápolis, USA). La medida de la glicemia no fue realizada en ayunas. Los animales inyectados con STZ, con valores de glicemia mayor a 250 mg/dL fueron considerados diabéticos. A los tres meses de tratamiento (4,5 meses de edad), previo al sacrificio de los ratones, se volvió a medir la glicemia para constatar la condición diabética.

Obtención de muestras

Se realizó eutanasia de los animales por dislocación cervical. Se extrajo el corazón y se fraccionó el VI (región del corazón donde es más notoria la miocardiopatía), obteniéndose las muestras para los diferentes experimentos. Se realizó un procesamiento diferencial de las muestras de VI según el experimento a realizar.

Preparación de muestras para Western blot

Se llevó a cabo el estudio de la expresión de la proteína vinculina en homogeneizados de VI obtenidos de los dos grupos (diabético y control). Las muestras de VI utilizadas provinieron de 3 ratones de cada grupo y fueron congeladas a -80°C rápidamente luego de extraídas, hasta el momento de su utilización.

Homogeneizados de VI

Para que ocurra la liberación del contenido celular y solubilizar las proteínas, se realizaron homogeneizados de las muestras en buffer de lisis (BL), en una relación 1.5 mL BL/50 mg corazón. El BL contiene: HEPES 20 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, Tritón X-100 1%, glicerol 10%, fluoruro de sodio 10 mM, PMSF 1 mM (inhibidor de proteasas de serina y cisteína), ortovanadato de sodio 1 mM (inhibidor de fosfatasas de tirosinas) y cóctel inhibidor de proteasas 1X (SIGMA-ALDRICH Co, St Louis, MO, USA).

Para la homogeneización de las muestras se utilizaron homogeneizadores de vidrio (Wheaton, Millville, NJ, USA). Se centrifugó el homogeneizado a 15000 g por 5 minutos, transfiriendo el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y descartando el pellet. Por último, se sonicó el sobrenadante 2 veces durante 3 segundos con *% duty cycle 40* y *output control - micro tip limit 4* (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole Parmer Instrument Co, Chicago, IL, USA).

Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas de cada homogeneizado fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para esto se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) a partir de una solución *stock* de concentración 0,1 mg/mL (tabla 1). Para cada uno de los homogeneizados se realizó, en primer lugar, una dilución 1/10 para obtener a partir de ésta, las siguientes diluciones: 1/500, 1/1000 y 1/2000 (tabla 2).

Tanto a las muestras de la curva de calibración como a las diluciones de las muestras de concentración a determinar, se les agregó 200 µL de reactivo de Bradford, completando un volumen final de 1 mL con agua miliQ. Se dejó reaccionar mínimo 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-V -ZUZI MOD. 4418/2. Todo fue realizado por triplicado. A partir de la ecuación de la recta, y luego de multiplicar por el factor de dilución correspondiente, se obtuvo un valor promedio de concentración proteica para cada muestra.

Tabla 1. Cuantificación de proteínas totales por método de Bradford: volúmenes a tomar para la realización de la curva de calibración.

Concentración BSA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen BSA 0,1 mg/mL (μL)	Volumen H ₂ O (μL)	Volumen Reactivo de Bradford (μL)	Volumen final (μL)
0	0	800	200	1000
1	10	790	200	1000
2	20	780	200	1000
3	30	770	200	1000
4	40	760	200	1000
5	50	750	200	1000
6	60	740	200	1000

Tabla 2. Cuantificación de proteínas totales por método de Bradford: volúmenes a tomar para obtener diferentes diluciones de cada homogeneizado.

Dilución	Volumen dilución 1/10 (μL)	Volumen H ₂ O (μL)	Volumen Reactivo de Bradford (μL)	Volumen final (μL)
1/500	20	780	200	1000
1/1000	10	790	200	1000
1/2000	5	795	200	1000

SDS-PAGE

A cada homogeneizado se le agregó buffer Laemmli 5x en una relación 1 parte buffer Laemmli/4 partes homogeneizado. El buffer Laemmli 5x contiene: Tris 0,3125 M, SDS 10%, β -mercaptoetanol 25%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.1%.

Se realizó una electroforesis desnaturalizante y en condiciones reductoras, en gel de poliacrilamida 7%, a 100 V. El buffer de corrida contiene: Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%.

Se sembraron 50 µg de proteínas totales de cada una de las muestras (controles y diabéticos). Como referencia de los pesos moleculares se utilizó el marcador estándar de peso molecular *Precision Plus Protein WesternC Standards* (161-0376, Bio-Rad Laboratories, Inc). El orden de siembra fue el siguiente: control 1, control 2, control 3, diabético 1, diabético 2, diabético 3, estándar de peso molecular.

Transferencia e incubación con anticuerpos

Las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) *Immobilon Transfer Membranes* (Millipore Co, Bedford, MA, USA), a la cual previamente se la trató con metanol por 1-2 minutos, y luego con buffer de transferencia por 5 minutos. Se armó el *sandwich* sumergido en buffer de transferencia, en orden de polo negativo a polo positivo: esponja/papel de filtro/gel/membrana/papel de filtro/esponja, evitando que queden burbujas entre el gel y la membrana. Se colocó en el dispositivo, y se transfirió 1 hora y 15 minutos a 4°C y 350 mA. El buffer de transferencia contiene: Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, metanol 20%.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue bloqueada con buffer Tris salino 1x con Tween 0.1% (TBS-T) + leche descremada 5% por 1 hora a temperatura ambiente (TA) y en agitación. La membrana fue posteriormente incubada con el anticuerpo correspondiente diluido en TBS-T, *overnight* a 4°C y en agitación constante. El control de carga elegido, gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la proteína de interés (vinculina), tienen pesos moleculares muy diferentes (37 y 117 kDa respectivamente). Es por esto que la membrana fue dividida en 2 tomando como punto de corte las bandas del peso molecular de 75 y 100 kDa. La parte superior de la membrana, que contiene los estándares de mayor peso molecular, fue incubada con anticuerpo primario monoclonal, específico para vinculina (Ab129002) en una dilución 1/2500, mientras que la parte inferior fue incubada con anticuerpo primario monoclonal específico para GAPDH (Ab181602) en una dilución 1/5000. Posteriormente se incubaron ambas partes de la membrana con el anticuerpo secundario Alexa Fluor488 (Ab150077) en una dilución 1/2000, durante una hora a TA y en agitación. Se realizaron lavados con TBS-T de 10 minutos entre cada paso, a TA y en agitación. Se realizó como control negativo, la incubación solamente con anticuerpo secundario de una membrana a la cual se había realizado la transferencia de las proteínas desde el gel. Para todos los experimentos, desde la incubación con anticuerpo secundario en adelante, el procedimiento se realizó enteramente en oscuridad.

Cuantificación de vinculina

La detección de las bandas del *Western blot* se realizó por fluorescencia utilizando *High Performance Luminescent Image Analyser* (FLA-9000 Fujifilm), donde la membrana fue excitada a 488 nm. La cuantificación fue llevada a cabo por densitometría utilizando el programa *Image J* (NIH, USA). Los valores obtenidos fueron normalizados con los del control de carga. Se analizaron 3 animales diferentes de cada grupo, por triplicado.

Preparación de muestras para cortes histológicos

Se fijaron las muestras de VI recién extraído con paraformaldehído 4% en buffer fosfato salino (PBS) 1x, durante 1 hora a TA y en agitación. Se realizaron lavados de 5 minutos con PBS. Luego se llevó a cabo la crioprotección de la muestra con sacarosa 15% en PBS, *overnight* a 4°C, seguido de sacarosa 30%, también *overnight* a 4°C. Posteriormente se realizó la infiltración en medio de congelamiento con sacarosa 30% (relación 1:1) durante 1 hora a TA y en agitación, y luego en medio de inclusión puro (0201 08926, Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Alemania) durante 1 hora, en iguales condiciones. Una vez realizado el tratamiento, las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su utilización. A partir de dichas muestras se realizaron cortes de 15 µm en criostato a -20°C en suelo ECO modelo MEV (SLEE Technical GmbH, Mainz,

Alemania) y se dispusieron los cortes en portaobjetos tratados previamente con polilisina.

Inmunohistoquímica

Se delimitaron los cortes con el lápiz *Super Pap Pen Liquid Blocker for IHC* (SPM0928, IHCWORLD), se lavaron con PBS 1x + glicina 100 mM y se prosiguió a permeabilizar por 10 minutos con PBS + Tritón X-100 0.2%. Luego se realizó el bloqueo durante 30 minutos con PBS + BSA 1% + glicina, a TA. La incubación con anticuerpo primario específico para vinculina (mismo al utilizado en *Western blot*) en una dilución 1/75, se realizó *overnight* a 4°C en cámara húmeda y luego se incubó en cámara húmeda y a TA por 1 hora, con anticuerpo secundario DyLight650 (Ab96922) en una dilución 1/200. Luego de cada incubación se realizaron lavados de 3 minutos con PBS. En todos los experimentos se llevó a cabo un control negativo incubando sólo con anticuerpo secundario. Además, se realizó la marcación de los núcleos incubando con DAPI 1 µg/mL en PBS 50% + glicerol 50%. Por último, se montó el preparado. Desde la incubación con anticuerpo secundario en adelante, el procedimiento se realizó enteramente en oscuridad.

Microscopía Láser Confocal

Las imágenes fueron adquiridas con objetivos 20x (aire; AN=0,5) y 40x (aire; AN=0,95), excitando la muestra a la longitud de onda de 640 nm para la detección de vinculina y a 405 nm para detectar DAPI, mediante el microscopio láser confocal ZEISS modelo LSM 800 – AiryScan con cámara de Epifluorescencia Color 506. También se obtuvieron imágenes de las fibras por luz transmitida. Se utilizaron 3 animales de cada condición (controles y diabéticos). Se analizaron en su totalidad, un mínimo de 5 cortes de cada muestra, por experimento, de un total de 3 experimentos.

Cuantificación de fluorescencia

Se realizaron *stacks* de imágenes, de distintos planos de cada fibra a 40x, a intervalos de 1 μ m. Se trató de obtener imágenes de fibras que estuvieran lo más enteras y longitudinales posible. Se consideró que una fibra estaba compuesta por la unión en serie, o de manera longitudinal, de varios cardiomiocitos.

Una vez obtenidos los *stacks*, se utilizó el programa *Image J* (NIH, USA) para el procesamiento de imágenes y la cuantificación tridimensional de fluorescencia: se realizó un *Z Project* para cada *stack* de imágenes, donde se sumó la fluorescencia de todos los planos del *stack* y se obtuvo una sola imagen con la fluorescencia total de cada fibra. Luego, se duplicó la imagen. En el duplicado, se realizó una umbralización de la imagen, de

manera que el programa reconociera solamente aquellos píxeles donde hubiera fluorescencia. Además, se seleccionó el contorno de la fibra, para cuantificar la fluorescencia que estuviera dentro del área de la fibra y a su vez, dentro del umbral aplicado anteriormente. Se cuantificó la fluorescencia total de cada fibra, redirigiendo las mediciones al duplicado de la imagen que no fue umbralizada (*Z project* original), de manera de no perder información del valor de los píxeles. Se dividió la fluorescencia total entre el volumen, es decir el área de la fibra x la cantidad de stacks. De esta manera se obtuvo un valor de intensidad de fluorescencia/ μm^3 para cada fibra.

Se realizó el procedimiento descrito en un promedio de 15 fibras por ratón y por experimento.

Las imágenes fueron obtenidas teniendo en cuenta aplicar la misma exposición para cada una de las capturas (obtenido en base al *background* observado en el control negativo).

Disposición espacial de la vinculina

Se adquirieron imágenes a 20x, del plano medio de fibras longitudinales para estudiar la distribución de la señal de fluorescencia en cada fibra. Se realizó un seteo manual de los planos superficiales de las fibras (inferior y superior) y luego se posicionó de manera automática en el plano medio.

Por un lado, se contó la cantidad de DI por campo en los que se observó fluorescencia. Todas las imágenes consideradas para esta cuantificación fueron de campos completamente cubiertos por tejido a un aumento de 20X. Se analizó, en promedio, 15 imágenes por ratón.

Por otro lado, se realizó una comparación descriptiva, en las mismas imágenes, de la señal de fluorescencia a nivel del sarcolema lateral. Esto último también fue realizado en el plano superficial del sarcolema lateral, a un aumento de 40x.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa estadístico PAST. Se aplicó el test T de Student para muestras normales.

Los resultados fueron expresados como la media \pm el desvío estándar (SD).

Se consideró diferencias significativas con un p-valor $< 0,05$.

RESULTADOS

Caracterización de los ratones utilizados

En todos los animales, previo a la inyección de STZ, los niveles de glicemia fueron en promedio de 155 ± 27 mg/dL. Luego de 3 semanas de la inyección, el nivel de glicemia de los ratones inyectados con STZ fue mayor que en los controles. A las 12 semanas, previo a la eutanasia, se detectó que los valores de alta glicemia se mantuvieron en los ratones pertenecientes al grupo diabético, con una media de 590 ± 20 mg/dL, mientras que los controles se encontraban dentro del rango normal, con una media de 140 ± 20 mg/dL, obteniendo una diferencia significativa en el nivel de glicemia entre ambos grupos ($p=0.0004$). En la figura 9 se muestra un gráfico de los niveles de glicemia de todos los animales previo a la inyección con buffer citrato salino o STZ, a los 1,5 meses de edad, y de los grupos control y diabético previo a la eutanasia, luego de 3 meses post-inyección.

Los ratones inyectados presentaron síntomas característicos de la patología: poliuria, polidipsia, polifagia.

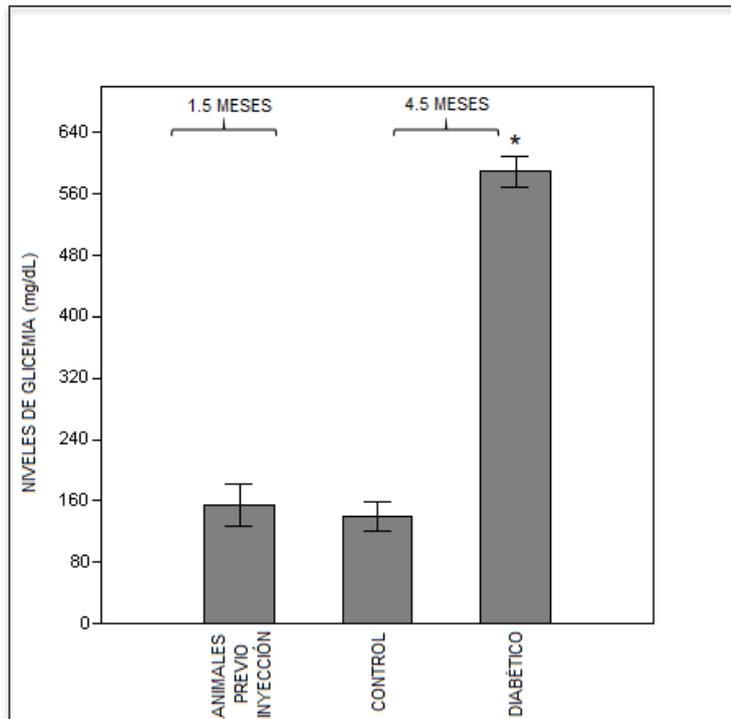


Figura 9. Niveles de glicemia (mg/dL) de animales de 1,5 meses de edad, previo a la inyección con buffer citrato salino/estrepozotocina, y de grupos control y diabético a los 4,5 meses de edad. Previo a ser inyectados, los niveles de glicemia de todos los ratones (n=6) fue de 155 ± 27 mg/dL. Luego de tres meses post-inyección, el nivel de glicemia del grupo control (n=3) fue de 140 ± 20 mg/dL, mientras que el del grupo diabético (n=3) fue de 590 ± 20 mg/dL. * $p < 0.001$.

Expresión de vinculina

Cuantificación de proteínas totales

En la tabla 3 se muestran los valores de absorbancia obtenidos en los triplicados tanto de la curva de calibración como de los homogeneizados.

Tabla 3. Valores de absorbancia obtenidos para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford, tanto para la curva de calibración como para cada una de las muestras a cuantificar.

	Concentración de BSA (µg/mL)	Absorbancia 1 (595 nm)	Absorbancia 2 (595 nm)	Absorbancia 3 (595 nm)	Absorbancia Promedio	Abs Prom - Abs prom Blanco
Curva de calibración	0 (Blanco)	0.208	0.221	0.220	0.216	0
	1	0.249	0.248	0.246	0.248	0.031
	2	0.276	0.287	0.290	0.284	0.068
	3	0.331	0.321	0.328	0.327	0.110
	4	0.358	0.362	0.355	0.358	0.142
	5	0.394	0.384	0.393	0.390	0.174
	6	0.431	0.433	0.431	0.432	0.215
Muestra	Dilución					
C1	1/2000	0.292	0.291	0.293	0.292	0.076
	1/1000	0.335	0.346	0.339	0.340	0.124
	1/500	0.417	0.420	0.421	0.419	0.203
C2	1/2000	0.291	0.299	0.299	0.296	0.080
	1/1000	0.334	0.339	0.344	0.339	0.123
	1/500	0.430	0.422	0.425	0.426	0.210
C3	1/2000	0.294	0.295	0.297	0.295	0.079
	1/1000	0.343	0.344	0.344	0.344	0.128
	1/500	0.419	0.425	0.427	0.424	0.208
D1	1/2000	0.293	0.295	0.297	0.295	0.079
	1/1000	0.347	0.348	0.342	0.346	0.130
	1/500	0.427	0.431	0.430	0.429	0.213
D2	1/2000	0.285	0.292	0.294	0.290	0.074
	1/1000	0.329	0.336	0.333	0.333	0.117
	1/500	0.407	0.417	0.413	0.412	0.196
D3	1/2000	0.288	0.298	0.290	0.292	0.076
	1/1000	0.329	0.334	0.338	0.334	0.118
	1/500	0.416	0.415	0.410	0.414	0.198

En la figura 10 se muestra la curva de calibración; la ecuación de la recta obtenida fue $y=0.0359x-0.0017$ con un $R^2=0.9984$.

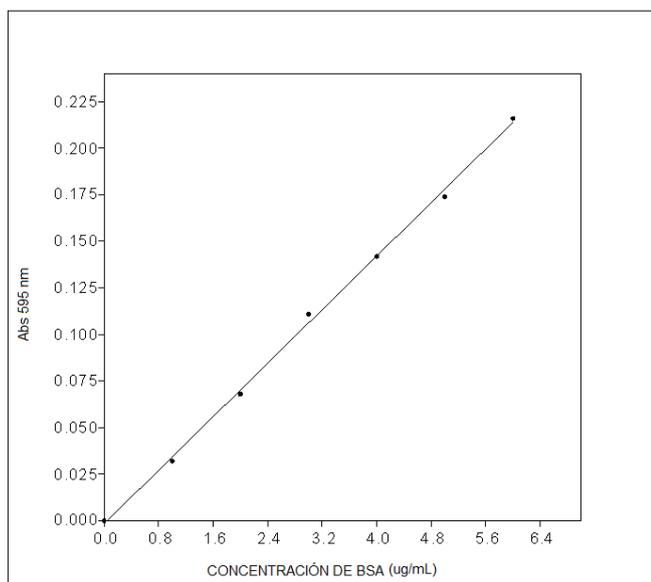


Figura 10. Curva de calibración con BSA. Absorbancia a 595 nm en función de la concentración de BSA (µg/mL). La ecuación de la recta obtenida fue $y=0.0359x-0.0017$ con un $R^2=0.9984$.

La concentración promedio de proteínas totales de cada homogeneizado, como se muestra en la tabla 4, fue: 3.56, 3.66 y 3.68 mg/mL para las muestras correspondientes al grupo control, y 3.72, 3.43 y 3.48 mg/mL para aquellas correspondientes al grupo diabético.

Tabla 4. Concentración de proteínas totales (mg/mL) obtenida para cada muestra por el método de Bradford.

Muestra	Concentración proteica (mg/mL)	Muestra	Concentración proteica (mg/mL)
C1	3,56	D1	3,72
C2	3,66	D2	3,43
C3	3,68	D3	3,48

Luego de agregar 1 parte de buffer Laemmli 5x (200 uL) a 4 partes de homogeneizado (800 uL), se recalculó las concentraciones de las muestras para la realización de la SDS-PAGE, dando: 2.85, 2.93 y 2.94 mg/mL para las muestras correspondientes al grupo control, y 2.97, 2.74 y 2.78 mg/mL para aquellas correspondientes al grupo diabético.

Western blot

La figura 11A muestra una imagen representativa de los *Western blot* obtenidos para las muestras de ambos grupos (control y diabético). Por otro lado, en la figura 11B se muestran los niveles de expresión relativa de la proteína vinculina, en unidades arbitrarias, en relación al control de carga (GAPDH), para ambos grupos. El análisis estadístico de estos resultados, constató que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Cabe destacar que no se detectaron bandas en la membrana incubada solamente con anticuerpo secundario.

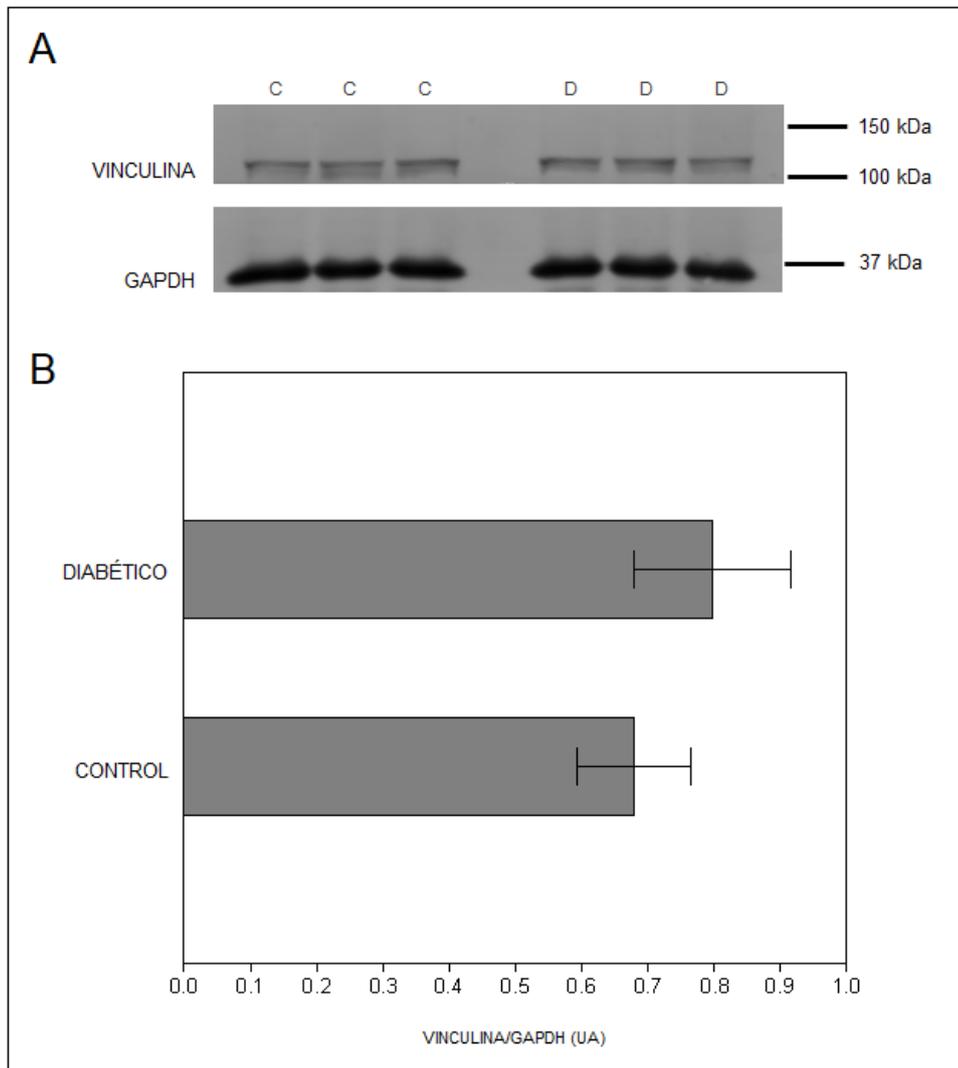


Figura 11. Expresión de vinculina en grupos control (n=3) y diabético (n=3): **(A)** imagen representativa de *Western blot*, **(B)** niveles relativos de expresión de vinculina (117 kDa) en relación a GAPDH (37 kDa), en ambos grupos (control y diabético), expresado en unidades arbitrarias. No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$).

Cuantificación de fluorescencia

Acorde a la cuantificación de vinculina por *Western blot*, a partir del análisis estadístico de la cuantificación tridimensional de fluorescencia en las imágenes obtenidas por Microscopía Láser Confocal, tampoco se

obtuvieron diferencias significativas al comparar los grupos control y diabético ($p>0.05$). En la figura 12 se muestra el gráfico correspondiente a la cuantificación de fluorescencia/ μm^3 en ambos grupos.

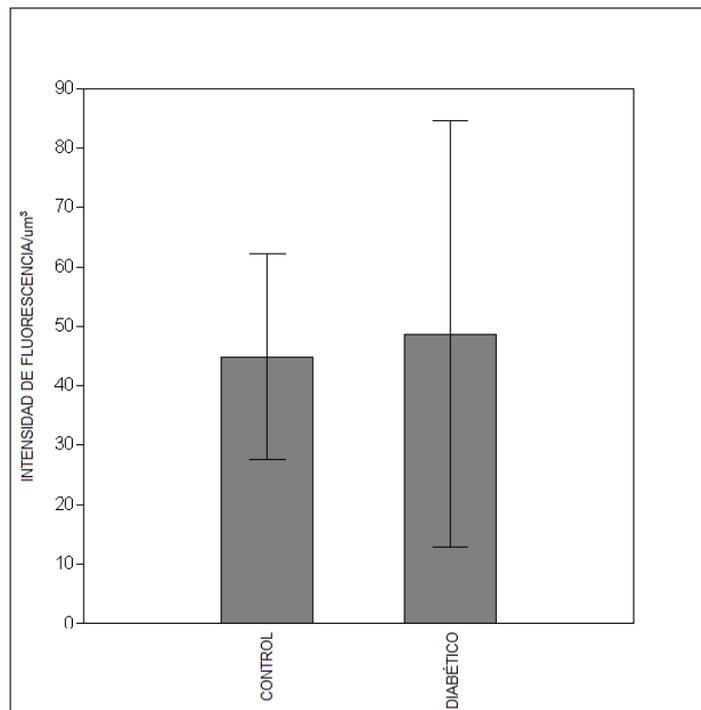


Figura 12. Cuantificación tridimensional de fluorescencia atribuible a la presencia de vinculina, en cortes histológicos de ventrículo izquierdo de ratones pertenecientes a los grupos control y diabético, expresada en unidades de intensidad de fluorescencia/ μm^3 . No se detectaron diferencias significativas ($p>0.05$).

Disposición espacial de la vinculina

Para el análisis de la localización de la proteína en estudio se verificó, en primer lugar, que hubiera ausencia de fluorescencia en los controles negativos de ambos grupos, tal como se muestra en imágenes

representativas de la figura 13. Estos cortes habían sido incubados solamente con anticuerpo secundario.

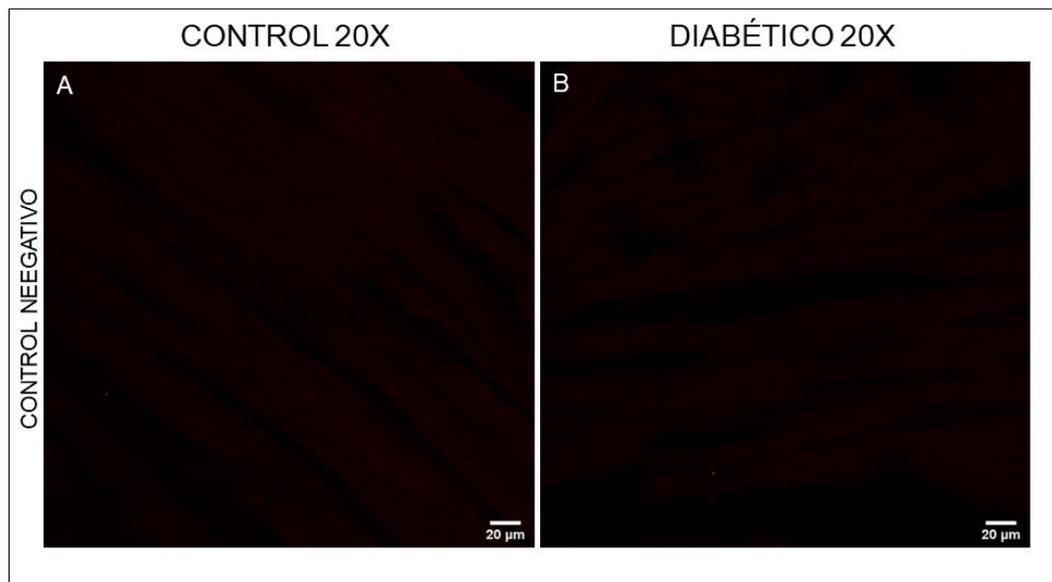


Figura 13. Imágenes representativas de Microscopía Láser Confocal con aumento 20x, de control negativo (sin anticuerpo primario) de inmunohistoquímica realizada en cortes histológicos de ventrículo izquierdo obtenidos de corazones de ratones provenientes de grupos control (A) y diabético (B), donde se observa ausencia de fluorescencia.

Luego se procedió a analizar los experimentos, incubados con anticuerpo primario y secundario. En la figura 14 se muestran imágenes representativas obtenidas en el plano medio de las fibras, a un aumento de 20x. Se examinaron varias imágenes de cada corte de VI y se analizó la ausencia o presencia de señal de fluorescencia, atribuible a la presencia de vinculina. Se pudo apreciar en ambos grupos, señal localizada a nivel del sarcolema lateral de los cardiomiocitos. Sin embargo, en los controles (figura 14A) la marca de fluorescencia se notó más restringida al contorno

de los cardiomiocitos, pudiéndose identificar la mayoría de las células de las imágenes, mientras que en los diabéticos (figura 14B) se vio una señal más difusa, y fue prácticamente imposible diferenciar individualmente cardiomiocitos que estuvieran dispuestos en serie.

Se observó, además, los cortes histológicos por luz transmitida, como se muestra en la figura 15 donde también se constató la organización de los cardiomiocitos en los controles (figura 15A) y el arreglo poco ordenado de los diabéticos (figura 15B). De hecho, en la imagen de luz transmitida, los DI fueron fácilmente identificables en los controles, y difíciles de identificar en los diabéticos (puntas de flecha).

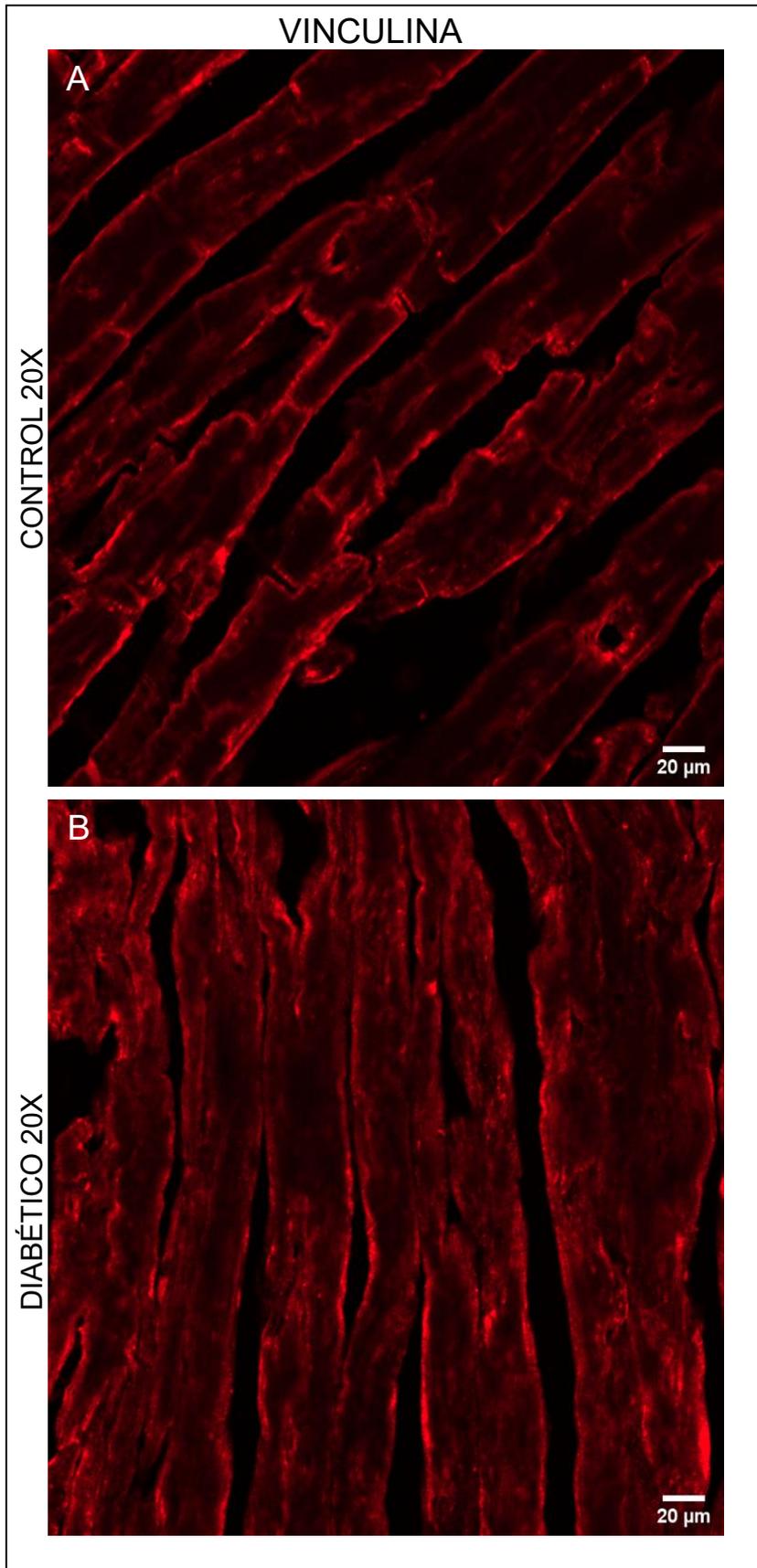


Figura 14. Imágenes representativas de Microscopía Láser Confocal con aumento 20x de cortes histológicos (plano medio) de ventrículo izquierdo obtenidos de corazones provenientes de ratones controles (**A**) y diabéticos (**B**) incubados con anticuerpo primario anti-vinculina y secundario Dylight 650.

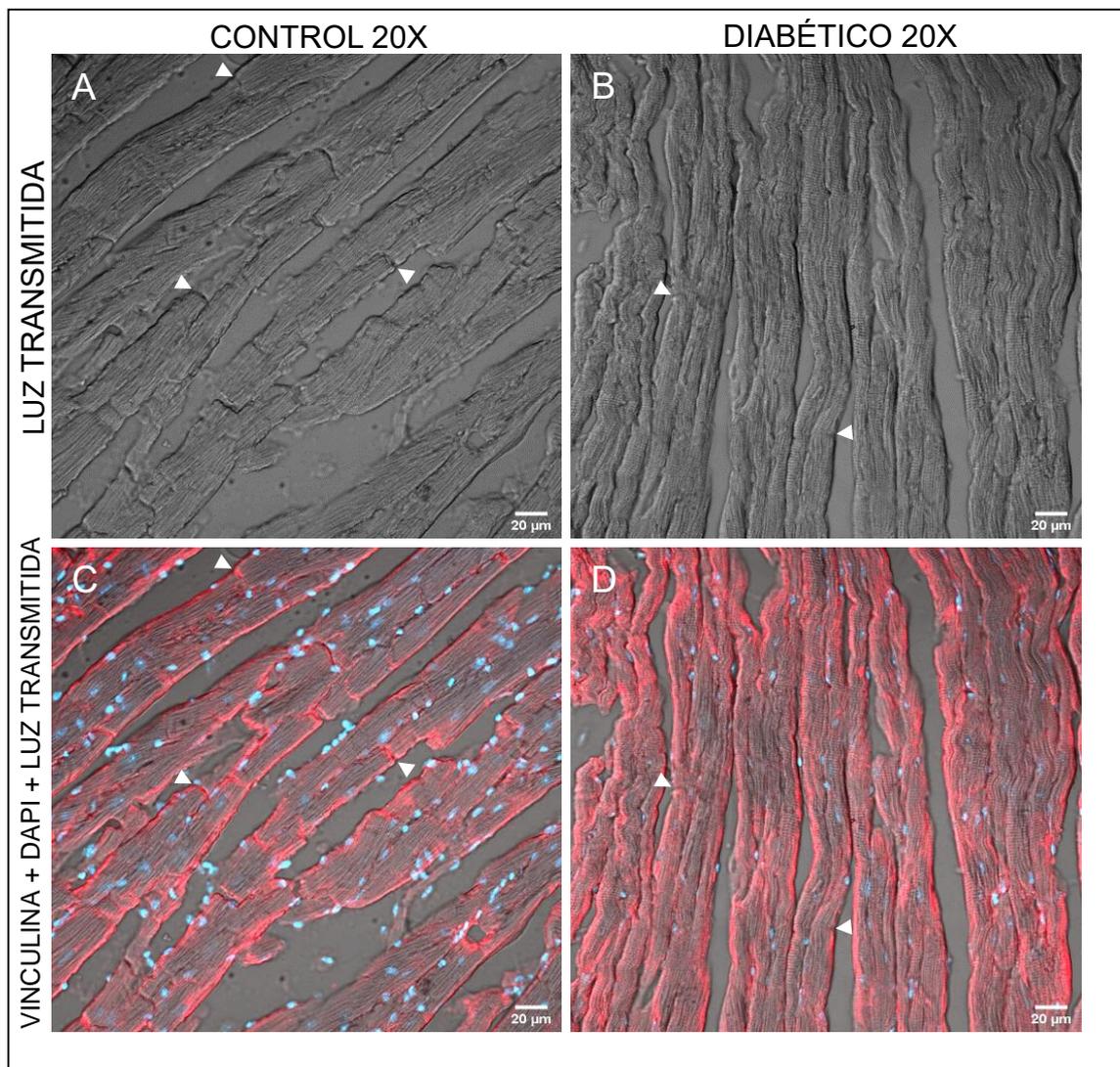


Figura 15. Imágenes representativas de Microscopía Láser Confocal con aumento 20x de cortes histológicos (plano medio) de ventrículo izquierdo obtenidos de corazones provenientes de ratones control (izquierda) y diabéticos (derecha): **(A y B)** luz transmitida, **(C y D)** vinculina + DAPI + luz transmitida. Puntas de flecha indican zona de discos intercalares.

Con respecto a la localización de la vinculina en los DI, se observó señal de fluorescencia en la mayoría de las células de todos los cortes de VI provenientes de ratones controles, mientras que en los diabéticos no se

identificó marca en prácticamente ningún DI. Es por esto que se cuantificó la cantidad de DI con fluorescencia por campo, encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0.002$) como se muestra en la figura 16.

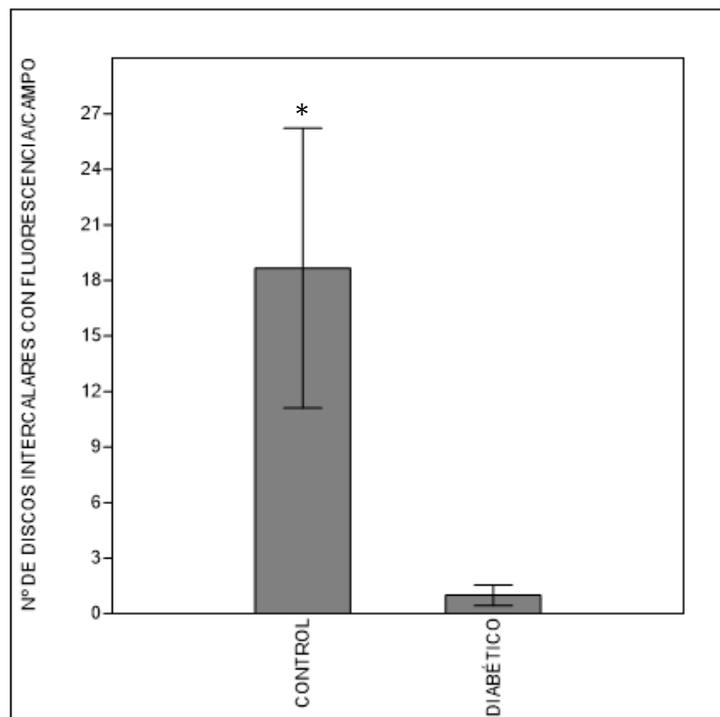


Figura 16. Cuantificación del número de discos intercalares con señal de fluorescencia por campo, en cortes histológicos de ventrículo izquierdo provenientes de ratones control y diabético, incubados con anticuerpo primario anti-vinculina y secundario Dylight 650. Se encontraron diferencias significativas. * $p<0.01$.

A un aumento de 40x se pudo apreciar lo que ya se observaba a 20X. Con respecto a aquellos cortes histológicos de VI proveniente de ratones controles (figura 17A), en un plano a nivel del sarcolema, se observó localización de vinculina en el sarcolema lateral y en los DI (punta de

flecha), mientras que en los provenientes de ratones diabéticos (figura 17B) solamente se observó a nivel del sarcolema lateral. Se identificó incluso en algunas zonas, ausencia de fluorescencia en forma de una banda oscura que coincidía con los DI, cuando era posible reconocerlos mediante luz transmitida (punta de flecha).

Al ver en más detalle el plano superficial de las fibras de ambos grupos (figuras 17C y D), se observó en la mayoría de las imágenes un patrón organizado en “rejilla” o punteado, donde se identificó puntos con mayor intensidad de fluorescencia (flechas) correspondiente a la localización de los costámeros.

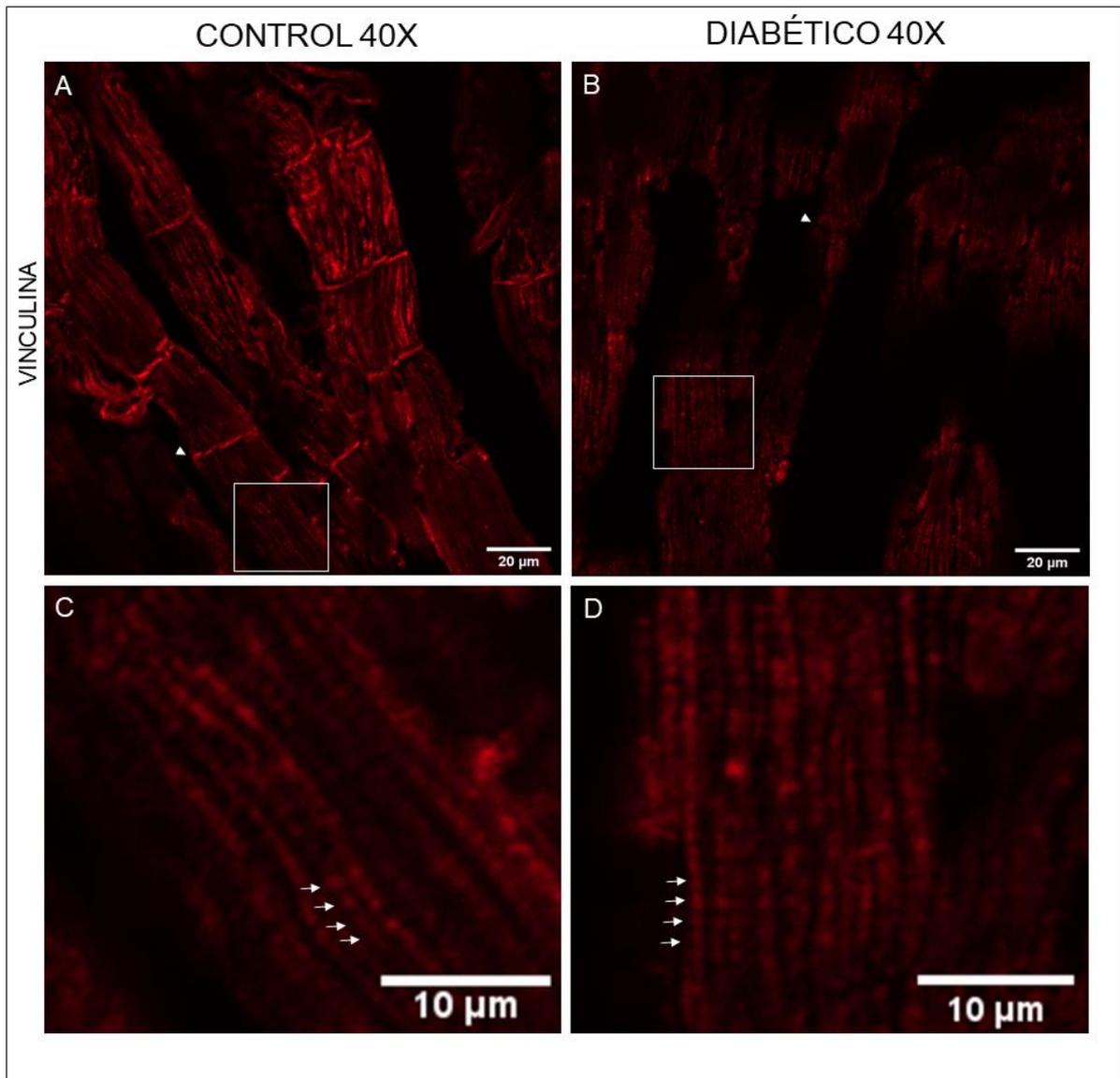


Figura 17. Imágenes representativas de Microscopía Láser Confocal con aumento 40x de plano superficial de cortes histológicos de ventrículo izquierdo, obtenidos de corazones provenientes de ratones control (izquierda) y diabéticos (derecha): **(A y B)** vinculina, **(C y D)** zonas con mayor detalle, donde se observa patrón en rejilla. Puntas de flecha indican zona de discos intercalares; flechas indican localización de costámeros.

En planos más internos (figura 18), solamente se vio fluorescencia en el contorno (sarcolema lateral y DI) de los cardiomiocitos controles, así como en el sarcolema lateral de los diabéticos.

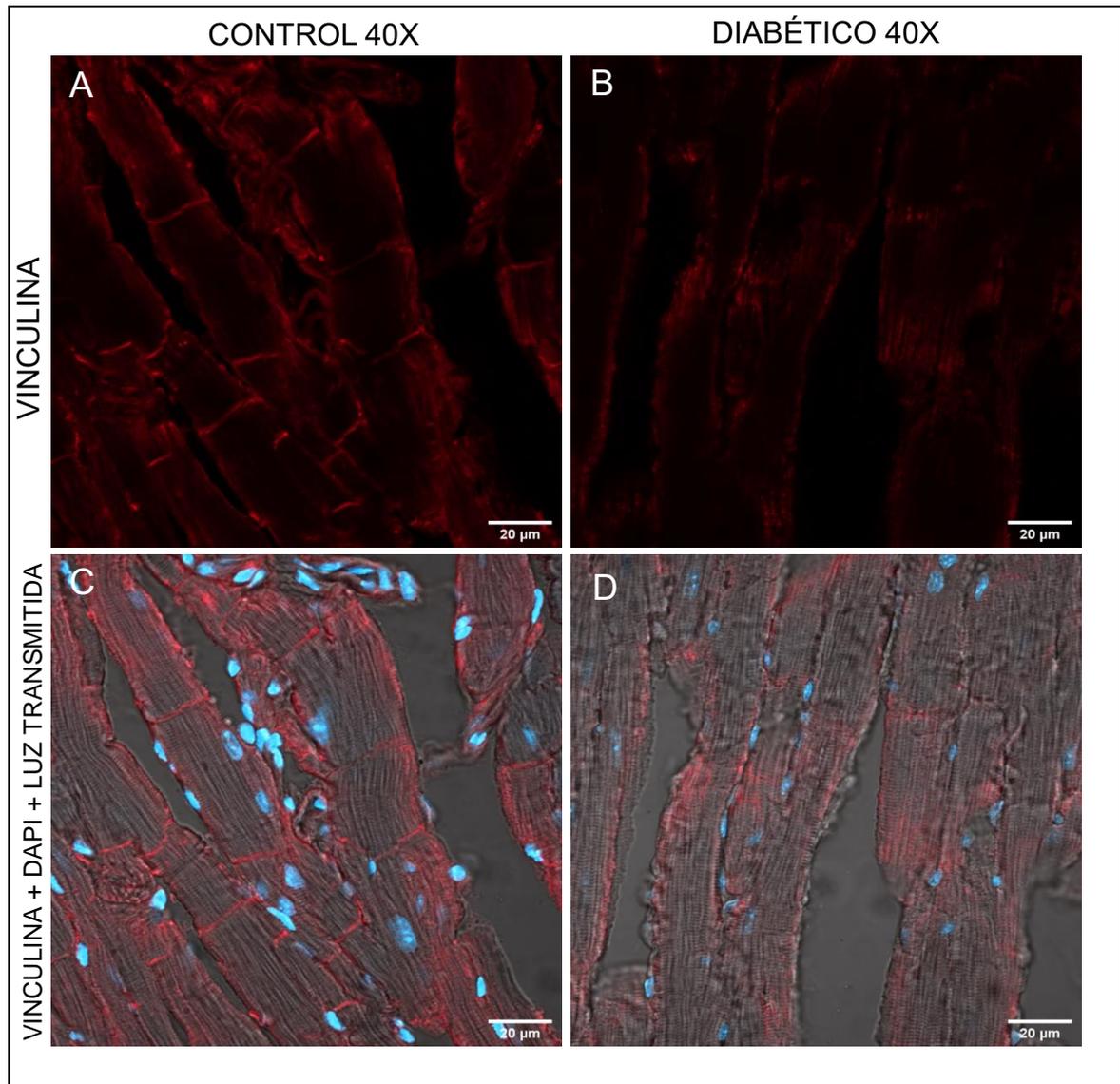


Figura 18. Imágenes representativas de Microscopía Láser Confocal con aumento 40x de plano medio, de cortes histológicos de ventrículo izquierdo obtenidos de corazones provenientes de ratones control (izquierda) y diabéticos (derecha): (A y B) vinculina, (C y D) vinculina + DAPI + luz transmitida.

DISCUSIÓN

Niveles de glicemia

La inducción de DM1 mediante la administración de STZ es un modelo animal bien caracterizado. La STZ es una toxina que genera necrosis selectiva de las células β del páncreas, ocasionando un estado de insuficiencia de insulina. La dosis de STZ utilizada se basó en reportes previos de estudios en ratones, donde utilizaban 150-200 mg/kg (Trost et al., 2002; Shiomi et al., 2003; Boudina & Abel, 2007; Sulaiman et al., 2010; Benech et al., 2014). En este estudio, todos los animales inyectados con STZ mostraron niveles altos de glucosa en la sangre y desarrollaron síntomas severos de diabetes, como poliuria, polidipsia y polifagia. Asimismo, al momento de la eutanasia se comprobó que efectivamente los animales de cada grupo tuvieron niveles de glicemia correspondientes a su condición.

Miocardopatía diabética

Un número creciente de investigaciones provee evidencia de que la resistencia a la insulina y la hiperglicemia, altera procesos intracelulares de los cardiomiocitos, responsables de la iniciación y regulación de la contracción cardíaca, y la generación de la fuerza latido a latido (Dhalla et

al., 1998), contribuyendo al desarrollo de la miocardiopatía diabética (Murarka & Movahed, 2010).

Dicha cardiopatía provoca una alteración de la relajación miocárdica y un aumento en la rigidez del VI, causando una disminución en la fracción de eyección del VI (Poornima et al., 2006; Murarka & Movahed, 2010). No obstante, los mecanismos subyacentes al desarrollo de la miocardiopatía diabética son poco conocidos.

En estudios con el mismo modelo de DM1, se ha reportado alteraciones funcionales y estructurales del músculo cardíaco (Trost et al., 2002; Shiomi et al., 2003; Nemoto et al., 2006; Boudina & Abel, 2007; Sulaiman et al., 2010; Benech, et al., 2014). Además, estudios previos reportaron que el exceso de fibrosis y la deposición de productos finales de glicación avanzada (AGEs) contribuyen al aumento de la rigidez del miocardio en la DM (Berg et al., 1999; Borbély et al., 2005; van Heerebeek et al., 2008).

Sin embargo, la alteración en las propiedades mecánicas del tejido cardiovascular en la DM no es únicamente atribuible a cambios en la composición proteica de la MEC, la organización y la glicación, sino que cambios en las propiedades mecánicas intrínsecas de las células también contribuyen de manera significativa (Meininger, 2014). Además de una MEC normalmente estructurada y funcional, un tejido requiere para funcionar de manera habitual, un relacionamiento adecuado entre las

células que lo componen y su citoesqueleto con esa MEC, para que la fuerza sea detectada y transmitida (Meininger, 2014). En relación con esto, se ha propuesto que el aumento de la tensión en reposo observado en cardiomiocitos diabéticos sería un factor importante que contribuye al incremento de la rigidez del VI, y se lo ha relacionado con cambios mecánicos intrínsecos que pueden estar ocurriendo en los cardiomiocitos (Benech et al., 2015).

La mecanotransducción es un componente importante de la señalización cardíaca, mediante el cual las células musculares individuales responden a fuerzas mecánicas aplicadas externamente, así como generan grandes cargas internas (Janostiak et al., 2014). La investigación sobre la mecanotransducción en el corazón normal y enfermo está dirigida a dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales las estructuras miocárdicas detectan las cargas físicas y las transforman en señales bioquímicas para alterar la expresión génica y modificar la estructura y función celular (Heineke & Molkentin, 2006). La proteína vinculina forma parte de sitios de adhesión célula-célula y célula-MEC y se requiere para la transmisión de fuerza bidireccional (Geiger, 1979; Geiger et al., 1980). Debido a esto, se quiso estudiar si esta proteína, clave en la mecanotransducción, se ve afectada por la DM, y si está relacionada con la miocardiopatía diabética.

Expresión de vinculina

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de vinculina obtenidos por *Western blot*, en homogeneizados de VI de corazones provenientes de ratones CD1, al comparar entre el grupo con DM inducida por inyección de STZ y el grupo control (figura 11B).

Como control de carga en el *Western blot* se utilizó GAPDH, en base a estudios previos en los cuales también se empleaba, ya que la expresión de dicha enzima no se ve afectada por la DM en el corazón (Hu et al., 2008; Zhao et al., 2013; Liu et al., 2014). Esto indica que la cantidad de proteínas totales sembrada en el gel de poliacrilamida fue muy similar entre las muestras, y no hubo grandes errores en los volúmenes de siembra.

Además, al incubar las membranas solamente con anticuerpo secundario, no se observó banda alguna, lo que indica que la banda obtenida en la incubación con anticuerpo primario y secundario provienen de la unión específica del anticuerpo primario a la vinculina.

De igual modo, Mediante Microscopía Láser Confocal tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos al cuantificar la intensidad de fluorescencia atribuible a la presencia de vinculina, en las fibras de cortes histológicos de VI (figura 12).

Estos resultados indican que los niveles de expresión proteica de vinculina no se verían afectados por la patología inducida con STZ en el modelo animal utilizado.

En relación a cambios en la expresión de vinculina causados por otras patologías, se ha reportado que en la miocardiopatía dilatada dicha proteína se encuentra sobreexpresada y se cree que posiblemente se deba a una función compensatoria donde interacciones integrina-MEC estabilizan el sarcolema y su unión al aparato contráctil y la MEC, manteniendo la integridad física del citoesqueleto (Heling et al., 2000; Sequeira et al., 2014). La miocardiopatía diabética es una patología propia de la DM, por lo que es razonable que en el modelo de DM1 en estudio no se den los mismos mecanismos moleculares que llevan a un aumento neto de la cantidad de vinculina, como ocurre en la miocardiopatía dilatada.

Por otra parte, se ha reportado que ratones *knockout* homocigotas para vinculina no se desarrollan completamente, y mueren a los 10 días y medio, teniendo defectos en el cierre del tubo neural y falla en el corazón (Xu et al., 1998), lo cual refleja la importancia de la presencia de vinculina.

Además, en estudios realizados en ratones *knockout* heterocigotas, con niveles reducidos de vinculina y metavinculina (isoforma variante de *splice*), se reportó una desalineación de la α -actinina y una arquitectura sarcomérica anormal acompañada de disfunción cardíaca y mayor mortalidad después de la sobrecarga de presión (Zemljic-Harpf et al., 2004). También se ha visto que células depletadas de vinculina tienen menor adhesión a una variedad de proteínas de la MEC (Xu et al., 1998). Todos estos defectos reflejan que la vinculina es un componente clave en

el sistema de mecanotransducción (Sharp et al., 1997). Sin embargo, la desorganización de los filamentos de actina reportados en la DM, no es debido a una disminución en los niveles proteicos de vinculina.

Disposición espacial de la vinculina

Con respecto a la localización de la vinculina en los cortes de VI analizados por Microscopía Láser Confocal, tanto en aquellos obtenidos de corazones provenientes de ratones pertenecientes al grupo control como al diabético, se observó presencia de la proteína en la membrana lateral (figura 14), correspondiente a la localización de los costámeros. La vinculina es un marcador clásico para los costámeros (Pardo et al., 1983-b), elementos citoesqueléticos críticos involucrados en la mecanotransducción bidireccional (Borg et al., 1983; Danowsky et al., 1992; Sharp et al., 1997; Kostin et al., 1998-a; Borg et al., 2000; Mansour et al., 2004; Samarel, 2005; Anastasi et al., 2009; McCain & Parker, 2011).

La tensión mecánica es fundamental para regular la expresión, la estabilidad y la organización de las proteínas costaméricas (Ervasti, 2003). Se ha demostrado que la generación de fuerza entre cardiomiocitos cultivados y su sustrato está mediada a través del costámero (Danowski et al., 1992). Las fuerzas mecánicas regulan la ganancia y la pérdida de adherencia celular, el estiramiento de la membrana y el citoesqueleto, y la compresión celular debido a cambios en la presión (Samarel, 2005).

Por otra parte, al observar la distribución de la vinculina en los planos más superficiales de las fibras, se identificó en ambos grupos, un patrón punteado organizado, en el cual se localizaba la fluorescencia, atribuible a la vinculina presente en los costámeros (figura 17C y D). Esta distribución coincide con lo reportado por Koteliansky & Gneushev (1983). Asimismo, se ha visto que cuando un sarcómero se alarga por tensión, tanto el complejo costamérico como el disco Z se extienden en la dirección longitudinal. Sin embargo, el acortamiento celular normal provoca un ensanchamiento de la célula, proporcionando de esta manera, un estiramiento en la dirección transversal que aumenta la distancia entre los filamentos gruesos y finos. Bajo tensión pasiva, los filamentos están más juntos y el disco Z en sección transversal tiene un enrejado pequeño. Con la tensión activa a medida que los sarcómeros se contraen, los filamentos se separan más y la red Z se convierte en tejido con un patrón en canasta. El músculo cardíaco suele estar bajo tensión activa, por lo que generalmente se observa este último patrón (Samarel et al., 2013). El patrón punteado de fluorescencia observado en este estudio, se corresponde a la localización de los costámeros cuando el tejido se encuentra bajo tensión activa.

Por otro lado, en el presente estudio se observó diferencias entre grupos en la expresión de vinculina a nivel de los DI. El grupo control presentó señal de fluorescencia fácilmente distinguible a 20x en el plano medio

(figura 14A) así como a 40x en ambos planos (figura 17A, 19A), e incluso se logró identificar los DI por luz transmitida (figura 15A). Por el contrario, en la mayoría de las fibras del grupo diabético fue muy difícil identificar los DI por luz transmitida (figura 15B), y en aquellos que sí se pudieron identificar, prácticamente no se observó señal proveniente de la presencia de vinculina (figuras 14B, 17B, 19B), resultado que se refleja en la cuantificación de los DI con señal de fluorescencia de ambos grupos (figura 16). Esto indica que en el modelo de DM1 utilizado, se genera un desarreglo o disrupción de la mayoría de los DI. Además, la vinculina deja de localizarse en aquellos DI que mantienen su organización observable por luz transmitida.

Los DI son componentes del músculo cardíaco, altamente organizados, que mantienen la integridad estructural y la contracción sincronizada del tejido cardíaco. Estudios en modelos animales también han comenzado a mostrar que los componentes de las FA desempeñan un rol importante en todos los aspectos de la biología del músculo cardíaco, incluido el desarrollo cardíaco, la enfermedad y las arritmias (Sheikh, 2009).

En pacientes con miocardiopatía hipertrófica obstructiva y estenosis aórtica, se vio una reducción drástica en la expresión de vinculina en los DI, mientras que otras patologías como la cardiomiopatía dilatada o la enfermedad hipertensiva del corazón, presentan una expresión normal de

vinculina en los DI. En todos los casos, se preserva la expresión normal en los costámeros (Vasile, 2006).

Por otro lado, en un estudio se reportó que los DI de corazones de ratones *knockout* heterocigotas se muestran desorganizados, y las miofibrillas no correctamente ancladas a los DI y la línea Z (Zemljic-Harpf et al., 2004). En otro estudio, con un modelo de estenosis aórtica, se observó que la vinculina se relocaliza, lejos de los DI, en el sub-sarcolema de la membrana lateral (Wang & Gerdes, 1999).

Habrían, por lo tanto, diferentes mecanismos por los que se da la desorganización de los DI y una redistribución de la vinculina. Mayor investigación sería necesaria para entender si la vinculina se relocaliza en el sarcolema lateral debido a la disrupción de los DI, o si esa relocalización es la causa de que los DI se desorganicen.

El músculo es altamente anisotrópico, la transmisión de fuerza biofísica depende de la dirección longitudinal o transversal de la fuerza, así como del equilibrio entre la generación de fuerza externa e interna (Samarel et al., 2013), pudiendo ocurrir paralela o lateralmente al eje longitudinal del sarcómero (Bloch & Gonzalez-Serratos, 2003). Esto podría deberse a la ubicación y orientación específica de los mecanosensores, en relación con la alineación del citoesqueleto (McCain & Parker, 2011).

En la dirección longitudinal, la fuerza se transduce de un sarcómero al siguiente dentro de la misma fibra hasta que se alcanza el final de la misma.

Perpendicularmente, la transmisión de la fuerza lateral permite la transducción de una miofibrilla a una miofibrilla vecina hasta que alcanza el complejo costamérico que canaliza la fuerza intracelular a través del sarcolema hasta la MEC (Bloch & Gonzalez-Serratos, 2003). Asimismo, así como la fuerza generada por un cardiomiocito puede transmitirse de manera longitudinal por interacciones célula-célula, puede transmitirse a las células adyacentes también lateralmente, a través de la unión a la MEC, lo que permite la contracción y relajación coordinada del sincitio funcional y el aparato miofibrilar de células musculares adyacentes (Samarel et al., 2013). Se ha reportado que la transmisión de fuerza longitudinal representa solo el 20-30% de la fuerza generada por los sarcómeros, lo que indica que el principal vector de fuerza se produce lateralmente, por lo que la ubicación del costámero lo hace crítico para su papel central en la transmisión de fuerza (Bloch & Gonzalez-Serratos, 2003).

Los costámeros responden a fuerzas mecánicas aumentadas a través de la respuesta de fortalecimiento inducida por estiramiento. El estiramiento aumenta la expresión de proteínas sensibles mecánicamente que mejoran las propiedades adhesivas del costámero para resistir el aumento de fuerzas mecánicas. Esta fuerza de contrapeso es fundamental para la adhesividad de los cardiomiocitos, la cual está dada por el citoesqueleto, la MEC y los receptores de superficie (Stiber, 2009). El aumento en el número y/o estado de activación de moléculas de adhesión en la superficie de los

cardiomiocitos, planteado por Benech y colaboradores (2014) como posible mecanismo responsable del aumento de la rigidez celular intrínseca en el mismo modelo de DM1, podría reflejarse en la redistribución de la vinculina, totalmente hacia el sarcolema lateral. Se ha reportado que ambientes fibróticos y rígidos desestabilizan las adhesiones célula-célula debido a un aumento en la generación de fuerza, la cual estimula la formación de las adhesiones focales, homólogas a los costámeros (McCain et al., 2012). Asimismo, varias miocardiopatías, como el infarto de miocardio, se caracterizan por un aumento de fibrosis y rigidez celular (McCain et al., 2012), aumento de la expresión de integrinas (Heling et al., 2000) y falta de conexiones intercelulares (Matsushita et al., 1999), lo que indica que ocurre un aumento en las adhesiones célula-MEC mientras que disminuyen las adhesiones célula-célula en los cardiomiocitos (McCain et al., 2012). Es importante destacar que el remodelado de las adhesiones intercelulares podría contribuir a la redistribución de las uniones GAP y la generación de arritmias, asociada a muchas miocardiopatías (Matsushita et al., 2003).

La deformación mecánica es detectada por las integrinas y desencadena el reclutamiento y la activación de varias proteínas que responden al estrés en la cara citoplasmática de las células, y quinasas de señalización. Más abajo, se activan vías de señalización que promueven la expresión génica y el crecimiento de los cardiomiocitos (Heineke & Molkenin, 2006), participando en la señalización hacia el núcleo y otros organelos (Mansour

et al., 2004; Torsoni et al., 2003; Torsoni et al., 2005). Durante el agrupamiento de integrinas, algunas quinasas pueden activar vías de señalización que regulan la mecanotransducción en sitios locales y distantes, dentro de la célula (Samarel et al., 2013). Algunas quinasas, como la quinasa de adhesión focal (FAK), tienen un rol importante en la regulación del cambio de conformación de la vinculina, de cerrada a abierta, lo que promueve la organización del anclaje indirecto en el sarcolema de la actina a las integrinas (Brancaccio et al., 2006).

El hecho de que la vinculina, talina, paxilina, y los dominios citoplasmáticos de la β 1-integrina sean sustratos para una variedad de quinasas y proteasas ha sido interpretado como una indicación de que la adhesión celular estaría modulada por la interacción del citoesqueleto y las integrinas (Kostin et al., 1998-a). Vinculado a esto, se ha reportado que la inhibición de la contractilidad de actina/miosina en cardiomiocitos cultivados, provoca el desensamblaje de los costámeros (Sharp, et al., 1997), mientras que la estimulación de la contractilidad induce la organización de los mismos, al mismo tiempo que se restablece la organización de miofibrillas (Fujita et al., 2007), indicando que el ensamblaje del costámero y las miofibrillas están estrechamente vinculados.

Por otra parte, se cree que muchos aspectos de la mecanotransducción convergen en la FA (Michaelson & Huang, 2011). La fuerza y señales mecánicas se transmiten longitudinalmente entre células adyacentes a

través de uniones como las FA y los desmosomas (Wang & Gerdes, 1999). Las células ejercen fuerzas mecánicas entre sí en sitios de adhesión intercelular por medio de las cadherinas. Se ha visto que la deleción específica de la vinculina en las FA, mientras su función en las adhesiones célula-MEC se mantienen normales, resulta en una pérdida de cadherina en la superficie celular (Peng et al., 2011).

La vinculina tiene un rol en el establecimiento, mantenimiento y/o regulación de las FA, así como en la transducción de señales en estos sitios (Hazan et al., 1997; Peng et al., 2011; Kaushik, 2015). Su localización en las adhesiones intercelulares es crítica para una fisiología adecuada. (Peng et al., 2011).

Los mecanosensores, estructuras capaces de percibir señales mecánicas y activar vías que permiten su transducción en señales bioquímicas (Neves et al., 2016), generan en última instancia respuestas adaptativas o inadaptadas, las cuales conducen a alteraciones en la estructura y función de las células (Samarel, 2005). La integración de esas señales juega un rol crítico en la adaptación del cardiomiocito para dar respuestas fisiológicas y fisiopatológicas durante el desarrollo y la enfermedad (Borg et al., 2000).

La fuerza tiene un papel importante en el reclutamiento de proteínas a los complejos de adhesión mediados por cadherinas (Peng et al., 2011). Los cambios en la actividad mecánica pueden regular la distribución y el

recambio de la vinculina y quizás otras proteínas del citoesqueleto y, en última instancia, la integridad estructural del aparato contráctil en el cardiomiocito (Simpson et al., 1993). La función contráctil y los contactos intercelulares actúan en conjunto para modular la localización de la proteína vinculina, cuya redistribución subcelular parece estar estrechamente correlacionada con el intento de mantener el orden miofibrilar (Simpson et al., 1993). Sin embargo, la disminución de la expresión de vinculina en las FA podría debilitar el anclaje de los filamentos de actina a la membrana de los DI, pudiendo contribuir al deterioro de la función del corazón en la insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, una posibilidad es que los eventos mediados por las integrinas estén regulados positivamente porque las cadherinas de las FA no se encuentran presentes para antagonizar el efecto de las integrinas (Bays et al., 2014). Asimismo, el aumento de contactos integrinas-MEC aumenta la rigidez citoesquelética y la viscosidad aparente (Wang & Ingber, 1994). El aumento de vinculina en esos sitios podría ser un mecanismo compensatorio para mejorar el anclaje de los miofilamentos.

Por otro lado, se ha reportado que la tensión mecánica en las cadherinas, y no en las integrinas, induce la fosforilación de la vinculina a nivel de la tirosina 822, permitiendo que la vinculina se una a la β -catenina. La tirosinquinasa Abelson (Abl), se activa en respuesta a la fuerza ejercida sobre la E-cadherina, fosforilando a la vinculina en dicha tirosina. Se vio

que la inhibición de Abl inhibe la acción de la vinculina sobre los complejos que contienen cadherina. De este modo, la fosforilación de la vinculina en la tirosina 822 tendría un rol en el establecimiento y mantenimiento de las adhesiones mediadas por las cadherinas (Bays et al., 2014), siendo un mecanismo por el cual la vinculina es selectivamente dirigida a las FA.

Puede que, en presencia de DM, las cadherinas se encuentren afectadas, y Abl no se active, o directamente Abl esté afectada, y la vinculina no se fosforile en la tirosina 822. De este modo, la vinculina no tendría señal de localización a las FA. De todos modos, la identificación de las vías de señalización que regulan la redistribución de la vinculina requiere mayor investigación.

La mecanotransducción en los cardiomiocitos es compleja ya que dependen de varios componentes intracelulares para detectar la carga mecánica y convertir los estímulos mecánicos en eventos bioquímicos que causan la remodelación del sarcómero (Torsoni et al., 2003). La arquitectura citoesquelética es una red que integra impulsos mecánicos y propaga señales a lo largo del cardiomiocito, regulando una amplia gama de salidas mecanotransductoras, para formar un circuito de retroalimentación y mantener la función cardíaca en respuesta a perturbaciones microambientales (Ross & Borg, 2001). La interacción entre los complejos de adhesión célula-célula y célula-MEC es esencial en la organización de células individuales en un tejido funcional (Michaelson &

Huang, 2011). Se piensa que la transmisión de fuerza estaría altamente integrada, ya que las fuerzas sobre las cadherinas se propagan a las uniones integrina-MEC, y viceversa (Michaelson & Huang, 2011)

Una desorganización en las adhesiones celulares y las propiedades del citoesqueleto, combinado con cambios en la MEC, estarían contribuyendo a la disfunción. A su vez, la mecánica extracelular y celular interviene en la rigidez patogénica del tejido miocárdico y la disfunción ventricular (Meininger, 2014).

La comprensión de los mecanismos por los cuales los cardiomiocitos detectan y responden al estrés biomecánico es de vital importancia para el desarrollo de una base molecular de la miocardiopatía diabética. La modulación de la rigidez es clave para que la célula mantenga el balance de fuerzas entre ella y sus alrededores. Perturbaciones en ese balance entre las fuerzas y la rigidez subyace la etiología y progresión de muchas enfermedades (Bays et al., 2014).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que, en el modelo animal utilizado, la inducción de DM1 mediante inyección de STZ no modifica los niveles de expresión de la proteína vinculina en homogeneizados de VI. Sin embargo, sí ocurre un cambio en su distribución en los cardiomiocitos.

Debido a que la localización específica de la vinculina en los costámeros y DI es esencial para la función de estos complejos mecanotransductores, la redistribución de dicha proteína completamente hacia los costámeros puede estar afectando la transmisión de fuerza y la subsiguiente señalización. La falta de vinculina en las FA indica que la integridad de las comunicaciones intercelulares estaría viéndose comprometida, y por lo tanto el comportamiento del tejido como sincitio funcional, podría estar afectado. Puede que proteínas necesarias para el andamiaje de la vinculina en ese complejo se vean modificadas de alguna manera por la patología, generando así la disrupción de los DI. Puede que, además, en un posible intento de compensar la falta de comunicación intercelular, haya un aumento de los complejos costaméricos en el sarcolema lateral, los cuales son capaces de transmitir señales mecánicas a células vecinas a través de la MEC.

El hecho de que la expresión de la vinculina no se vea modificada por la patología, no significa que las vías mecanotransductoras no puedan estar afectadas. De todas maneras, se requiere mayor investigación para conocer los mecanismos moleculares por los que se da este cambio en la distribución de dicha proteína en los cardiomiocitos, y para determinar también si es en parte una de las causas que desencadenan la miocardiopatía diabética.

A modo de síntesis, el presente trabajo muestra por primera vez, evidencias experimentales de que en el modelo de DM1 utilizado ocurren cambios intracelulares relacionados con la comunicación célula-célula y célula-MEC, los cuales podrían estar relacionados con mecanismos patogénicos cardíacos vinculados al progreso de la miocardiopatía diabética.

PERSPECTIVAS

1. Analizar nuevas muestras de ambos grupos para aumentar el n.
2. Determinar si ocurre un cambio significativo entre grupos, en los niveles de expresión del ARN mensajero de la vinculina en el VI.
3. Estudiar la expresión de enzimas que se conocen por regular la conformación de la vinculina, como Abl y FAK, en el VI de corazones de ratones controles y diabéticos.
4. Estudiar el resto de componentes que conforman el sistema integrina-talina-vinculina del costámero, a nivel de la expresión proteica como de ARN mensajero, además de su distribución celular en el VI de ratones de ambos grupos.
5. Estudiar el resto de proteínas de las FA de igual modo a lo mencionado anteriormente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, quienes me han apoyado desde el comienzo y que siempre celebran mis logros como suyos. A Leonardo, mi pareja, por su apoyo incondicional y por estar en los momentos más difíciles, ayudándome a levantarme en mis tropiezos. También agradecer al resto de mi familia, hermanos, abuelos, tíos y primos, así como a mis amigos, quienes siempre pendientes, me han alentado a seguir adelante.

Por otro lado, quiero agradecer a quienes me ayudaron a que este trabajo fuera posible, además del apoyo a nivel personal. A Juan Benech, por abrirme las puertas de su laboratorio, dándome la oportunidad de realizar la tesis y brindarme todas las herramientas necesarias, así como orientarme durante el proceso. Agradecerles también a los demás integrantes del Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología: Gerardo Romanelli, Rocío Varela e Inés Rauschert, quienes me ayudaron muchísimo, entre otras cosas con el uso del criostato, la cuantificación por *Image J* y con la parte de microscopía. Por último, y no menos importante, a Andrés Di Paolo que también me ayudó muchísimo a usar el Microscopio Láser Confocal, y a Juan Pablo Damián quien siempre estuvo dispuesto a colaborar con el análisis estadístico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad F, Seidman JG & Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005; 6: 185–216. doi:10.1146/annurev.genom.6.080604.162132

Alberti KGMM & Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional Report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* 1998; 15: 539–553.

Alenghat FJ & Ingber DE. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and Integrins. *Sci. Signalling.* 2002; 12(119): pe6. doi:10.1126/stke.2002.119.pe6

Alonso JL & Goldmann WH. Cellular mechanotransduction. *AIMS Biophysics.* 2016; 3(1): 50-62. doi:10.3934/biophy.2016.1.50

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2014; 37(1): 81-90. doi:10.2337/dc14-S081

American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2015; 38(1): 8-16. doi:10.2337/dc15-S005

Anastasi G, Cutroneo G, Gaeta R, di Mauro D, Arco A, Consolo A, Santoro G, Trimarchi F & Favaloro A. Dystrophin-glycoprotein complex and vinculin-talin-integrin system in human adult cardiac muscle. *International Journal of Molecular Medicine.* 2009; 23: 149-159. doi:10.3892/ijmm_00000112

Atkinson MA, Eisenbarth GS & Michel AW. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2014; 383(9911): 69–82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7

Bakolitsa C, Cohen DM, Bankston LA, Bobkov AA, Cadwell GW, Jennings L, Critchley DR, Craig SW, Liddington RC. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature.* 2004; 430(6999): 583–586. doi:10.1038/nature02610

Bays JL & DeMali KA. Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017; 74: 2999–3009. doi:10.1007/s00018-017-2511-3

Bays JL, Peng X, Tolbert CE, Guilluy C, Angell AE, Pan Y, Superfine R, Burridge K & DeMali KA. Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell–cell and cell–matrix adhesions. *J. Cell Biol.* 2014; 205(2): 251–263. doi:10.1083/jcb.201309092

Belke DD, Swanson EA & Dillmann WH. Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. *Diabetes.* 2004; 53(12): 3201-3208.

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.* 2014; 307: 910-919. doi:10.1152/ajpcell.00192.2013

Benech JC, Benech N, Zambrana AI, Rauschert I, Bervejillo V, Oddone N, Alberro A & Damián JP. Intrinsic nanomechanical changes in live diabetic

cardiomyocytes. *Cardiovascular Regenerative Medicine*. 2015; 2: e893. doi:10.14800/crm. 893

Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjeren 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*. 1999; 22(7): 1186–1190.

Bloch RJ & Gonzalez-Serratos H. Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2003; 31(2): 73–78.

Borbély A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JGF, Edes I, Stienen GJM & Paulus W. J. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005; 111: 774-781. doi:10.1161/01.CIR.0000155257.33485.6D

Borg TK, Goldsmith EC, Price R, Carve W, Terracio L & Samarel AM. Specialization at the Z line of cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*. 2000; 46: 277-285.

Borg TK, Johnson LD & Lill PH. Specific attachment of collagen to cardiac myocytes: in vivo and in vitro. *Developmental Biology*. 1983; 97: 417-423.

Boudina S & Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007; 115: 3213-3223. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679597

Boudina S & Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2010; 11(1): 31–39.

Bradford M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1–2): 248-254.

Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G & Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovascular Research*. 2006; 70: 422 – 433. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.015

Burridge K & Feramisco JR. Microinjection and localization of a 130K protein in living fibroblasts: a relationship to actin and fibronectin. *Cell*. 1980; 19: 587-595.

Burridge K & Mangeat P. An interaction between vinculin and talin. *Nature*. 1984; 308: 744-745.

Chen C, Tan J & Tien J. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2004; 6: 275–302 doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140040

Concannon P, Rich SS & Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(16): 46-54. doi:10.1056/NEJMra0808284

Couper JJ & Donaghue KC. Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*. 2009; 10(12): 13–16. doi:0.1111/j.1399-5448.2009.00574.x

Coutu MD & Craig SW. cDNA-derived sequence of chicken embryo vinculin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988; 85: 8535-8539.

Craig SW & Pardo JV. Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell Motility*. 1983; 3: 449-462.

Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006; 367: 847–58. doi:10.1016/S0140-6736(06)68341-4

Danowski BA, Imanaka-Yoshida K, Sanger JM & Sanger JW. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *The Journal of Cell Biology*. 1992; 118(6): 1411-1420. doi:10.1083/jcb.118.6.1411

Devendra D, Liu E & Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004; 328: 750-754. doi:10.1136/bmj.328.7442.750

Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Robbins D, Rhoades ER & Howard BV. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation*. 2000; 101(19): 2271-2276.

Dhalla NS, Liua X, Panagiaa V & Takedab N. Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovascular Research*. 1998; 40:239 –247.

Ehler E. Cardiac cytoarchitecture - why the “hardware” is important for heart function!. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016; 1863(7): 1857-1863. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.11.006

Eimer W, Niermann M, Eppe MA & Jockusch BM. Molecular shape of vinculin in aqueous solution. *J. Mol. Biol.* 1993; 229: 146-152.

Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A & Moonsamy P. HLA DR-DQ Haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 2008; 57(4): 1084-92. doi:10.2337/db07-1331

Ervasti JM. Costameres: the achilles' heel of herculean muscle. *J. Biol. Chem*. 2003; 278(16): 13591-13594. doi:10.1074/jbc.R200021200

Farquhar MG & Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology*. 1963; 17(2): 375–412. doi:10.1083/jcb.17.2.375

Fatkin D & Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 945–980. doi:10.1152/physrev.00012.2002.

Franke WW, Borrmann CM, Grund C & Pieperhoff S. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *European Journal of Cell Biology*. 2006; 85: 69–82. doi:10.1016/j.ejcb.2005.11.003

Fujita H, Nedachi T & Kanzaki M. Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. *Experimental Cell Research*. 2007; 313: 1853–1865. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.002

Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T & Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics In the framingham population: sixteen year follow-up study. *Diabetes*. 1974; 23(2): 105-111. doi:10.2337/diab.23.2.105

Geiger B. A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*. 1979; 18: 193-205.

Geiger B, Tokuyasu KT, Dutton AH & Singer SJ. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980; 77(7): 1127-1131.

Gil-Ortega I & Kaski JC. Miocardiopatía diabética. *Med. Clin. (Barc)*. 2006; 127(15): 584-94.

Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U & Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014; 103(2): 137-149. doi:10.1016/j.diabres.2013.11.002

Harvey PA & Leinwand LA. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J. Cell Biol*. 2011; 194(3): 355-365. doi:10.1083/jcb.201101100

Hazan RB, Kang L, Roe S, Borgen PI & Rimm DL. Vinculin is associated with the E-cadherin adhesion complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(71): 32448–32453.

Heineke J & Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature*. 2006; 7: 589-600. doi:10.1038/nrm1983

Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, Bauer E, Klövekorn W, Schlepper M, Schaper W & Schaper J. Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circ. Res*. 2000; 86: 846-853. doi:10.1161/01.RES.86.8.846

Hersch N, Wolters B, Dreissen G, Springer R, Kirchgeßner N, Merkel R & Hoffmann B. The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening. *Biology Open*. 2012; 0: 1-11. doi:10.1242/bio.20133830

Hoffman BD, Grashoff C & Schwartz MA. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature*. 2011; 475: 316-323. doi:10.1038/nature10316

Hong T & Shaw RM. Cardiac T-tubule microanatomy and function. *Physiol. Rev*. 2017; 97(1): 227–252. doi:10.1152/physrev.00037.2015

Hongguangi W & Vander Heide RS. Ischemic preconditioning and heat shock activate Akt via a focal adhesion kinase-mediated pathway in Langendorff-perfused adult rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2010; 298: 152-157. doi:10.1152/ajpheart.00613.2009.

Hoshijima M. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2006; 290: 1313-1325. doi:10.1152/ajpheart.00816.2005

Hu J, Klein JD, Du J & Wang XH. Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitin-proteasome system by insulin deficiency. *Endocrinology*. 2008; 149(11): 5384–5390. doi:10.1210/en.2008-0132.

Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ & Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *The Journal of Cell Biology*. 2007; 179(5): 1043-1057. doi:10.1083/jcb.200703036

Jacot JG, McCulloch AD & Omens JH. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*. 2008; 95(7): 3479–3487. doi:10.1529/biophysj.107.124545

Janostiak J, Pataki AC, Brábek J & Rösel D. Mechanosensors in integrin signaling: The emerging role of p130Cas. *European Journal of Cell Biology*. 2014; 93: 445–454. doi:10.1016/j.ejcb.2014.07.002

Kannel WB & McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: The framingham study. *Circulation*. 1979; 59(1): 8-13. doi:10.1161/01.CIR.59.1.8

Kaushik G, Spenlehauer A, Sessions AO, Trujillo AS, Fuhrmann A, Fu Z, Venkatraman V, Pohl D, Tuler J, Wang M, Lakatta EG, Ocorr K, Bodmer R, Bernstein SI, Van Eyk JE, Cammarato A & Engler AJ. Vinculin network-mediated cytoskeletal remodeling regulates contractile function in the aging heart. *Sci. Transl. Med.* 2015; 7(292): 292-299. doi:10.1126/scitranslmed.aaa5843

Kharroubi AT & Darwish HM. Diabetes mellitus: the epidemic of the century. *World J. Diabetes*. 2015; 6(6): 850-867. doi:10.4239/wjd.v6.i6.850

Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D & Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Failure Reviews*. 2000; 5: 271-280.

Kostin S, Heling A, Hein S, Scholz D, Klövekorn W & Schaper J. The protein composition of the normal and diseased cardiac myocyte. *Heart Failure Reviews*. 1998; 2: 245–260.

Kostin S, Scholz D, Shimada T, Maeno Y, Mollnau H, Hein S & Schaper J. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell Tissue Res*. 1998; 294:449-460. doi:10.1007/s004410051196

Koteliansky VE & Gneushev GN. Vinculin localization in cardiac muscle. *FEBS*. 1983; 159(1,2): 158-160.

Li Y, Merkel CD, Zeng X, Heier JA, Cantrell PS, Sun M, Stolz DB, Watkins SC, Yates NA & Kwiatkowski AV. The N-cadherin interactome in primary cardiomyocytes as defined using quantitative proximity proteomics. *Journal of Cell Science*. 2019; 132: 1-16. doi:10.1242/jcs.221606

Liu Q, Wang S & Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: role of oxidative stress and damage. *J. Diabetes Invest*. 2014; 5: 623–634. doi:10.1111/jdi.12250

Lyon RC, Zanella F, Omens JH & Sheikh F. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circulation Research*. 2015; 116(8): 1462-1476. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304937

Maahs DM, West NA, Lawrence JM & Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2010; 39(3): 481–497. doi:10.1016/j.ecl.2010.05.011

Mansour H, de Tombe PP, Samarel AM & Russell B. Restoration of resting sarcomere length after uniaxial static strain is regulated by protein kinase C

and focal adhesion kinase. *Circulation Research*. 2004; 94: 642-649. doi:10.1161/01.RES.0000121101.32286.C8

Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T & Takamatsu T. Remodeling of cell-cell and cell–extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts. *Circulation Research*. 1999; 85: 1046-1055. doi:10.1161/01.RES.85.11.1046

McCain ML, Lee H, Aratyn-Schausa Y, Kléberb AG & Parkera KK. Cooperative coupling of cell-matrix and cell–cell adhesions in cardiac muscle. *PNAS*. 2012; 109(25): 9881–9886.

McCain ML & Parker KK. Mechanotransduction: the role of mechanical stress, myocyte shape, and cytoskeletal architecture on cardiac function. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2011; 462: 89–104. doi:10.1007/s00424-011-0951-4

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*. 2014; 307: 908-909. doi:10.1152/ajpcell.00279.2014

Mezzano V & Sheikh F. Cell–cell junction remodeling in the heart: possible role in cardiac conduction system function and arrhythmias? *Life Sci*. 2012; 90(9-10): 313–321. doi:10.1016/j.lfs.2011.12.009

Michaelson JE & Huang H. Cell–cell junctional proteins in cardiovascular mechanotransduction. *Annals of Biomedical Engineering*. 2011; 40(3): 568–577. doi:10.1007/s10439-011-0439-6

Milam LM. Electron microscopy of rotary shadowed vinculin and vinculin complexes. *J. Mol. Biol*. 1985; 184: 543-545.

Murarka S & Movahed MR. Diabetic cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*. 2010; 16(12): 971-979. doi:10.1016/j.cardfail.2010.07.249

Nemoto O, Kawaguchi M, Yaoita H, Miyake K, Maehara K & Maruyama Y. Left ventricular dysfunction and remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Circulation Journal*. 2006; 70: 327 – 334.

Neves JS, Leite-Moreira AM, Neiva-Sousa M, Almeida-Coelho J, Castro-Ferreira R & Leite-Moreira AF. Acute myocardial response to stretch: what we (don't) know. *Frontiers in Physiology*. 2016; 6. doi:10.3389/fphys.2015.00408

Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavana D, Shaw JE & Makaroff LE. IDF diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2017; 128: 40-50. doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024

Pardo JV, D'angelo Siliciano J & Craig SW. A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: Transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Cell Biology*. 1983; 80: 1008-1012.

Pardo JV, D'angelo Siliciano J & Craig SW. Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *The Journal of Cell Biology*. 1983; 97(4): 1081-1088. doi:10.1083/jcb.97.4.1081

Peng X, Nelson ES, Maiers JL & DeMali KA. New insights into vinculin function and regulation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2011; 287: 191–231. doi:10.1016/B978-0-12-386043-9.00005-0

Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU & Chen J. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog. Pediatr. Cardiol.* 2011; 31(2): 83–88. doi:10.1016/j.ppedcard.2011.02.003

Poornima IG, Parikh P & Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circulation Research*. 2006; 98: 596-605. doi:10.1161/01.RES.0000207406.94146.c2

Price GJ, Jones P, Davison MD, Patel B, Bendori R, Geiger B, & Critchley DR. Primary sequence and domain structure of chicken vinculin. *Biochem. J.* 1989; 259: 453-461.

Pyle WG & Solaro RJ. At the crossroads of myocardial signaling the role of Z-Discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circulation Research*. 2004; 94: 296-305. doi:10.1161/01.RES.0000116143.74830.A9

Ross RS & Borg TK. Integrins and the myocardium. *Circulation Research*. 2001; 88: 1112-1119.

Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW & Grishman A. A new type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 1972; 30: 595-602. doi:10.1016/0002-9149(72)90595-4

Russell B, Curtis MW, Koshman YE & Samarel AM. Mechanical stress-induced sarcomere assembly for cardiac muscle growth in length and width. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2010; 48(5): 817-823. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.02.016

Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 289: 2291-2301. doi:10.1152/ajpheart.00749.2005

Samarel AM, Koshman Y, Swanson ER & Russell B. Biophysical forces modulate the costamere and Z-disc for sarcomere remodeling in heart failure. In: Solaro R., Tardiff J. (eds) *Biophysics of the Failing Heart. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. 2013; 141-174. doi:10.1007/978-1-4614-7678-8_7

Sarantitis I, Papanastasopoulos P, Manousi M, Baikoussis NG & Apostolakis E. The cytoskeleton of the cardiac muscle cell. *Hellenic Journal of Cardiol.* 2012; 53: 367-379.

Sequeira V, Nijenkamp LLAM, Regan JA & van der Velden J. The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1838: 700–722. doi:10.1016/j.bbamem.2013.07.011

Sharp WW, Simpson DG, Borg TK, Samarel AM & Terracio L. Mechanical forces regulate focal adhesion and costamere assembly in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1997; 273:546-556.

Sheikh F, Ross RS & Chen J. Cell-cell connection to cardiac disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 2009; 19: 182–190.

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. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003; 42(1): 165-172. doi:10.1016/S0735-1097(03)00509-6

Simpson DG, Decker ML, Clark WA & Decker RS. Contractile activity and cell-cell contact regulate myofibrillar organization in cultured cardiac myocytes. *The Journal of Cell Biology.* 1993; 123(2): 323-336. doi:10.1083/jcb.123.2.323

Solaro RJ & Van Eyk J. Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 1996; 28: 217–230.

Sparrow JC & Schöck F. The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology.* 2009; 10(4): 293-298. doi:10.1038/nrm2634

Spector KS. Diabetic cardiomyopathy. *Clin. Cardiol.* 1998; 21:885-887.

Stiber JA, Seth M & Rosenberg PB. Mechanosensitive channels in striated muscle and the cardiovascular system: not quite a stretch anymore. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009; 54(2): 116–122. doi:10.1097/FJC.0b013e3181aa233f

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.* 2010; 298: 833-843. doi:10.1152/ajpheart.00418.2009.

Sussman MA, McCulloch A & Borg TK. Dance band on the titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circulation Research.* 2002; 91: 888-898. doi:10.1161/01.RES.0000041680.43270.F8

Terracio L, Rubin Gullberg D, Balog E, Carver W, Jyring R & Borg TK. Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circulation Research.* 1991; 68: 734-744. doi:10.1161/01.RES.68.3.734

Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W, Hanks SK & Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circulation Research.* 2003; 93: 140-147. doi:10.1161/01.RES.0000081595.25297.1B

Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA & Franchini KG. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 289: 1488–1496. doi:10.1152/ajpheart.00692.2004

Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E & Dillmann WH. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2002; 51: 1166-1171.

van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JGF, Diamant M, Borbély A, van der Velden J, Stienen GJM, Laarman GJ, Niessen HWM & Paulus WJ. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: Importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*. 2008; 117(1): 43-51.

Vasile VC, Edwards WD, Ommen SR & Ackerman MJ. Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with reduced expression of vinculin in the intercalated disc. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006; 349: 709–715. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.106

Villeneuve LM, Reddy MA & Natarajan R. Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2011; 38(7): 401-409. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05497.x

Vogel V & Sheetz MP. Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009; 21: 38-46. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.002

Waddingham MT, Edgley AJ, Tsuchimochi H, Kelly DJ, Shirai M & Pearson JT. Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World J. Diabetes*. 2015; 6(7): 943-960. doi:10.4239/wjd.v6.i7.943

Wang J, Song Y, Wang Q, Kralik PM & Epstein PN. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. *The Review of Diabetic Studies*. 2006; 3(3): 108-117. doi:10.1900/RDS.2006.3.108

Wang N & Ingber DE. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophysical Journal*. 1994; 66: 2181-2189.

Wang X & Gerdes AM. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1999; 31: 333–343.

Whiting DR, Guariguata L, Weil C & Shaw J. IDF Diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011; 94(3): 311–321. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.029

Wiesner S, Legate KR & Fässler R. Integrin-actin interactions. *Cell. Mol. Life Sci*. 2005; 62: 1081-1099. doi:10.1007/s00018-005-4522-8

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*. 2004; 27(5): 1047–1053. doi:10.2337/diacare.27.5.1047

Winkler J, Lundsorf H & Jockusch BM. The Ultrastructure of chicken gizzard vinculin as visualized by high-resolution electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. 1996; 116: 270-277.

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.* 2010; 298: 2071-2081. doi:10.1152/ajpheart.01156.2009.

Xu W, Baribault H & Adamson ED. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development.* 1998; 125: 327-337.

Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, Nagafuchi A, & Shibata M. α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature Cell Biology.* 2010; 12(6): 533–542. doi:10.1038/ncb2055

Zarich SW, Arbuckle BE, Cohen LR, Roberts M & Nesto RW. Diastolic abnormalities in young asymptomatic diabetic patients assessed by poked doppler echocardiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1988; 12(1): 114-120.

Zarich SW & Nesto RW. Diabetic cardiomyopathy. *American Heart Journal.* 1989; 118(5): 1000-1012.

Zemljic-Harpf AE, Ponrartana S, Avalos RT, Jordan MC, Roos KP, Dalton ND, Phan VQ, Adamson ED & Ross RS. Heterozygous inactivation of the vinculin gene predisposes to stress-induced cardiomyopathy. *American Journal of Pathology.* 2004; 165(3).

Zhao Y, Zhang L, Qiao Y, Zhou X, Wu G, Wang L, Peng Y, Dong X, Huang H, Si L, Zhang X, Zhang L, Li J, Wang W, Zhou L & Gao X. Heme oxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy. *PLoS ONE.* 2013; 8(9): e75927. doi:10.1371/journal.pone.0075927

Ziegler WH, Liddington RC & Critchley DR. The structure and regulation of vinculin. *TRENDS in Cell Biology.* 2006; 16(9): 453-460. doi:10.1016/j.tcb.2006.07.004