



AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN



**TESIS DE MAESTRÍA**

**PEDECIBA BIOLOGÍA SUB-ÁREA: BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**ANÁLISIS MORFO-FISIOLÓGICO DE CÉLULAS  
CARDÍACAS EN CONDICIONES DE HIPERGLICEMIA –  
HIPERLIPIDEMIA**

**Lic. Rocío Varela**

**LABORATORIO DE SEÑALIZACIÓN CELULAR Y NANOBIOLOGÍA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE**

**Tutor:** Dr. Juan Claudio Benech

**Co-tutor:** Dr. Gustavo Folle

**FECHA DE PRESENTACIÓN:** 15 de junio de 2020

**Tribunal:**

Dr. Aldo Calliari

Dra. María Vittoria Di Tomaso

Dr. Gonzalo Ferreira

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	4
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1.1. Diabetes Mellitus.....	7
1.2. Miocardiopatía diabética .....	8
1.3. Características del corazón diabético.....	49
1.4. Modelos de experimentación de DM.....	10
1.5. Hiperglicemia - hiperlipidemia .....	12
1.6. Citoesqueleto de actina.....	13
1.7. Apoptosis.....	14
1.8. Problema de investigación .....	15
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
3.1. Objetivo general .....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
4.1. Cultivos celulares.....	17
4.2. Complejo PA/BSA .....	17
4.3. Análisis de la muerte celular .....	18
4.4. Análisis del tipo de muerte celular mediante la técnica de la triple tinción de células en suspensión.....	49
4.5. Análisis de largo y ancho celular .....	20
4.6. Análisis del citoesqueleto de actina .....	21
4.6.1. Cuantificación de la actina F total.....	21
4.6.2. Cuantificación de la disposición espacial de la actina F.....	22
4.7. Análisis de la expresión proteica por Western blot .....	23
4.8. Cálculo del peso molecular aparente .....	24
4.9. Análisis de la rigidez celular por Microscopía de Fuerza Atómica .....	24
4.9.1. Análisis de células fijadas.....	26
4.9.2. Análisis de células vivas .....	27
4.10. Análisis estadístico de los datos .....	28
<b>5. RESULTADOS</b> .....	29
5.1. Análisis de las condiciones óptimas experimentales .....	29
5.1.1. Ajuste de la concentración óptima de glucosa y cuantificación de la muerte celular	29

5.1.2.	Cuantificación del ancho y largo celular .....	31
5.2.	Análisis de los efectos de la condición 33 mM glucosa + PA.....	32
5.2.1.	Análisis temporal de la muerte celular .....	32
5.2.2.	Análisis del tipo de muerte celular .....	33
5.2.3.	Análisis de la morfología celular .....	35
5.2.4.	Cuantificación y análisis de la expresión y disposición espacial de la actina F.....	37
5.2.5.	Análisis de la expresión proteica de la actina total .....	39
5.2.6.	Análisis de la nanomecánica celular .....	41
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>495</b>
6.1.	Análisis de las condiciones óptimas experimentales .....	496
6.2.	Análisis de la condición control y 33mM glucosa + PA .....	498
6.2.1.	Análisis de la muerte celular.....	498
6.2.2.	Análisis de la morfología celular .....	498
6.2.3.	Análisis de la actina F.....	49
6.2.4.	Análisis de la expresión de la actina total por western blot.....	50
6.2.5.	Análisis de la nanomecánica celular .....	52
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>515</b>
<b>9.</b>	<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>516</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>527</b>

## ABREVIATURAS

ADN .....	Ácido desoxirribonucleico
AG .....	Ácidos grasos
AGEs .....	Productos finales de glicosilación avanzada
ARN .....	Ácido ribonucleico
ATP .....	Adenosina trifosfato
BSA .....	Seroalbúmina bovina
Ca <sup>+2</sup> .....	Calcio
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de carbono
DM .....	Diabetes mellitus
EDTA .....	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA .....	Diacetato de fluoresceína
GAPDH .....	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HEPES .....	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IP .....	Ioduro de Propidio
MCD .....	Miocardopatía diabética
MLC .....	Microscopía Laser Confocal
MFA .....	Microscopía de Fuerza Atómica
MgCl <sub>2</sub> .....	Cloruro de Magnesio
NaCl .....	Cloruro de sodio
NaOH .....	Hidróxido de sodio
O <sub>2</sub> .....	Oxígeno
PA .....	Acido palmítico
PBS .....	Buffer fosfato salino
PFA .....	Paraformaldehído
PMSF .....	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PVDF .....	Polidivilino de fluoruro
ROS .....	Especies reactivas del oxígeno
SDS .....	Dodecilsulfato sódico
SFB .....	Suero fetal bovino
STZ .....	Estreptozotocina
TBS .....	Buffer Tris Salino
TBS-T .....	Buffer Tris Salino- Tween
Tris .....	Tris(hidroximetil)aminometano

## RESUMEN

La Diabetes mellitus (DM) es debida a un desorden sistémico caracterizado por defectos en la secreción de la insulina, resistencia a la misma, o ambas. Como resultado, la glucosa no logra ser metabolizada correctamente provocando hiperglicemia crónica. Este trastorno genera a largo plazo daños a nivel celular y tisular en una gran variedad de órganos incluyendo al corazón. A su vez, en la DM tipo 2 el aumento de lípidos desempeña un papel fundamental en el desarrollo de algunas patologías cardíacas, siendo el lípido más importante el ácido palmítico (PA). Se ha reportado que la sinergia entre la hiperglicemia e hiperlipidemia genera alteraciones del miocardio más graves que ambos factores independientemente. La DM incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas, provocando alteraciones estructurales y funcionales, siendo ésta una de las principales causas de mortalidad de los pacientes. Muchas son las alteraciones que se generan que, en conjunto, producen la miocardiopatía diabética (MCD).

Las células H9c2 son una línea celular derivada del ventrículo izquierdo de corazón de embriones de rata las cuales comparten varias de las propiedades fisiológicas con los cardiomiocitos. Por esta razón han sido muy utilizadas como modelo *in vitro* de miocitos cardíacos. Esta línea celular se puede cultivar en condiciones de hiperglicemia e hiperlipidemia para emular *in vitro* las condiciones de los cardiomiocitos en el corazón diabético.

El objetivo de esta tesis fue analizar los cambios morfo-fisiológicos inducidos por la sinergia entre la glucosa y el PA en cultivos celulares de la línea H9c2. Para definir las condiciones óptimas de trabajo, se incubaron las células en condiciones control (5.5 mM glucosa) y en dos de las condiciones de hiperglicemia más utilizadas en la literatura científica (25 mM y 33 mM glucosa) asociadas a concentraciones fijas de PA (500  $\mu$ M). Se encontró que la concentración 33 mM glucosa + PA presentaba mayor frecuencia de muerte celular apoptótica (5 veces mayor que el control) y cambios morfológicos significativos a las 72 h de incubación. Estos resultados determinaron que la mayoría de los análisis fueran realizados utilizando la condición 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación.

Existen evidencias que sugieren que el citoesqueleto de actina actuaría como un sensor y mediador de la apoptosis. Por esta razón se cuantificó la cantidad de actina F por intensidad de fluorescencia, no observándose diferencias en su expresión, pero sí en su distribución espacial. Se constató un desplazamiento espacial de la actina F hacia la periferia celular en las células solo de la condición 33 mM glucosa + PA. A su vez, resultados obtenidos por *western blot* sugieren que la actina total, en condiciones de 33 mM glucosa + PA presenta alteraciones en su peso

molecular. Como se ha reportado que la actina es responsable de más del 80% del valor del módulo elástico celular, se realizó el análisis de la rigidez celular utilizando microscopía de fuerza atómica. Esta herramienta permitió la realización de mapas de elasticidad, demostrando un aumento de la rigidez en la totalidad de las células de la condición 33 mM glucosa + PA, siendo esta diferencia mayor en la periferia celular. Este trabajo es el primero en mostrar evidencias, mediante mapas de elasticidad, que modificaciones en la distribución espacial de las fibras de actina podrían correlacionarse con la distribución en la rigidez en condiciones hiperglicémicas e hiperlipidémicas. La desorganización estructural y el aumento en la rigidez celular se encuentran asociadas a contracciones musculares disfuncionales y arritmia en los corazones de pacientes diabéticos.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es definida como un desorden metabólico de múltiples etiologías (Alberti & Zimmet, 1998). Actualmente esta patología afecta a millones de personas en todo el mundo (Whiting et al., 2011; American Diabetes Association, 2019) y se caracteriza por presentar defectos en la secreción de insulina y/o resistencia a la misma en los tejidos. Como consecuencia, la glucosa no logra ser metabolizada correctamente y comienza a acumularse en sangre provocando un estado de hiperglicemia crónica (American Diabetes Association, 2014; International Diabetes Federation, 2019).

La DM puede clasificarse en: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), gestacional y otros tipos que se presentan con menor prevalencia (American Diabetes Association, 2019). La DM1 se debe a una insuficiencia en la producción de insulina, la cual puede clasificarse en autoinmune, idiopática y fulminante (Daneman, 2006; Maahs et al., 2010). La DM2 es la que presenta mayor prevalencia en la población. Es un trastorno metabólico caracterizado por resistencia a la insulina como consecuencia de la hiperglicemia e hiperlipidemia (American Diabetes Association, 2015; Waddingham et al., 2015). La resistencia a la insulina como componente central, la hiperglicemia, la hipertensión, la dislipemia y la obesidad definen al síndrome metabólico (Reaven, 1988; Shin et al., 2013). Generalmente para su diagnóstico deben estar presentes tres o más de los siguientes componentes: gran perímetro abdominal, triglicéridos elevados, colesterol HDL bajo, presión arterial elevada y glucosa en sangre (en ayunas) elevada (Nolan et al., 2017). Se estima que aproximadamente un 25% de la población mundial presenta síndrome metabólico (O'Neill & O'Driscoll, 2015; International Diabetes Federation, 2017).

La Federación Internacional de Diabetes estimó en 2019 que aproximadamente 463 millones de adultos entre 20-79 años padecían DM, y se calcula que el número llegue a 700 millones para el 2045 (Fig. 1) (International Diabetes Federation, 2019). Se sabe que la DM ya ha causado más de 4.2 millones de muertes siendo las afecciones cardiovasculares una de las principales causas de mortalidad en estos pacientes (Sasaki et al., 1989; Candido et al., 2003; Gil-Ortega & Kaskia, 2006; Mozaffarian, 2015).

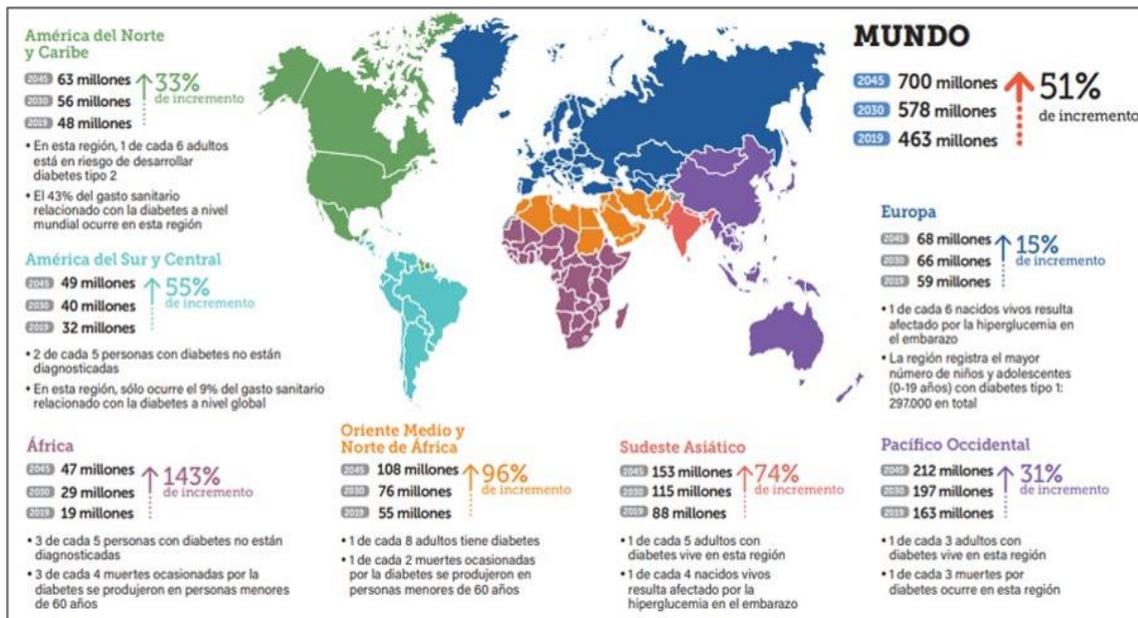


Figura 1.- Prevalencia de la Diabetes mellitus a nivel mundial (20-79 años). El mapa muestra un estimado de número de casos que habrá en cada región en el año 2045. Se calcula que a nivel mundial la DM incrementará un 51%. Datos proporcionados por la Federación Internacional de Diabetes, en su actualización 2019. Figura extraída de [www.idf.org](http://www.idf.org) (International Diabetes Federation, 2019).

## 1.2. Miocardiopatía diabética

La miocardiopatía diabética (MCD) es un trastorno generado en el músculo cardíaco de pacientes diabéticos. Se caracteriza por el agrandamiento de las células cardíacas (Fonarow & Srikanthan, 2006), engrosamiento de la pared ventricular con disminución del volumen diastólico (volumen de sangre que llena el ventrículo izquierdo) e hipertrofia del ventrículo (Rubler et al., 1972; Stone et al., 1989), aumento en la glicosilación de proteínas contráctiles (Kahn et al., 2006; Murarka & Movahed, 2010), acumulación de lípidos en las células del corazón (cardiomiocitos) (Yagy et al., 2003; Sharma et al., 2004) y muerte celular (Cai & Kang, 2003), entre otras. Dichos cambios en la estructura y función del miocardio, no se atribuyen a la enfermedad arterial coronaria o la hipertensión (siendo estos los principales contribuyentes al desarrollo de la insuficiencia cardíaca) (Boudina & Abel, 2010), sino a características propias de la DM (Wang et al., 2006). Rubler y colaboradores utilizaron por primera vez el término de "miocardiopatía diabética" para describir este tipo de enfermedad, ya que encontraron cuatro pacientes diabéticos con insuficiencia cardíaca pero con arterias coronarias normales. Por esta razón los autores definieron la MCD como una disfunción ventricular que ocurre independientemente de la arteriosclerosis y la hipertensión (Rubler et al., 1972). En 1979, el *Framingham Heart Study* demostró que los pacientes diabéticos presentan un riesgo a

desarrollar MCD dos a cinco veces mayor que los pacientes no diabéticos de la misma edad (Kannel & McGee, 1979; Nichols et al., 2001).

En la DM1, la autoinmunidad y la hiperglicemia podrían ser las responsables de generar la MCD, mientras que para la DM2 podrían ser la hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y otros factores de riesgo como obesidad, hipertensión y dislipemia (Lee et al., 2019).

Se ha comprobado, además, que la MCD provoca una reducción de la elasticidad o endurecimiento del tejido cardíaco (rigidez), generando una disminución en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (Poornima et al., 2006; Murarka & Movahed, 2010; Battiprolu et al., 2013). Aún más, experimentos realizados en cardiomiocitos provenientes de ratones DM1 han demostrado que dicha pérdida de elasticidad se debe, en parte, a modificaciones en el citoesqueleto celular (Qiu et al., 2010; Benech et al., 2014, 2015).

### 1.3. Características del corazón diabético

El corazón es el órgano de mayor consumo de energía en el organismo por lo que para satisfacer las altas demandas necesita de una producción constante y abundante de ATP (Knaapen et al., 2007). Pequeñas variaciones en la generación de energía o utilización de diferentes sustratos, como las observadas en pacientes diabéticos, pueden tener un impacto sustancial en los niveles de energía obtenidos que pueden llevar a disfunción contráctil (Lopaschuk, 2002). En condiciones fisiológicas el corazón utiliza ácidos grasos (AG) y carbohidratos como fuente de energía para la producción de ATP (Cai & Kang, 2003). En los corazones diabéticos las alteraciones del metabolismo energético observadas son: disminución de la absorción y oxidación de los carbohidratos y un aumento en el metabolismo de los AG (Amaral & Okonko, 2015).

Los AG circulan en el plasma mayormente como lipoproteínas y en menor medida unidos a la albumina. Estos AG ingresan a los cardiomiocitos mediante transportadores específicos (FABP, FATP o CD36) y una vez en el citosol la mayoría (70 - 90 %) ingresa a las mitocondrias mediante la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I). Allí convierte los AG en Acetil-CoA (mediante la beta oxidación), e ingresa en el ciclo de Krebs para finalizar con la generación de ATP (Lopaschuk, 2002; Amaral & Okonko, 2015). La oxidación de AG en el corazón sano es responsable de casi el 70 % de la producción de energía (Lopaschuk, 1996). En el corazón diabético y sobre todo en DM2, al aumentar la concentración de AG en sangre su metabolismo se ve aumentado (Lopaschuk, 2002) siendo responsable de hasta un 100 % de la producción de ATP (Lopaschuk, 1996; Cai & Kang, 2003). La abundancia de AG miocárdicos activa al receptor de peroxisoma

proliferador-activado alfa (PPAR-alfa) el cual regula positivamente la absorción y utilización de los AG y suprime la oxidación de los carbohidratos (Amaral & Okonko, 2015). A pesar de ello esta vía no tan eficiente ya que requiere 10 % más de O<sub>2</sub> para producir la misma cantidad de ATP. La glucosa es el principal carbohidrato y su oxidación representa del 10 - 30 % de la producción del ATP cardiaco (Lopaschuk, 2002). Se inicia por la entrada de glucosa en los cardiomiocitos a través del transportador de glucosa dependiente de insulina denominado GLUT (GLUT 1 y 4) (Barsotti et al., 2009). El 85 % de la glucosa ingresa en glucolisis generando piruvato que luego se transformará en Acetil-CoA para ingresar en el ciclo de Krebs e inducir la síntesis de ATP (Amaral & Okonko, 2015). La primera alteración del metabolismo de la glucosa que se ha visto en los cardiomiocitos diabéticos, viene dada por una disminución del transporte de glucosa debido a una expresión reducida de la proteína GLUT4 (Lopaschuk, 2002). Esto conduce a una disminución de la glucolisis y de la oxidación de la glucosa de hasta un 30 – 40% en pacientes con DM2 (Amaral & Okonko, 2015). Una mayor oxidación de los AG conduce a elevadas concentraciones de citrato, el cual inhibe a la enzima fosfofructoquinasa I, perteneciente a la glucolisis, induciendo a un acumulo de glucosa 6 fosfato (Lopaschuk, 2002). Además, el alto contenido de AG circulantes producen una marcada reducción en la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH, enzima clave y paso limitante en la oxidación de la glucosa) (Lopaschuk, 2002). Es decir que a pesar de la disminución de GLUT4 y de la oxidación de la glucosa se observa un mayor contenido de glucosa intracelular (Wall & Lopaschuk, 1989; Lopaschuk, 1996; Jia et al., 2018).

La mayor oxidación de los AG da como resultado la acumulación de lípidos en forma de cuerpos lipídicos (Sharma et al., 2004; Szczepaniak et al., 2007) como se observó en modelos animales (Paulson & Crass, 1982; Chattopadhyay et al., 1990; Chiu et al., 2001) y en pacientes humanos (Avogaro et al., 1990; Barsotti et al., 2009). En condiciones fisiológicas los AG son necesarios para una correcta liberación de la insulina por las células beta del páncreas (Itoh et al., 2003). Sin embargo en la hiperlipidemia el organismo disminuye la capacidad de respuesta a la misma, induciendo lo que se conoce como resistencia a la insulina.

#### 1.4. Modelos de experimentación de DM

A pesar de los numerosos estudios sobre la fisiopatología de la DM, aún persisten múltiples incógnitas acerca de los cambios a nivel fisiológico y molecular que dan lugar a la MCD. Existen muchas dificultades para el estudio de la DM en los seres humanos debido a una amplia variedad de razones como las consideraciones éticas y la relativa inaccesibilidad a órganos o tejidos vitales

de los pacientes.

Actualmente el uso de modelos de experimentación, como los animales o líneas celulares, permite profundizar el conocimiento sobre esta patología presentando muchas ventajas en su investigación. Para el estudio de la DM1 en los animales de experimentación, se utilizan drogas que producen necrosis selectiva de las células beta del páncreas generando deficiencia de insulina (Etuk, 2010). Las drogas más utilizadas son estreptozotocina (STZ) en una o varias dosis (Furman, 2015; Romanelli et al., 2020) o aloxano en variadas dosis (Viana et al., 2004). Además se han utilizado modelos con modificaciones genéticas de DM1, ya que evitan la interferencia y los efectos secundarios de las drogas usadas y modelos con pancreatectomía (extirpación completa del páncreas) (Etuk, 2010). Para el estudio de la DM2 en modelos de animales, se utilizan principalmente la alimentación con dietas ricas en grasas y azúcares para obtener rápidamente animales obesos y modelos genéticos que presentan mutaciones espontáneas en un solo gen de leptina o de su receptor (Winzell & Ahrén, 2004; Wang & Liao, 2012; Baribault, 2016). Estos modelos han permitido realizar diversas investigaciones en corazones u otros órganos y han ayudado a conocer un poco más sobre la fisiopatología de la diabetes. Nuestro laboratorio trabajó y trabaja actualmente con un modelo animal de DM1, inducido por inyección intraperitoneal de una única dosis de STZ, en ratones machos de la cepa CD1. Estudios realizados en estos animales luego de tres meses de patología, han permitido detectar en el miocardio y en cardiomiocitos diabéticos la rigidez celular y la desorganización espacial de los filamentos de actina y del colágeno intersticial, entre otros fenómenos (Benech et al., 2014; Romanelli et al., 2020). Sin embargo, la experimentación con animales es costosa y laboriosa ya que requiere de insumos y cuidados estrictos durante largos períodos. Además, se encuentra limitada por el número de animales utilizados para las réplicas y no permiten evaluar, por ejemplo, los efectos producidos por la hiperglicemia crónica independientemente del resto de los factores. Por esta razón, otros modelos experimentales muy usados son aquellos que utilizan líneas celulares y que emulan la diabetes *in vitro* (Dyntar et al., 2001; Cai & Kang, 2003; Michaelson et al., 2014). Los cultivos celulares permiten controlar de manera precisa variables del medio tales como pH, temperatura, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, niveles de glucosa, etc., y permiten obtener un elevado número de réplicas idénticas con una producción continua. Un modelo muy utilizado para el estudio de la DM es la línea celular H9c2 (primera línea celular derivada de corazón) que proviene de células del ventrículo izquierdo de embriones de rata (Kimes & Brandt, 1976). Cai y colaboradores (2002) observaron en un modelo animal que los corazones diabéticos presentaban muerte celular apoptótica y constataron activación de la caspasa 3 por liberación del citocromo c mitocondrial. Sin embargo, para poder explorar si la apoptosis se encontraba directamente relacionada con la hiperglicemia los autores utilizaron el modelo celular H9c2 expuesto a altos

niveles de glucosa. Pudieron evidenciar que tanto la apoptosis como la activación de la caspasa 3 con liberación del citocromo c son consecuencias directas de la hiperglicemia (Cai et al., 2002). La mayoría de los modelos sólo estudian el efecto de la hiperglicemia con variadas concentraciones de glucosa, pero son pocos los trabajos que centran su modelo de investigación en condiciones hiperglicémicas e hiperlipidémicas (modelo que emula las condiciones de DM2).

### 1.5. Hiperglicemia - hiperlipidemia

Las principales complicaciones que se observan en la DM son producidas por la hiperglicemia, la inflamación y la hiperlipidemia (Pappachan et al., 2013; Jia et al., 2016).

La hiperglicemia, como factor de riesgo independiente, juega un rol importante en el desarrollo de la MCD (Singh et al., 2000; O'Keefe & Bell, 2007) tanto para la DM1 como para la DM2 (Wang et al., 2006). Es sabido que instalada de manera crónica genera anomalías metabólicas, defectos subcelulares y una expresión anormal de genes (Depre et al., 2000; Pawelczyk et al., 2000; Cai & Kang, 2001) resultando en un aumento en la muerte celular de los cardiomiocitos (Swynghedauw, 1999; Feuerstein & Young, 2000; Cai & Kang, 2001). Las altas concentraciones de glucosa generan niveles elevados de ROS lo que conduce a daños en el ADN e inhibición de la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y productos de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) los cuales también participan en la inducción de MCD (Wang et al., 2006). Proteínas como el colágeno y la elastina son vulnerables a la acumulación de AGEs (Susic et al., 2004) generando enlaces cruzados que inducen rigidez en el miocardio (Wang et al., 2006; Van Heerebeek et al., 2008; Benech et al., 2014).

La DM2 se encuentra altamente relacionada con la hiperlipidemia. El aumento de lípidos en forma de cuerpos lipídicos desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca y la MCD (Zhou et al., 2000; Chiu et al., 2001; Grynberg, 2005). La acumulación de lípidos (lipotoxicidad) genera problemas metabólicos y en la contractilidad de los miocitos, además de promover la apoptosis de los cardiomiocitos a través del aumento de la producción de ROS y del estrés del retículo endoplasmático (afectando el plegamiento de proteínas y otras modificaciones postraduccionales) (Jia et al., 2016). En presencia de ROS, las proteínas, el ADN y los componentes de la membrana lipídica se dañan generando a nivel tisular acumulación de fibrosis. Esto, a largo plazo, promueve la disfunción diastólica pudiendo progresar a insuficiencia cardíaca (Jia et al., 2016). Los niveles elevados de ROS se han visto implicados en hipertrofia miocárdica, acoplamiento defectuoso de excitación-contracción e ineficiencia cardíaca (Amaral & Okonko, 2015). Los lípidos que circulan mayormente en sangre de pacientes diabéticos son

los ácidos mirístico, esteárico y palmítico siendo este último el que presenta el rol más importante (Manco et al., 2000; Lovejoy et al., 2002; Forouhi et al., 2014). El ácido palmítico (PA, por sus siglas en inglés) es un AG saturado de 16 carbonos presente en aceites, provenientes de animales y plantas. Su exceso en sangre induce apoptosis en una gran variedad de células como neuronas (Hsiao et al., 2014), células de la granulosa (Mu et al., 2001), hepatocitos (Mei et al., 2011), células endoteliales (Jiang et al., 2010) y cardiomiocitos (Listenberger & Schaffer, 2002; Leroy et al., 2008). La acumulación de PA produce un aumento en la producción de ROS (Wang et al., 2006) y puede promover, también, la producción de metabolitos intermedios como la ceramida y el diacilglicerol resultando en la apoptosis de los cardiomiocitos directamente o mediante citocromo C. Estos eventos son la base de la lipotoxicidad (Poornima et al., 2006; Amaral & Okonko, 2015). La acumulación de AG en el tejido cardíaco, la lipotoxicidad asociada y la disminución del metabolismo de la glucosa conducen a alteraciones morfológicas y estructurales, así como a un deterioro del rendimiento del miocardio conduciendo a una MCD (Jia et al., 2016). Se define glicolipotoxicidad como la combinación de los efectos nocivos de la hiperglicemia crónica y la hiperlipidemia (Boden, 2001; Kahn et al., 2006; Savage et al., 2007; Walther & Farese, 2012).

## 1.6. Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto constituye una compleja red tridimensional de filamentos proteicos encargados de proveer estructura, determinar la morfología celular y la organización interna de las células. A pesar de que su nombre sugiere cierta rigidez, el citoesqueleto es extremadamente dinámico (Birchmeier, 1984; Dominguez & Holmes, 2011). A través de los procesos de polimerización/despolimerización, el citoesqueleto es capaz de ser el efector de señales intra y extracelulares, modificando su red, en función de las necesidades celulares. Está constituido primordialmente de proteínas filamentosas que forman tres clases principales de estructuras: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios (Birchmeier, 1984).

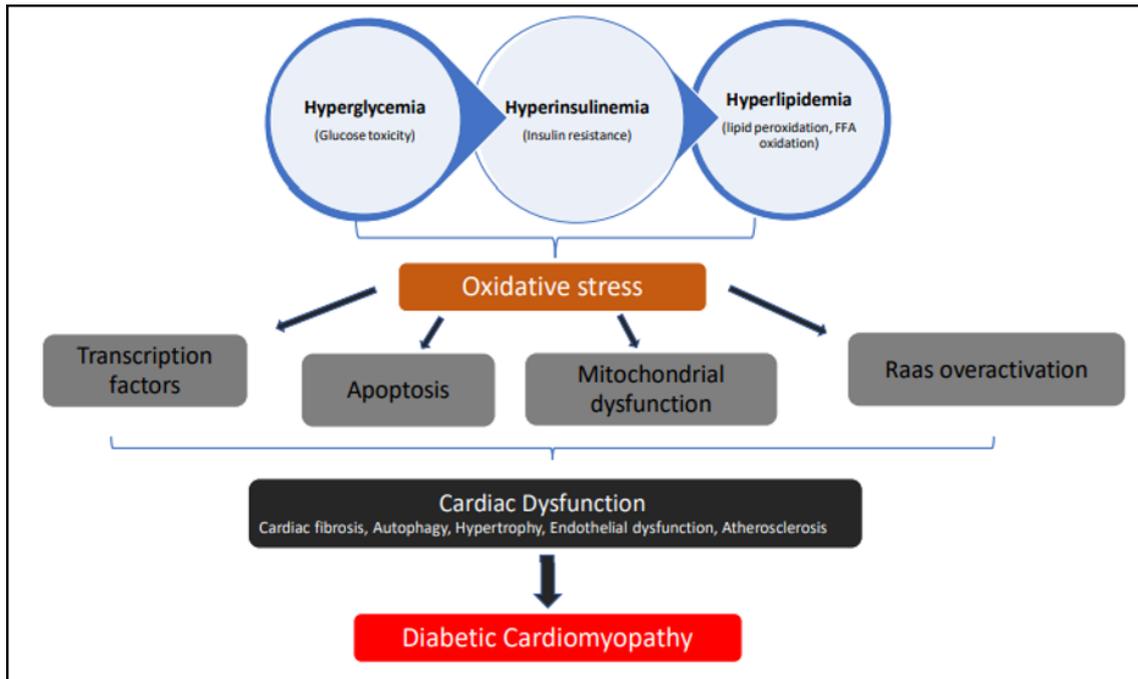
La actina, es el componente principal del citoesqueleto de las células musculares, y juega un rol fundamental en una gran variedad de procesos celulares tales como motilidad (Svitkina, 2018), contracción y transporte intracelular (Titus, 2018), citocinesis (Glotzer, 2017), adhesión y morfología celular (Dominguez & Holmes, 2011; Svitkina, 2018). Existe en dos formas: actina monomérica (actina G) y actina filamentosa (actina F) la cual se encuentra involucrada en la mayoría de las funciones biológicas (Wegner & Isenberg, 1983; Korn et al., 1987; Dominguez &

Holmes, 2011). Los filamentos de actina presentan un diámetro de entre 7-10 nm dependiendo del método de análisis (Grazi, 1997) y se forman por la polimerización de la proteína globular actina G (42 kDa) en un proceso dependiente de ATP. Existe poca evidencia experimental de que la DM afecta al citoesqueleto de actina (Cooper et al., 2004). Varios autores han comprobado que existe una disminución de la actina F en tejidos de ratas diabéticas (Nemoto et al., 2006; Zhang et al., 2008). Romanelli y colaboradores demostraron que la organización espacial de la actina F en el tejido cardíaco se veía severamente alterada, observándose una disminución de las áreas ocupadas por la actina F en los ratones diabéticos (Romanelli et al., 2020).

### 1.7. Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular programada (Kerr et al., 1972) que puede ser inducida por ciertos estímulos ambientales. Se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos que incluyen: reorganización del núcleo, despolimerización del citoesqueleto formando protuberancias en la membrana plasmática (*blebbing*) y formación de cuerpos apoptóticos, entre otros (Wyllie et al., 1981; Earnshaw, 1995).

Los miocitos cardíacos son las células más susceptibles a la muerte celular (Frustaci et al., 2000) y se ha demostrado que no solo presentan apoptosis en las fases tempranas sino que también en las fases tardías de la DM (Cai & Kang, 2003). Como se mencionó previamente, la hiperglicemia y la hiperlipidemia son factores independientes que generan apoptosis en el miocardio diabético (Cai et al., 2002; Wang et al., 2006). En la DM ambos conducen a la generación de ROS, desencadenando la producción de citoquinas, proteínas apoptóticas y factores de transcripción, que conducen a la inflamación, disfunción mitocondrial, sobreactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la apoptosis en corazones diabéticos (Sari et al., 2010; Huynh et al., 2013; Miranda-Diaz et al., 2016). Es sabido que la generación de ROS activa la caspasa 3 por liberación mitocondrial del citocromo C induciendo la apoptosis por la vía intrínseca (Cai et al., 2002). Todos estos factores comienzan generando una disfunción cardíaca que finaliza en el desarrollo de la MCD (Althunibat et al., 2019; Li et al., 2019)



**Figura 2.- Progresión de la MCD.** La hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia conducen a estrés oxidativo generando una serie de efectos como la apoptosis las cuales conducen a la MCD. Figura extraída de (Alabi et al., 2020).

### 1.8. Problema de investigación

Previamente, nuestro grupo de investigación utilizó la línea celular derivada de ventrículo izquierdo de embriones de rata H9c2 (Watkins et al., 2011; Guan et al., 2019; Pu et al., 2019) como modelo *in vitro* que emula la diabetes, incubando las células en un medio de hiperglicemia e hiperlipidemia compuesto por DMEM *High Glucose* (25 mM glucosa) y 500  $\mu$ M de PA adicionado (Alberro, 2016). Utilizando este modelo se pudo comprobar que la condición 25 mM glucosa + PA antes descrita presentó cambios en la distribución celular del citoesqueleto de actina (Alberro, 2016). El cambio detectado fue cualitativo y no cuantitativo debido a la variabilidad en los resultados obtenidos con el medio hiperglicémico e hiperlipidémico utilizado.

En el presente trabajo, se utilizó la línea celular H9c2 y se realizó un ajuste para determinar las condiciones experimentales (medio hiperglicémico y tiempo de incubación) que permitiera realizar una evaluación cuantitativa de los cambios morfo-fisiológicos generados por la incubación de las células en este medio. Particularmente, poder cuantificar los cambios en la disposición espacial del citoesqueleto de actina y estudiar su posible relación con la rigidez celular (nanomecánica celular).

## 2. HIPÓTESIS

La hiperglicemia (33 mM glucosa) e hiperlipidemia (500  $\mu$ M PA) actúan sinérgicamente e inducen cambios morfo-fisiológicos en la línea celular H9c2 que pueden ser cuantificados y que podrían estar relacionados con la fisiopatología de la miocardiopatía diabética.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Cuantificar y analizar los cambios morfo-fisiológicos inducidos por la sinergia entre la glucosa y el ácido palmítico en cultivos celulares de la línea H9c2.

### 3.2. Objetivos específicos

- Ajustar la concentración de glucosa para emular las condiciones de hiperglicemia equivalentes a la DM
- Diferenciar y cuantificar tipos de la muerte celular promovida por la condición hiperglicémica-hiperlipidémica
- Analizar y cuantificar la morfología celular (alto, ancho y largo) en condiciones control e hiperglicémicas-hiperlipidémicas
- Cuantificar la expresión de actina F y analizar su disposición espacial en condiciones control e hiperglicémicas-hiperlipidémicas
- Analizar la expresión proteica de la actina total en condiciones control e hiperglicémicas-hiperlipidémicas
- Analizar y cuantificar la nanomecánica celular en condiciones control e hiperglicémicas-hiperlipidémicas

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cultivos celulares

Las células H9c2 derivadas del ventrículo izquierdo de embriones de rata fueron descritas en 1976 por Kimes y Brant (Kimes & Brandt, 1976). Corresponden a una línea celular finita de mioblastos que crecen en monocapa. Para los experimentos estas células fueron cultivadas en medio DMEM Low Glucose (5.5 mM glucosa, Capricorn Scientific DMEM-LPXA) con 10% de suero fetal bovino (SFB, Capricorn Scientific FBS-11A), 100 U/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomina. Se utilizaron como sustratos cajas de Petri, en su mayoría, de 50mm y las células fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Ya que una confluencia mayor al 80% genera células diferenciadas, multinucleadas, alargadas y ramificadas, la confluencia utilizada para todos los experimentos fue del 70 % aproximadamente. Para realizar experimentos independientes se utilizaron diferentes ampollas, con el mismo pasaje (10 - 14), las cuales se conservaron a -80 °C.

Como condición control, se utilizó 5.5 mM glucosa y para la condición hiperglicémica las concentraciones de glucosa utilizadas fueron de 25 mM, o 33 mM. Para las últimas concentraciones se utilizó el medio DMEM *High Glucose* (25 mM glucosa), y para alcanzar el nivel de 33 mM glucosa, se adicionaron los 8 mM restantes utilizando D-glucosa (*Sigma-Aldrich*). Como medio hiperlipidémico se incorporó, al medio hiperglicémico (25 mM y 33 mM glucosa), 500 µM de PA (*Sigma-Aldrich*) en concentración 500 µM en un complejo con 1% de seroalbúmina bovina (BSA, A3675, *Sigma-Aldrich*) (Cousin et al. 2001; Dyntar et al. 2001; Leroy et al. 2008; Michaelson, et al. 2014)

### 4.2. Complejo PA/BSA

El PA es hidrofóbico por lo que para su disolución en el medio de cultivo es necesario conjugarlo con una sustancia que facilite su biodisponibilidad. En este caso utilizamos BSA.

Se prepararon dos soluciones:

- Solución 1: Solución madre de 100 mM PA en 0.1 M de NaOH en baño a 70 °C con agitación.
- Solución 2: Solución de BSA al 10 % m/v en agua destilada, en baño a 55 °C y con agitación.

Para obtener el complejo PA/BSA se mezcló 0.5 mL de la solución 1 con 9.5 mL de la solución 2 obteniendo una solución stock de 5 mM PA /10 % BSA. A continuación la misma se dejó enfriar y se filtró con membrana miliporo (0.22  $\mu$ m) en cámara de flujo laminar.

El medio hiperglicémico (25 mM o 33 mM glucosa) e hiperlipidémico fue generado adicionándole 1/10 de la solución stock (5 mM PA /10 % BSA), para obtener una concentración final de PA de 500  $\mu$ M/ 1 % BSA (Cousin et al., 2001).

### 4.3. Análisis de la muerte celular

Se realizó un análisis temporal con el objetivo de determinar el tiempo de cultivo óptimo para llevar a cabo los objetivos de esta tesis. Dicho análisis se realizó únicamente en las condiciones control, 25 mM glucosa + PA (datos no mostrados) y 33 mM glucosa + PA a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h de incubación.

El análisis de la muerte celular se realizó en las siguientes condiciones: a) control (5.5 mM glucosa), b) 5.5 mM glucosa + PA, c) 25 mM glucosa, d) 25 mM glucosa + PA, e) 33 mM glucosa, f) 33 mM glucosa + PA. En todos los casos el análisis fue realizado a las 72 h. Para excluir el efecto hiperosmolar se incluyó un control con manitol (*Sigma-Aldrich*) a una concentración 33 mM.

Se recolectó el sobrenadante y las células en monocapa fueron lavadas con PBS 1X para luego ser decoladas empleando tripsina/EDTA (0.05 % en DPBS 1X) por 5 min a 37 °C. Posteriormente, se resuspendió en el medio *Low Glucose* y se colocó en el tubo de centrifuga con el sobrenadante previamente recolectado al decolar las células con tripsina. Se procedió a centrifugar a 800 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS 1X.

La viabilidad celular fue analizada mediante la incorporación de un agente intercalante del ADN: Ioduro de propidio (IP) (2  $\mu$ g/mL) durante 5 min en oscuridad. Dicho compuesto no se une al ADN/ARN de las células cuya membrana se encuentra íntegra, por lo que su ingreso en la célula determina que la célula está en proceso de muerte celular o muerta. Por último, se cargaron 10  $\mu$ L de la solución en una cámara de Neubauer y se procedió a contar la cantidad de células totales por microscopía de contraste de fases y las células muertas empleando microscopía de epifluorescencia (Olympus IX-81). Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 200 células en cada grupo. Los resultados fueron expresados como porcentaje de muerte celular. El pico máximo de la longitud de onda de excitación para IP es 543 nm, mientras que el de emisión corresponde a 617 nm. Cada experimento fue realizado por triplicado.

#### 4.4. Análisis del tipo de muerte celular mediante la técnica de la triple tinción de células en suspensión

La triple tinción es una técnica muy utilizada para la evaluación del tipo de muerte celular (Turku et al., 2017; Tong et al., 2018; Berthier et al., 2019). La combinación de dos fluoróforos como IP, Hoechst (intercalantes de ADN) y un tercero como el diacetato de fluoresceína (FDA) permiten visualizar la integridad de la membrana y el estadio de apoptosis.

##### Características de los fluorocromos:

- IP: Color rojo. Intercalante del ADN. Se une al ADN de las células cuando las membranas se encuentran dañadas.
- FDA: Color verde. Se activa transformándose en una sustancia fluorescente por una esterasa celular presente en las membranas íntegras, razón por la cual es un indicador de la integridad de la membrana plasmática.
- Hoechst 33342 supravital: Color azul. Intercalante del ADN. Se observa la eu y heterocromatina. Es un indicador de la morfología nuclear siendo capaz de diferenciar entre una morfología normal (núcleos íntegros) y una apoptótica (cromatina compacta con núcleos heterocromáticos).

Se preparó una solución stock de 50  $\mu\text{L}$ :

Stock	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
IP (1 mg/mL)	2.5
Hoechst 33342 (1 mg/mL en agua)	7.5
FDA (1.5 mg/mL en DMSO)	4.0
PBS 1X	36.0

Las células fueron cultivadas en las condiciones control y 33 mM glucosa + PA durante 72 h en placas de cultivo de 50 mm. Luego de ese tiempo, las células fueron decoladas utilizando tripsina y centrifugadas a 800 g durante 5 min con el medio de cultivo en el que crecieron las células, de manera de incorporar a la medición las células muertas que se desprendieron de la placa. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. Posteriormente se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de la solución stock con los fluorocromos y se incubó durante 6 min a 37 °C en oscuridad. Luego se colocaron 10  $\mu\text{L}$  en portaobjetos e inmediatamente fueron visualizados con Microscopía Láser Confocal (MLC) ya que al cabo de unos min la fluorescencia comienza a disminuir. Protocolo basado en De Santis et al., 2001.

La longitud de onda ( $\lambda$ ) de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) máxima para los fluoróforos utilizados es la siguiente: IP ( $\lambda_{exc}$ : 543 nm;  $\lambda_{em}$ : 617 nm), FDA ( $\lambda_{exc}$ : 490 nm;  $\lambda_{em}$ : 526 nm), Hoechst 33342 ( $\lambda_{exc}$ : 343 nm;  $\lambda_{em}$ : 483 nm).

Se clasificaron en células vivas, apoptóticas o necróticas (Tabla 1) y se analizaron un total de 100 células en tres experimentos independientes para cada condición. Los datos obtenidos fueron representados como porcentaje de muerte celular apoptótica en función de la muerte celular total de cada experimento.

**Tabla 1.- Características celulares después de la triple tinción.** Tabla basada en (De Santis et al., 2001; Turku et al., 2017)

Tipo de célula	Visualización con la triple tinción
<b>Células vivas</b>	Célula verde y núcleo azul normal
<b>Apoptóticas tempranas</b>	Célula verde y núcleo de tamaño igual o menor al normal, con gránulos heterocromáticos. Presencia de protuberancias citoplasmáticas ( <i>blebbing</i> )
<b>Apoptóticas tardías</b>	Célula roja y núcleo de tamaño igual o menor al normal, con gránulos heterocromáticos.
<b>Necróticas</b>	Célula roja y núcleo de apariencia normal

#### 4.5. Análisis de largo y ancho celular

Se realizaron cultivos en las mismas condiciones descritas en la sección de análisis de muerte celular (sección 4.3) y se adquirieron imágenes de microscopía óptica de luz transmitida (*Nikon Diaphot 300*) utilizando el software *Micrometrics SE Premium* para cada una de las condiciones. Se analizaron los cultivos a los distintos tiempos de incubación (0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h) para las condiciones control y 33 mM glucosa + PA mientras que para el resto de las condiciones se utilizaron únicamente los cultivos a 72 h. Se obtuvo el largo y ancho celular mediante la herramienta *straight* del software *ImageJ* (NIH, USA). Se consideró como largo la mayor distancia entre dos puntos que se encuentran en los extremos distales de la célula y como ancho, la distancia que conecta los puntos medios del largo celular. Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 150 células en cada grupo.

## 4.6. Análisis del citoesqueleto de actina

El estudio de la actina filamentosa (actina F) se realizó utilizando faloidina conjugada con rodamina (*Thermo Fisher Scientific* R415). La faloidina es un heptapéptido bicíclico muy tóxico, aislado del hongo *Amanita phalloides*. Es muy utilizado para marcar la actina F de las células eucariotas ya que presenta alta afinidad por ella (Wieland, 1986; Romanelli et al., 2020). Varios trabajos han utilizado a la faloidina como marcador de los filamentos de actina y es debido a que se une fuertemente a la actina F pero muy débilmente a la actina G (De Vries & Wieland, 1978; Barden et al., 1987).

Se cultivaron las células sobre cubreobjetos, previamente esterilizados en autoclave, dentro de placas de cultivo con el medio control. Luego de 24 h se incorporaron a los cultivos los medios a) control y b) 33 mM glucosa + PA. A las 72 h de incubación, el medio fue descartado y las células fueron fijadas utilizando paraformaldehído (PFA, 4% en PBS 1X) / 0.2 % Tritón X-100 (*Sigma-Aldrich*) durante 10 min a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X y luego incubadas durante 20 min con 6.6  $\mu$ M faloidina rodamina (diluida en metanol, R415 *Invitrogen*) a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron tres lavados nuevamente con PBS 1X de manera de eliminar la faloidina no conjugada e inmediatamente las muestras fueron montadas con 50 % de glicerol-DAPI (1  $\mu$ g/mL).

Las imágenes fueron adquiridas a una resolución de 1024 x 1024, con un objetivo de 40X, utilizando MLC (*Zeiss* 800). El pico máximo de la longitud de onda de excitación para la rodamina es de 540 nm, mientras que el de emisión corresponde a 565 nm. Se realizaron tres experimentos independientes. En todas las imágenes se mantuvieron constantes los parámetros de la adquisición como PMT (fotomultiplicador), intensidad del láser, ganancia y *offset*.

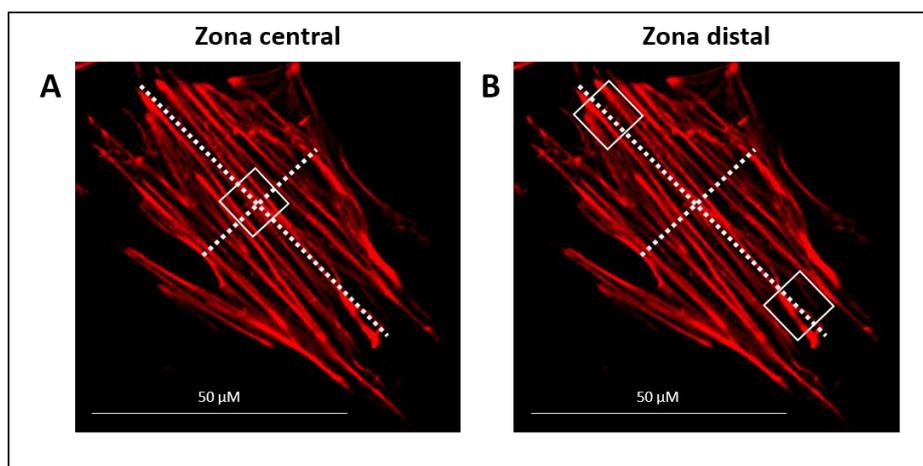
### 4.6.1. Cuantificación de la actina F total

Las imágenes adquiridas por MLC en el plano medio de las células fueron cuantificadas dando menor diferencia significativa (con  $p < 0.05$  en un test Mann-Whitney) en la condición 33 mM glucosa + PA en comparación con la condición control. Sin embargo, al notar que las células incubadas en la condición 33 mM glucosa + PA se tornaban más altas (ver análisis de células fijadas por Microscopia de Fuerza Atómica; sección 4.9.1), en comparación con las células control, se realizó una cuantificación tridimensional de las fibras de actina F. Se adquirieron, entonces, imágenes por MLC en *stacks* a intervalos de 0.5  $\mu$ m con un objetivo 40X.

Las imágenes fueron analizadas con el software *ImageJ* utilizando la herramienta *Z project*. Esta herramienta permitió sumar la fluorescencia de todos los planos del *stack* obteniendo así una sola imagen final. Se delimitó cada célula y se obtuvo un valor de intensidad de fluorescencia. Luego se dividió la fluorescencia total por el volumen (área de la célula x la cantidad de *stacks*) de manera de obtener un valor de intensidad de fluorescencia/ $\mu\text{m}^3$  para cada célula. Se analizaron un total de 150 células para cada condición.

#### 4.6.2. Cuantificación de la disposición espacial de la actina F

De las imágenes finales obtenidas de los *stacks*, se trazó un eje a lo largo de la célula (largo celular) y un eje perpendicular al mismo conectando los puntos medios del largo, determinando así, el ancho celular. Se definió el cruce de ambos ejes como el punto central de la célula y en dicha región, con centro en el punto de intersección, se trazó un cuadrado de  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  determinando la zona central. A su vez, sobre los extremos distales del eje longitudinal se trazaron dos cuadrados más de  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ , uno en cada extremo de la célula, determinando así la zona distal, tal como se muestra en la Fig. 3.



**Figura 3.- Determinación de la zona central y distal.** Imágenes representativas de MLC, adquiridas con un aumento de 40x. A) Determinación de la zona central de la célula, y realización del cuadrado  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  en dicha zona B) Determinación de los cuadrados  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  en la zona distal de la célula.

En cada cuadrado se cuantificó la cantidad de filamentos de actina y la distancia entre los mismos. Sin bien la mayoría de las células son afectadas por la condición 33 mM glucosa + PA se utilizaron células cuyo largo era menor a  $60\ \mu\text{m}$  (siendo el largo normal  $80\ \mu\text{m}$  aproximadamente). Este criterio fue adoptado en base a los resultados obtenidos del análisis de la morfología celular (sección 4.5) de manera de analizar el cambio en la disposición espacial solo en aquellas células que se ven afectadas por la condición 33 mM glucosa + PA. Se realizaron

tres experimentos independientes y fueron analizadas un total de 150 células para cada condición.

#### 4.7. Análisis de la expresión proteica por Western blot

Las células fueron incubadas durante 72 h en las condiciones control, 5.5 mM glucosa + PA, 33 mM glucosa y 33 mM glucosa + PA. Luego se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS 1X frío. Las células fueron tratadas en las placas de cultivo durante 30 min a 4 °C en agitación con 700 µL de buffer de lisis (50 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 % glicerol, 1 % Tritón X-100, 0.1 % Tween 20, 0.1 mM PMSF, 0.2 mM ATP y un cóctel inhibidor de proteasas - SigmaFast™- concentración final 1X, pH 7.4 (según indicaciones del fabricante)). Los homogeneizados de proteínas fueron sonicados siete veces a pulsos de 0.03 s y la concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Las muestras fueron analizadas en geles de 10 % poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Se sembraron 30 µg de proteínas totales de cada una de las muestras y se utilizó el marcador estándar de peso molecular Precision Plus Protein Western C Standards (161-0376, Bio-Rad Laboratories, Inc.).

La electroforesis se llevó a cabo durante 60 min a 100 V, con el *buffer* de corrida (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1 % SDS). Luego se procedió a transferir las proteínas a una membrana de PVDF durante 90 min a 350 mA y a 4 °C con el *buffer* de transferencia (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1 % SDS y metanol 20 %). Finalizada la transferencia, la membrana fue bloqueada con TBS (*buffer* Tris salino: 0.02 M Trizma HCl, 0.1 M NaCl, pH=7.6) 1X con 0.1 % Tween (TBS-T) + 5 % de leche descremada en polvo durante 60 min a temperatura ambiente y con agitación. Se realizaron luego tres lavados con TBS-T para descartar el exceso de leche en polvo. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-pan-actina (Ab 11003, Abcam) en una dilución 1/500 a 4 °C, *overnight* con agitación continua. Inmediatamente, se descartó el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados con TBS-T durante 10 min cada uno. Por último, se incubó con el anticuerpo secundario policlonal – IgG DyLight® 650 (Ab 96922, Abcam) en una dilución 1/250 durante 60 min a temperatura ambiente y con agitación. La detección de las bandas obtenidas se realizó en un equipo *High Performance Luminescent Image Analyser* (FLA-9000, Fujifilm).

Como control de carga se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) cuyo peso molecular corresponde a 37 KDa. Por tener un peso molecular similar a la actina, se procedió a

disociar y eliminar los anticuerpos utilizados anteriormente con un *buffer de stripping* (200 mM glicina, 0.1 % SDS, 1 % Tween 20, pH=2.2). Se realizó el mismo procedimiento que con el anticuerpo anti-pan-actina, pero en este caso se incubó con el anticuerpo primario monoclonal para GAPDH (Ab 181602, Abcam) en una dilución 1/5000 y la membrana fue revelada con el mismo anticuerpo secundario. Se analizaron tres muestras de cada condición y el análisis fue realizado por triplicado. Como control negativo se incubó solamente con el anticuerpo secundario (datos no mostrados).

Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente utilizando 1000  $\mu$ L de *buffer* de lisis durante 30 min a 4 °C para las muestras: a) control, b) 5.5 mM glucosa + PA, c) 33 mM glucosa y d) 33 mM glucosa + PA. La cuantificación de las bandas se llevó a cabo con la herramienta *Gels (Plot Lanes)* del software *ImageJ* y los valores obtenidos fueron normalizados con los del control de carga. Se realizaron tres experimentos independientes.

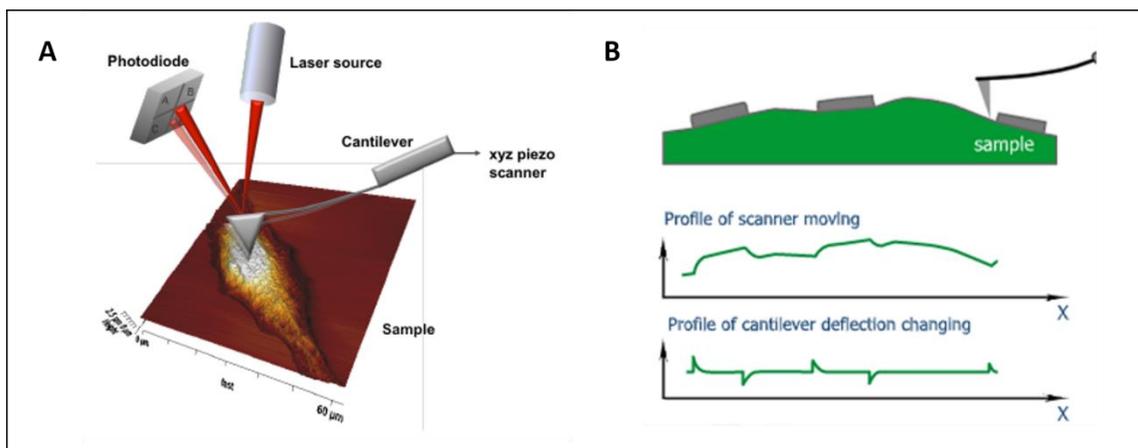
#### 4.8. Cálculo del peso molecular aparente

La estimación del peso molecular de las bandas obtenidas para la condición 33 mM glucosa + PA se llevó a cabo utilizando el método descrito por Shapiro et al. (1967). Se repitió el procedimiento de *western blot* detallado previamente cargando las muestras control y 33 mM glucosa + PA solamente. Se utilizó el software *ImageJ* para medir la distancia entre cada una de las bandas presentes (muestra y marcador de peso molecular), hasta un punto de referencia marcado por encima del comienzo de cada carril. Se realizó un gráfico utilizando el marcador de peso molecular vs. logaritmo de las distancias obtenidas para el mismo; realizando una curva de calibración. Con la ecuación obtenida se calculó el peso molecular aparente de la actina utilizando la distancia de la banda obtenida. El análisis fue realizado por triplicado.

#### 4.9. Análisis de la rigidez celular por Microscopía de Fuerza Atómica

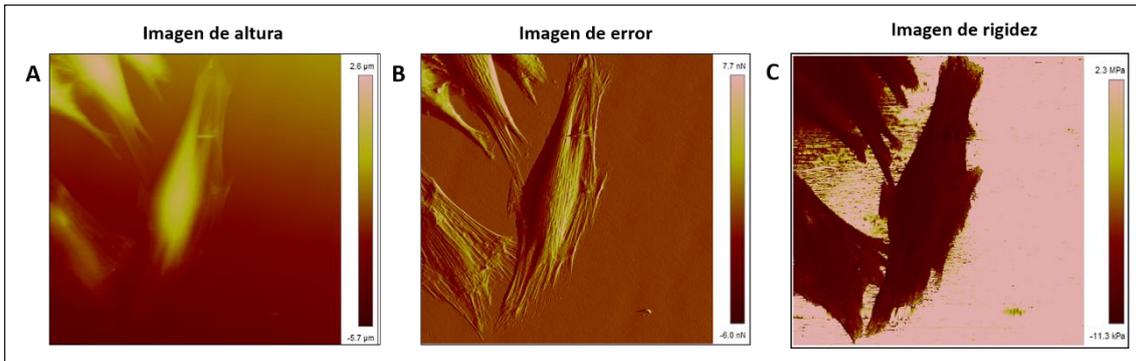
El Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) es un microscopio de barrido de alta resolución muy utilizado en el campo de las ciencias biológicas y biomédicas (Müller & Dufrêne, 2011; Benech et al., 2014; Li et al., 2018). Su funcionamiento se basa en la interacción entre la muestra que se quiere analizar y una punta de dimensiones nanométricas unida a un cantiléver. De este sistema lo que se controla es el movimiento de subida o bajada del cantiléver mediante motores piezoeléctricos. Se observa una representación esquemática del MFA en la Fig. 4A.

Cuando se opera en el modo *Peak Force Tapping* del software de la empresa *Bruker* se determina la altura inicial a partir de la cual el cantiléver desciende hacia la muestra, causando que la punta ejerza una fuerza sobre la misma. A medida que la punta escanea la superficie, los cambios en su altura o rigidez hacen que la fuerza máxima que se aplica sufra variaciones. Con un circuito de retroalimentación se busca compensar esos cambios con variaciones en la altura del cantiléver, de manera que la fuerza máxima aplicada sea constante. Se registra, entonces, para cada punto de la imagen dos magnitudes: por un lado, los cambios en la altura (con precisión nanométrica) que fueron necesarios para mantener la fuerza constante, y por el otro, cuáles fueron los cambios en la fuerza ejercida causados por las alteraciones en la muestra (Kuznetsova et al., 2007). La primera información se presenta en lo que llamamos la imagen de altura, en la cual podemos conocer con precisión nanométrica la topografía de la muestra; la segunda corresponde a lo que se denomina imagen de error. En esta última es posible conocer con más detalle la morfología celular (Fig. 4B).



**Figura 4.- Representación esquemática del MFA y obtención de las imágenes.** A) Representación esquemática del funcionamiento del MFA. Extraída de Rianna & Radmacher, 2016 B) Dibujo que representa la punta unida a un cantiléver recorriendo una muestra (*Sample*) y la generación de la imagen de altura (*Profile of scanner moving*) y la imagen de error asociada a los cambios de tuvo que realizar la punta sobre la muestra (*Profile of cantiléver deflection changing*). Esquemas tomados de ([www.ntmdt-si.com](http://www.ntmdt-si.com)).

Adicionalmente, el módulo QNM (*Quantitative NanoScale Mechanical*) del software de la empresa *Bruker* permite utilizar los datos registrados de la fuerza aplicada y de la deformación causada para obtener valores cuantitativos del módulo de Young (expresado en KPa) en cada punto. Esta información se utiliza para generar una tercera imagen: un mapa cuantitativo de la rigidez del material. En la Fig. 5 se representan las tres imágenes obtenidas por MFA de la misma región celular.



**Figura 5.- Imágenes del escaneo celular por MFA.** Imágenes obtenidas de una única célula viva de la condición control por MFA. A) Imagen de altura B) imagen de error C) imagen de rigidez.

El MFA del IIBCE (*BioScope Catalyst* de *Bruker*) se encuentra acoplado a un microscopio invertido de epifluorescencia (*Olympus IX81*) con variados objetivos que permiten la localización de cada célula con precisión. A su vez, permite realizar experimentos en aire o en líquido y cuenta con un controlador de temperatura, siendo posible analizar la topografía de las células fijadas, así como la elasticidad de las células vivas.

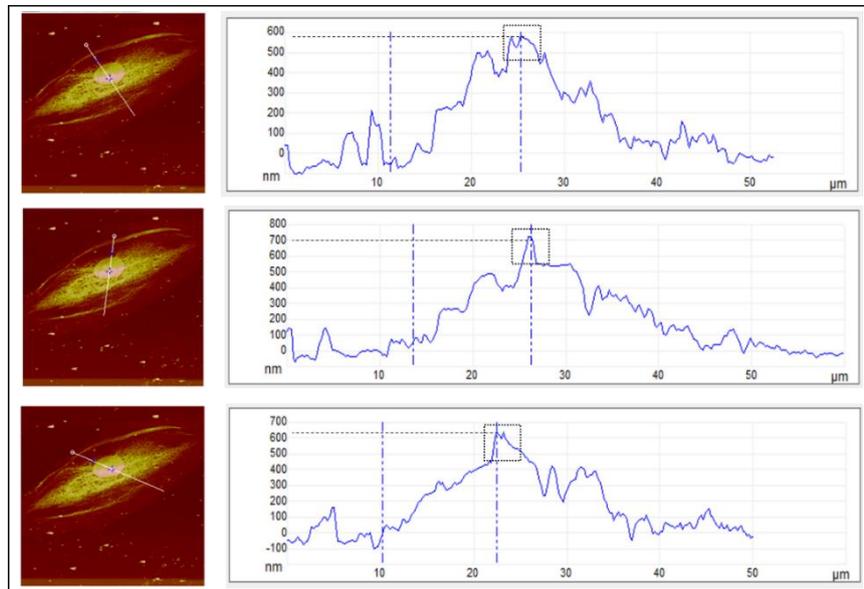
Para los experimentos en célula viva se utilizó una punta de nitruro de silicio DNP-10 (D) de la compañía *Bruker*, con un radio de 20 nm de acuerdo al fabricante y una constante elástica medida en líquido de 0.13 N/m. Para los experimentos en célula fijada se utilizó una punta *ScanAsyst* en aire con radio de 2 nm y constante elástica de 0.4 N/m. La fuerza máxima aplicada para los experimentos en célula viva varió entre 5 nN y 8 nN, mientras que para las células fijadas fue de 8 nN.

#### 4.9.1. Análisis de células fijadas

Las células fueron cultivadas durante 72 h en las condiciones control y 33 mM glucosa + PA en portaobjetos previamente esterilizados, y luego fijadas para su análisis con PFA (4 %) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se analizaron un total de 11 células de cada condición, y se obtuvieron imágenes con un tamaño de escaneo de 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ , y a una frecuencia de escaneo de 0.125 Hz.

Las imágenes de altura fueron procesadas utilizando la herramienta *section* en el software *NanoScope Analysis* (*Bruker*) y se extrajeron tres valores de altura para cada célula de cada condición que se promediaron para obtener un único valor. Para ello se realizaron tres líneas, cuyo punto en común es el centro del núcleo y de cada una se obtuvo una gráfica con el punto

de altura máxima tal como muestra la Fig. 6. El software además de realizar esta gráfica nos brinda el valor exacto del pico sin necesidad de interpolar en la misma (datos no mostrados).



**Figura 6.- Determinación de la altura celular por MFA.** Imágenes representativas obtenidas del software *NanoScope Analysis*. Se observa la determinación de tres valores de altura y cada grafica asociada. La primera línea vertical punteada corresponde a un valor bajo de altura, mientras que la segunda línea vertical corresponde a los valores máximos. Los cuadros punteados enmarcar el punto más alto de la célula y la línea punteada horizontal el valor del mismo.

#### 4.9.2. Análisis de células vivas

Las células fueron cultivadas en condición control o con 33 mM glucosa + PA durante 72 h en placas de Petri de 50 mm de diámetro. Se les extrajo el medio y fueron incubadas con IP en concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 5 min a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas con PBS 1X y se colocó nuevamente PBS 1X para su análisis. Las medidas fueron realizadas únicamente sobre las células viables (no presentaban fluorescencia por IP) analizándose un total de 9 células de cada condición. Se obtuvieron imágenes con un tamaño de escaneo de entre 100  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$ , con una resolución de 512 x 512 y a una frecuencia de 0.125 Hz.

Para el análisis de las células de interés se utilizó la imagen de rigidez (módulo de Young en KPa). La medición de la rigidez fue realizada utilizando una matriz de los valores del módulo de Young obtenidos por el software *NanoScope Analysis*. Se realizaron cuadrados de 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  en las zonas centrales y distales de la célula, similares a los realizados para la cuantificación de la actina F (sección 4.6.2). Estos cuadrados fueron definidos en la imagen de error, de manera de poder

diferenciar correctamente los límites celulares y luego colocalizados en la imagen de rigidez. Se utilizaron entre 1200 y 2700 datos del módulo elástico por cada célula en cada región, considerando la equivalencia que en cada pixel de la imagen hay un valor del módulo de Young. La variación en la cantidad de datos del módulo de Young es consecuencia de las diferencias en el tamaño de escaneo para cada célula. Los datos extraídos fueron incorporados al software *Graphpad Prism 8*. Se realizaron histogramas y se realizó un ajuste gaussiano obteniendo un valor de rigidez: media  $\pm$  desviación estándar.

Las imágenes de rigidez se representaron con una escala a colores. Dicha escala separa cada color por 100 KPa, es decir que el color rojo representa una rigidez entre 0-100 KPa, el naranja entre 100-200 KPa y así sucesivamente hasta alcanzar la dureza de la placa de Petri en la cual fueron cultivadas las células: 900-1000 KPa (fucsia). Esto nos ayuda a orientarnos en la interpretación de valores de rigidez central o distal de las células incubadas en la condición control o 33 mM glucosa + PA.

Se analizó la altura de las células vivas, en ambas condiciones, con el objetivo de verificar si su altura también era mayor en las células de la condición 33 mM glucosa + PA. Su análisis se realizó del mismo modo que para las células fijadas de la sección 4.2.1 (datos no mostrados).

#### 4.10. Análisis estadístico de los datos

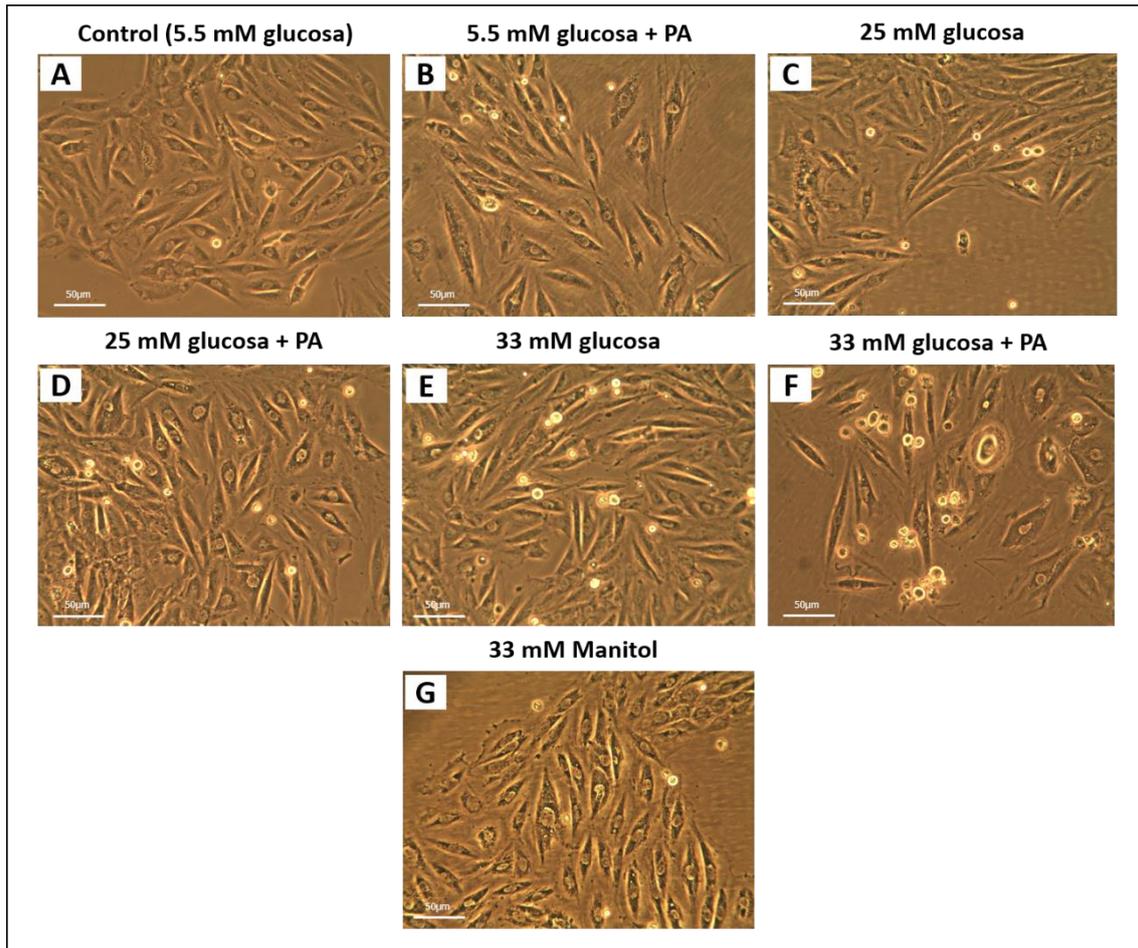
En todas las comparaciones se realizó un test de *Shapiro Wilk* para constatar normalidad. Para aquellas poblaciones que no cumplían la normalidad se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y si existían diferencias entre los grupos se realizó el test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Además, para probar la homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad) se realizó el test de Leven. Se comprobó que todas las variables utilizadas eran homocedásticas previamente a la utilización del test estadístico correspondiente en cada caso. Para aquellas poblaciones con  $n$  menor a 30 datos se utilizó un test no paramétrico, sin constatar normalidad previamente. Los datos fueron graficados utilizando el software *Graphpad Prism 8* y el análisis estadístico fue realizado en el software *R Studio*. Se consideró como diferencia significativa los valores con  $p < 0.05$  (\*\*\*)).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis de las condiciones óptimas experimentales

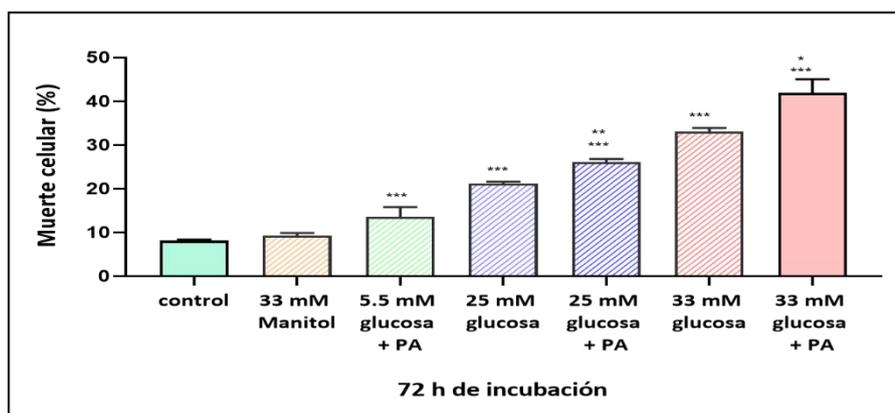
#### 5.1.1. Ajuste de la concentración óptima de glucosa y cuantificación de la muerte celular

Se adquirieron imágenes de los cultivos celulares de la línea H9c2 de las condiciones A) control (5.5 mM glucosa), B) 5.5 mM glucosa + PA, C) 25 mM glucosa, D) 25 mM glucosa + PA, E) 33 mM glucosa, F) 33 mM glucosa +PA y G) 33 mM manitol con microscopia óptica de luz transmitida (Fig. 7). Se observó que luego de 72 h de incubación, las células del grupo control (Fig. 7A) presentaban la morfología fusiforme característica de la línea celular. Al aumentar la concentración de glucosa y con la adición del PA, se detectó una mayor cantidad de células muertas (círculos refringentes despegados del sustrato) que en el control, evidenciándose una relación directamente proporcional entre la concentración de glucosa y la muerte celular (Fig. 7B-7F). En contraste, las células expuestas a 33 mM manitol (Fig. 7G) mostraron una morfología fusiforme y una muerte celular muy similar a las células controles.



**Figura 7.-** Imágenes representativas de las distintas condiciones experimentales a las 72 h de incubación. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (10X) de los cultivos: A) control (5.5 mM glucosa), B) 5.5 mM glucosa + PA, C) 25 mM glucosa, D) 25 mM glucosa + PA, E) 33 mM glucosa, F) 33 mM glucosa + PA y G) 33 mM manitol.

En la Fig. 8 se puede apreciar la cuantificación de la muerte celular para cada uno de los tratamientos a las 72 h de incubación. El control presentó un bajo porcentaje de muerte celular  $8.16 \% \pm 0.25 \%$ , al igual que el tratamiento de 33 mM manitol ( $9.10 \% \pm 0.85 \%$ ). Para el resto de las condiciones, tanto la adición de PA como el aumento de glucosa mostraron diferencia significativa con respecto al control. Además, se encontraron diferencias estadísticas entre la misma concentración de glucosa con y sin PA, lo que muestra la influencia del PA sobre la muerte celular.



**Figura 8.- Cuantificación de la muerte celular en las distintas condiciones experimentales a las 72 h de incubación.** Se representan las medianas del porcentaje de muerte celular para las condiciones A) control, B) 33 mM manitol C) 5.5 mM glucosa + PA, D) 25 mM glucosa, E) 25 mM glucosa + PA, F) 33 mM glucosa y G) 33 mM glucosa + PA. Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 200 células en cada grupo. Para el análisis estadístico se realizó el test de Kruskal-Wallis y luego el test Mann-Whitney considerando como diferencia significativa un valor de  $p < 0.05$  con respecto al control (\*\*\*) , 25 mM glucosa vs. 25 mM glucosa + PA (\*\*), 33 mM glucosa vs. 33 mM glucosa + PA (\*).

### 5.1.2. Cuantificación del ancho y largo celular

Los resultados de la cuantificación del largo y ancho de las células, medidas en las imágenes obtenidas por microscopía óptica, se presentan en la Tabla 2.

En el largo, los valores presentaron una diferencia significativa respecto al control en las condiciones mayores o igual a 25 mM glucosa, siendo la diferencia mayor en la condición 33 mM glucosa + PA. En el ancho, sin embargo, las diferencias significativas se observaron únicamente en las condiciones 33 mM glucosa y 33 mM glucosa + PA.

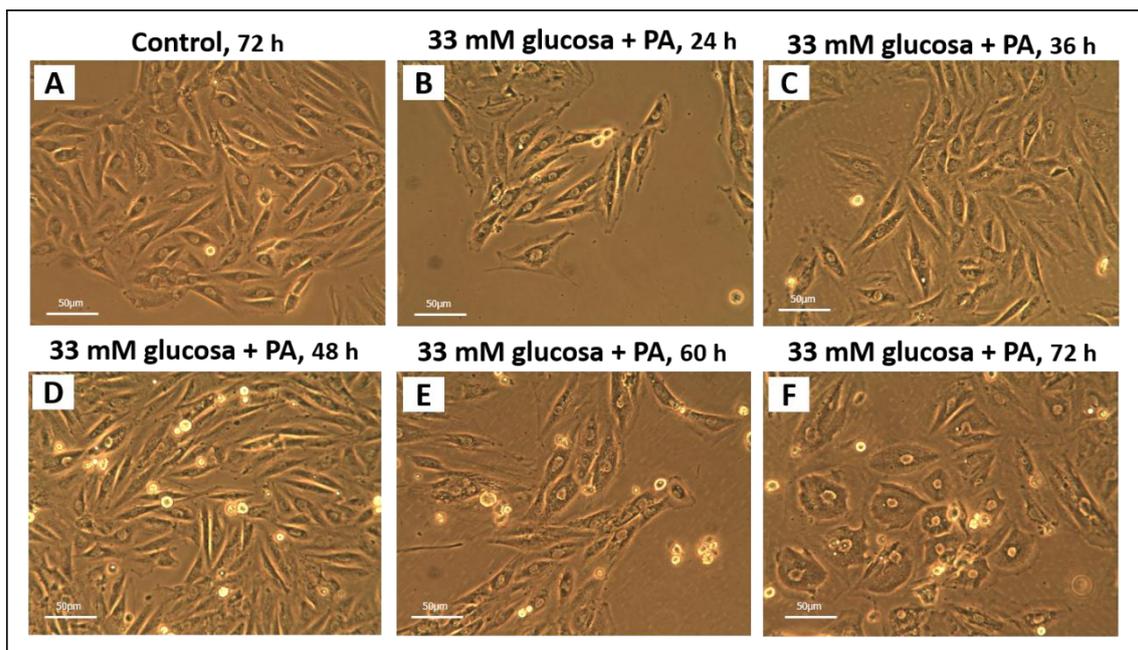
**Tabla 2.- Cuantificación del largo y ancho celular en las distintas condiciones experimentales.** Se presentan valores de la mediana correspondientes al largo y al ancho de las células H9c2 en todas las condiciones experimentales (control, 33 mM manitol, 5.5 mM glucosa + PA, 25 mM glucosa, 25 mM glucosa + PA, 33 mM glucosa y 33 mM glucosa + PA) a las 72 h cultivo y a su vez el largo y ancho en la condición control a las 0 h de incubación. Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 150 células en cada grupo. Para el análisis estadístico se realizó el test de Kruskal-Wallis para comparar entre los grupos y luego el test Mann-Whitney considerando como diferencia significativa con respecto al control, un valor de  $p < 0.05$  (\*\*\*) .

Condición experimental	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )
Control 0 h	78.87 $\pm$ 1.97	11.40 $\pm$ 0.57
Control, 72 h	79.17 $\pm$ 1.05	11.73 $\pm$ 0.34
33 mM manitol, 72 h	78.06 $\pm$ 1.47	11.73 $\pm$ 0.81
5.5 mM glucosa + PA, 72 h	72.07 $\pm$ 2.27	11.93 $\pm$ 0.64
25 mM glucosa, 72 h	68.99 $\pm$ 2.12***	12.32 $\pm$ 0.36
25 mM glucosa + PA, 72 h	68.59 $\pm$ 1.69***	12.45 $\pm$ 0.47
33 mM glucosa, 72 h	56.29 $\pm$ 2.08***	13.48 $\pm$ 0.37***
33 mM glucosa + PA, 72 h	47.27 $\pm$ 4.54***	14.08 $\pm$ 1.29***

## 5.2. Análisis de los efectos de la condición 33 mM glucosa + PA

### 5.2.1. Análisis temporal de la muerte celular

En la Fig. 9 se observan las condiciones: control a las 72 h de incubación y 33 mM glucosa + PA cada 12 h (desde 24 h a las 72 h) de incubación. A las 48 h de incubación (Fig. 9D), comenzaba a percibirse un importante cambio en la morfología celular observándose una pérdida de sus características típicas fusiformes que presentan las células H9c2. En la Fig. 9F (33 mM glucosa + PA a las 72 h) se observa que en su mayoría presentan una morfología completamente distinta a las células control (observación que se evaluará más adelante) y es posible observar que presentan menor contacto intercelular. Este análisis temporal demuestra que a medida que transcurren las horas de cultivo es posible observar una mayor cantidad de células muertas con alta refringencia ya despegadas del sustrato.



**Figura 9.-** Imágenes representativas del análisis temporal de la condición 33 mM glucosa + PA. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (10X) de los cultivos H9c2 cada 12 h de incubación (de 24 h a 72 h) para las condiciones A) control a las 72 h y 33 mM glucosa + PA a las B) 24 h C) 36 h D) 48 h E) 60 h F) 72 h. Es posible observar que a medida que transcurren las h de incubación hay mayor cantidad de células muertas.

La cuantificación de la muerte celular para ambas condiciones se presenta en la Fig. 10. Se cuantificaron ambas condiciones a intervalos de 12 h, comenzando a las 12 h y finalizando a las 72 h. Se constató un aumento significativo a medida que transcurrían las horas de cultivo en el grupo 33 mM glucosa + PA. A las 72 h de incubación el porcentaje de muerte celular, para la

condición control, alcanzó un valor de  $8.16 \% \pm 0.25 \%$  y para la condición 33 mM glucosa + PA un valor de  $42.6 \% \pm 3.6 \%$ .

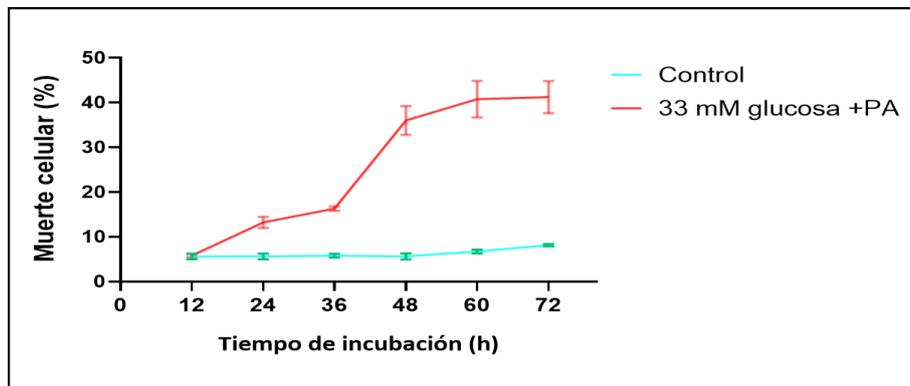
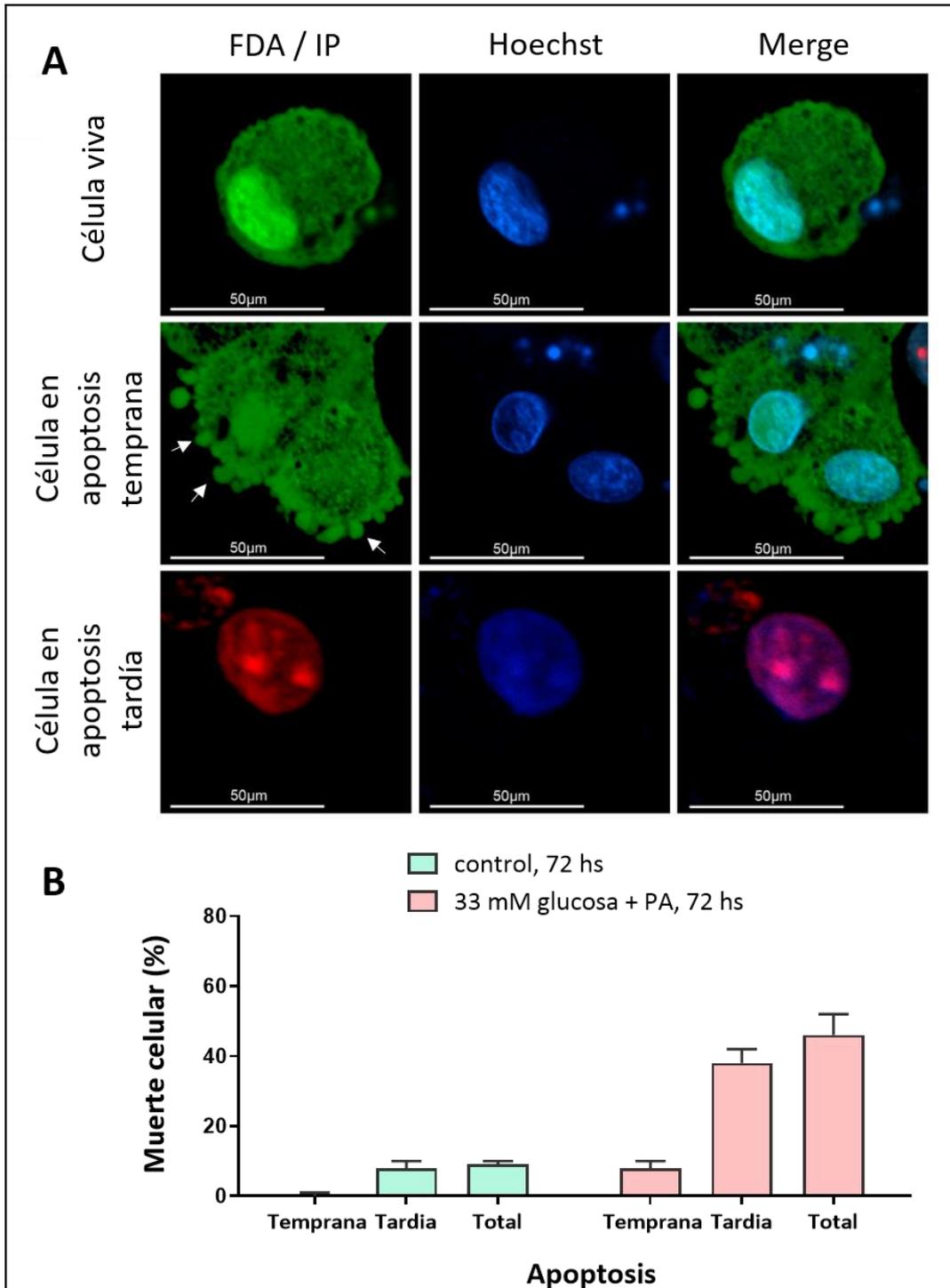


Figura 10.- Cuantificación temporal de la muerte celular en la condición control y 33 mM glucosa + PA. Los resultados obtenidos son expresados como porcentaje de muerte celular con respecto al total de células obtenidas cada 12 h y hasta las 72 h de tratamiento donde culminó el experimento. Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 200 células en cada grupo.

### 5.2.2. Análisis del tipo de muerte celular

Se realizó la técnica de la triple tinción para las condiciones control y 33 mM glucosa + PA y las imágenes adquiridas por MLC se muestran en la Fig. 11A. Se observaron células vitales, células en apoptosis temprana y células en apoptosis tardía. No se observaron células necróticas. La cuantificación de la apoptosis temprana, tardía y total se muestra en la Fig. 11B. La muerte celular fue principalmente apoptótica tardía observándose un porcentaje de  $8.3 \% \pm 1.5 \%$  para el control y  $38.6 \% \pm 5.1 \%$  para el grupo 33 mM glucosa + PA. La muerte celular total correspondió a valores muy similares a los observados previamente en la Fig. 10, constatándose un porcentaje para el control de  $8.6 \% \pm 1.6 \%$  y de  $47.0 \% \pm 4.6 \%$  para la condición 33 mM glucosa + PA.

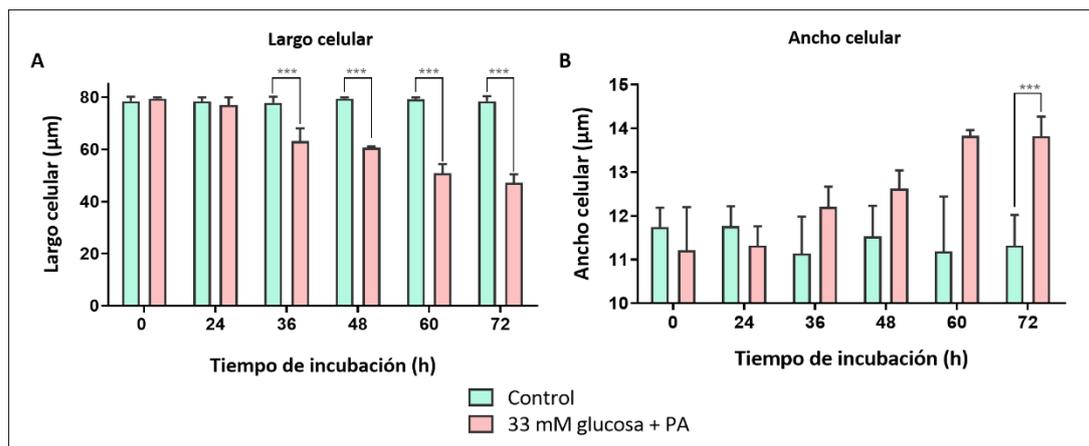


**Figura 11.- Análisis y cuantificación de la apoptosis en las células cultivadas en las condiciones control y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación.** A) Imágenes representativas de MLC (40X) de células vivas (arriba: célula verde y núcleo azul normal), células en apoptosis temprana (medio: célula verde y núcleos de tamaño igual o menor al normal con gránulos heterocromáticos) y de células en apoptosis tardía (abajo: célula roja y núcleos de tamaño igual o menor al normal con gránulos heterocromáticos). Las flechas blancas señalan los *blebbing* característicos de apoptosis temprana. Los colores rojo, verde y azul corresponden a IP, FDA y Hoechst respectivamente. B) cuantificación de la muerte celular apoptótica y total. Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 100 células de cada condición.

En suma la muerte celular observada en la condición 33 mM glucosa + PA comienza a hacer significativa a partir de las 24 h de incubación alcanzado su valor máximo a las 72 h y es debida mayormente a apoptosis tardía.

### 5.2.3. Análisis de la morfología celular

En las Fig. 12 se observa como a medida que transcurrió el tiempo de incubación el largo celular, para la condición 33 mM glucosa + PA comenzó a disminuir siendo significativamente diferente con respecto al control a partir de las 36 h de incubación (Fig. 12A). El ancho, en cambio, presentó diferencias significativas solamente a las 72 h de tratamiento, momento en que se dio por culminado el experimento (Fig. 12B). A pesar de observar diferencias significativas únicamente a las 72 h, se observa que la tendencia a presentar menor largo y mayor ancho celular comienza a las 36 h de incubación en el medio 33 mM glucosa + PA.



**Figura 12.-** Cuantificación del cambio en el largo y ancho de las células incubadas en la condición control y 33 mM glucosa + PA. Se observan los valores de mediana para las células H9c2 a los distintos tiempos de incubación (0, 24, 36, 48, 60 y 72 h) con respecto al A) Largo celular, B) Ancho celular. Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 150 células en cada grupo. Para el análisis estadístico se realizó el test de Mann-Whitney considerando como diferencia significativa con respecto al control, un valor de  $p < 0.05$  (\*\*\*)).

En la Fig. 13 se muestran las imágenes representativas obtenidas por MFA de las células H9c2 en la condición control y 33 mM glucosa + PA fijadas previamente. Se puede apreciar la imagen de error, que presenta información sobre la morfología celular, y la imagen correspondiente a la altura celular (topografía). Además, a modo de poder apreciar correctamente los cambios producidos en la altura se presentan las imágenes tridimensionales obtenidas a partir de las imágenes 2D.

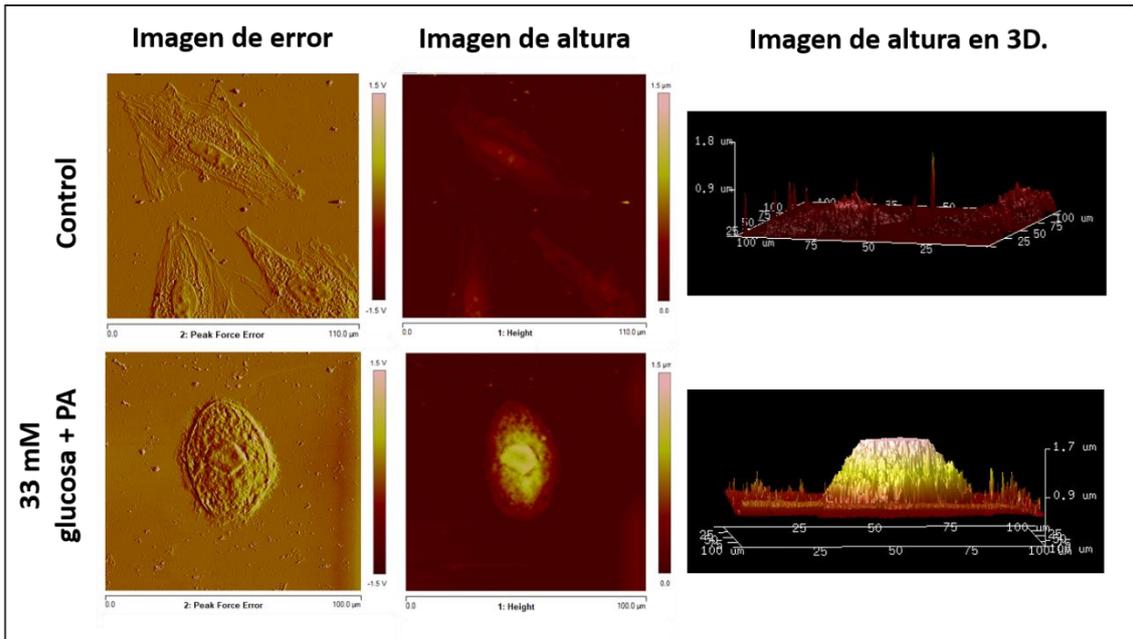


Figura 13.- Análisis de la altura en células cultivadas en las condiciones control y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Imágenes representativas de la altura de las células H9c2 fijadas con PFA 4 % obtenidas por MFA utilizando el software *NanoScope Analysis*. Como se puede observar las células 33 mM glucosa + PA son más altas que las células de la condición control. Tamaño de escaneo de 100 µm x 100 µm, resolución de 512 x 512 y una fuerza máxima aplicada de 8 nN.

La cuantificación de la altura celular mostró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, siendo mayor para la condición 33 mM glucosa + PA, como se presenta en la Fig. 14.

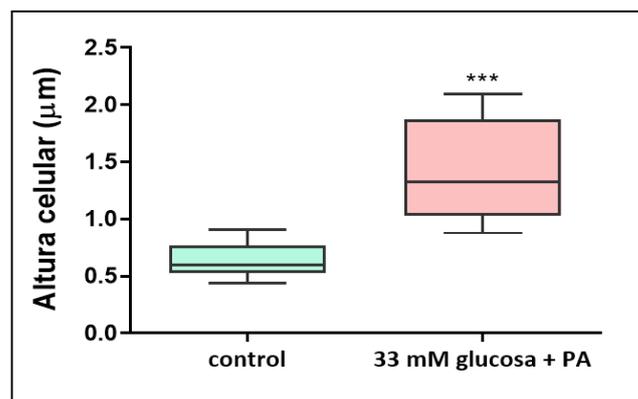


Figura 14.- Cuantificación de la altura en células cultivadas en las condiciones control y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Se analizaron un total de 11 células de cada condición. Los valores se ven representados como mediana y cuartiles 25 y 75. Para el análisis estadístico se realizó el test de Mann-Whitney considerando como diferencia significativa con respecto al control, un valor de  $p < 0.05$  (\*\*\*)

En suma, el análisis morfológico mostró que las células incubadas en el medio 33 mM glucosa + PA presentan diferencias significativas en largo, ancho y alto luego de las 72 h de tratamiento. Estos resultados demuestran que el cambio inducido por dicho medio es tridimensional.

#### 5.2.4. Cuantificación y análisis de la expresión y disposición espacial de la actina F

Las imágenes obtenidas por MLC de las células tratadas con faloidina-rodamina se presentan en la Fig. 15. El grupo control mostró haces de actina F delgados con una distribución homogénea en toda la célula, siendo paralelos entre sí a lo largo de la misma. Los haces de la condición 33 mM glucosa + PA, sin embargo, son más gruesos y presentan una distribución diferente: la actina F se encuentran mayormente ubicada hacia la periferia celular estando entrelazados entre sí.

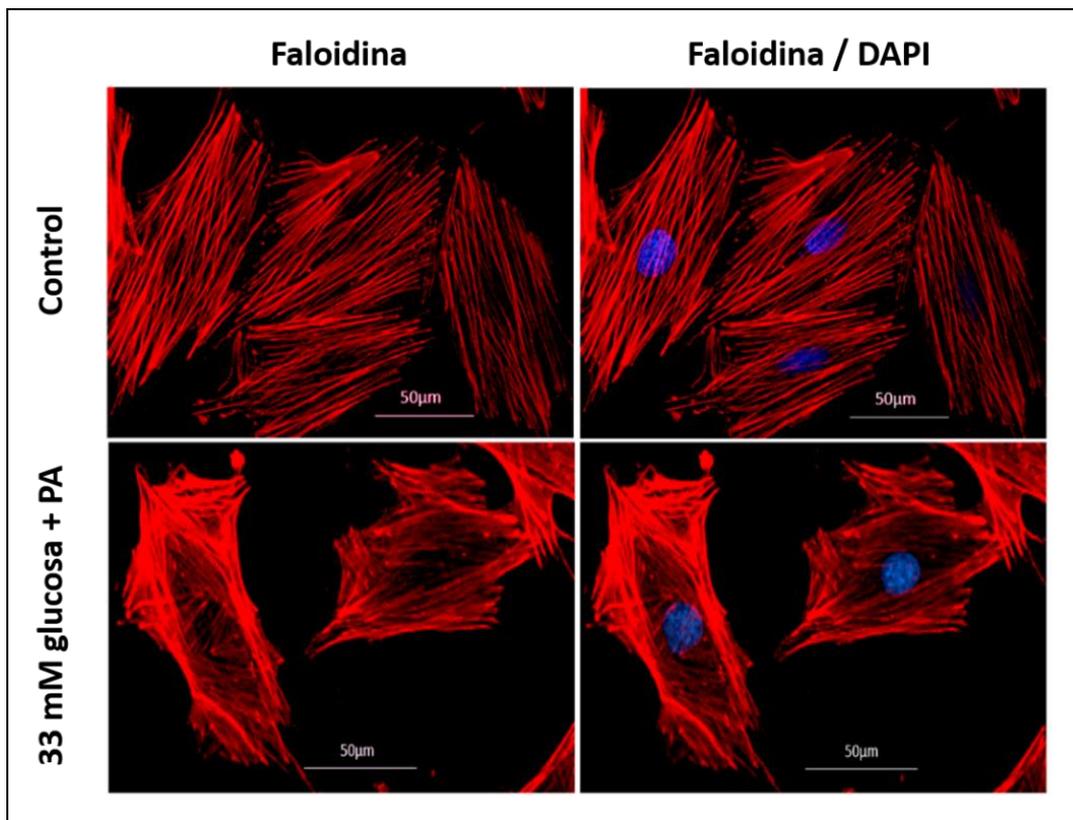
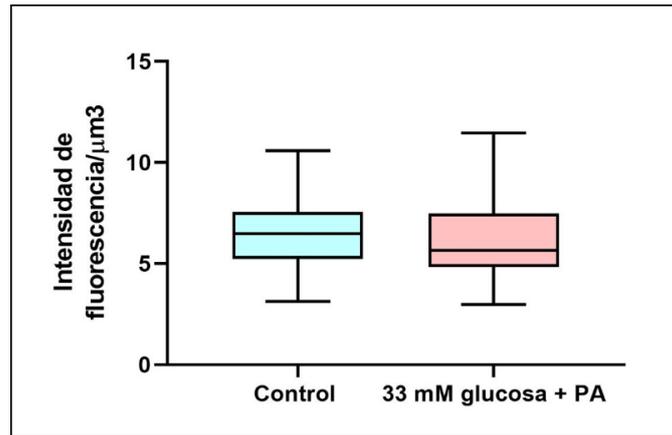


Figura 15.- Análisis de la actina F en células cultivadas en la condición control y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Imágenes representativas obtenidas por MLC (40X) de las células H9c2 tratadas con faloidina-rodamina (rojo) y glicerol-DAPI (azul). Se puede observar que el ordenamiento espacial de los haces de actina F es diferente entre ambos grupos. En el grupo control, la actina F presenta una organización espacial uniforme, mientras que en el grupo hiperglicémico-hiperlipidémico los haces se agrupan hacia la periferia celular.

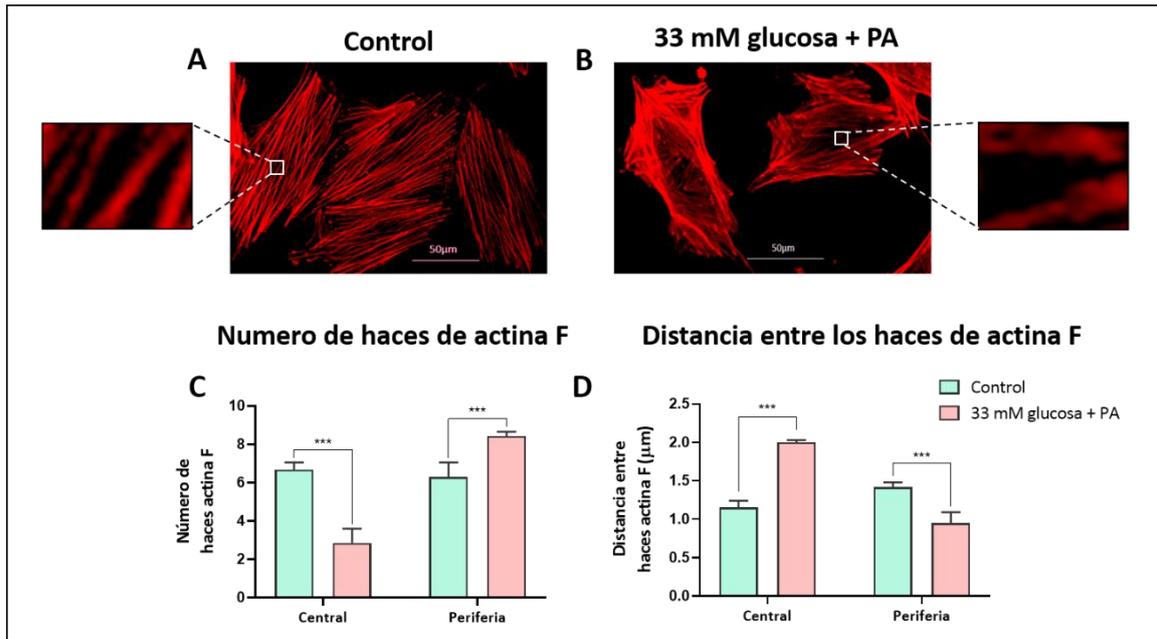
La cuantificación de la intensidad de fluorescencia se muestra en la Fig. 16. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.



**Figura 16.-** Cuantificación de la actina F en células cultivadas en la condición control y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Cuantificación de los datos obtenidos representados en Intensidad de fluorescencia/ $\mu\text{m}^3$ . Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 150 células en cada grupo. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Los valores se ven representados como mediana y cuartiles 25 y 75. Para el análisis estadístico se realizó el test de Mann-Whitney considerando como diferencia significativa con respecto al control, un valor de  $p < 0.05$  (\*\*\*)

Como se mencionó anteriormente, los haces de actina F presentan una distribución espacial diferente entre el grupo control y 33 mM glucosa + PA. Se observa un corrimiento de los haces hacia la periferia celular y una menor marcación de los mismos en la zona central (Fig. 17A y 17B). La cuantificación del número de haces en las zonas central y distal de las células se representa en la Fig. 17C. En la zona central se observó una disminución significativa en la cantidad de haces de actina de F para el grupo 33 mM glucosa + PA al compararlo con el control. Sin embargo, en la zona distal esta relación se invierte, siendo mayor la cantidad de haces de actina F en las células incubadas en 33 mM glucosa + PA.

Por otro lado, en la Fig. 17D se puede observar que la distancia entre los haces de actina F en la zona central presentó una diferencia significativa entre las condiciones control y 33 mM glucosa + PA, siendo mayor en las últimas. En la zona distal, esta relación se volvió a invertir presentando una distancia significativamente menor para las células incubadas a 33 mM glucosa + PA.

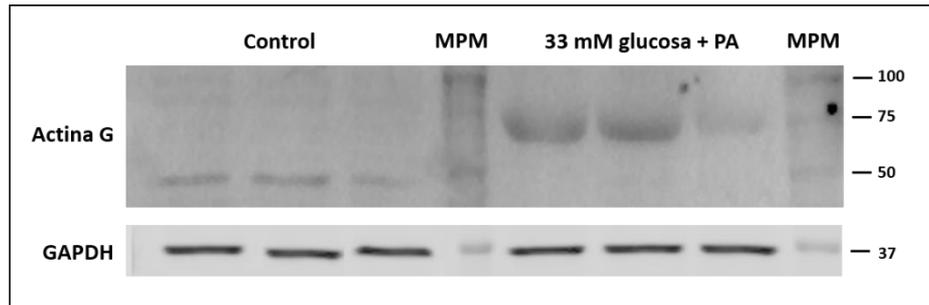


**Figura 17.- Cuantificación de la disposición espacial de la actina F en células cultivadas en la condición control y 33mM glucosa + PA a las 72 h de incubación.** Imágenes representativas obtenidas por MLC de los cultivos H9c2 tratados con faloidina-rodamina (rojo). El cuadrado blanco ubicado en la zona central de  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  se encuentra ampliado de manera representativa con el fin de observar los detalles del número y distancia de los haces. A) Grupo control B) Grupo 33 mM glucosa + PA. C) Cuantificación del número de haces de actina F por cuadrado de  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  de la zona central y distal D) Cuantificación de la distancia entre los haces de actina F por cuadrado de  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  de la zona central y distal. Se realizaron tres experimentos independientes para cada condición contabilizándose 150 células en cada grupo. Para el análisis estadístico se realizó el test Mann-Whitney considerando como diferencia significativa con respecto al control, un valor de  $p < 0.05$  (\*\*\*)).

En suma, el análisis de la actina F mostró que la misma no presenta cambios significativos en su expresión (cuantificada por fluorescencia) pero si cambios en la distribución espacial. Se observó un desplazamiento de los haces hacia la periferia celular, consistente con una disminución de la distancia entre los haces en dicha zona.

### 5.2.5. Análisis de la expresión proteica de la actina total

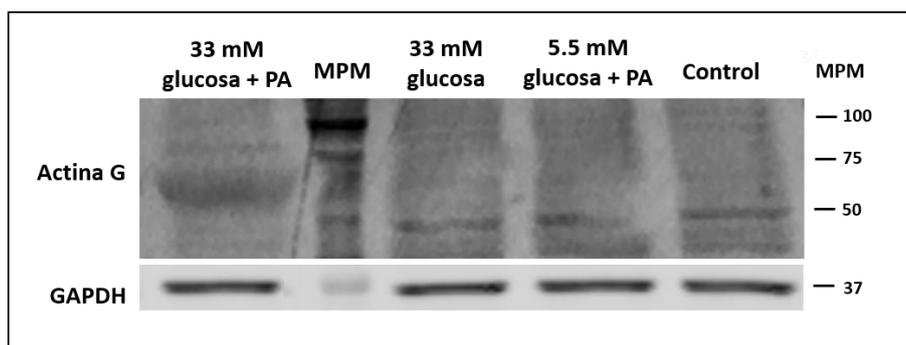
La Fig. 18 presenta los niveles de expresión relativos a la actina total para las muestras de ambos grupos (control y 33 mM glucosa + PA) en relación al control de carga (GAPDH). Las muestras controles presentaron una banda de aproximadamente 42 KDa correspondiente al peso molecular de la actina monomérica. Sin embargo, el grupo 33 mM glucosa + PA, presentó un peso molecular distinto al esperado. No se realizó la cuantificación de los datos obtenidos ya que se consideró que las bandas no eran comparables entre sí.



**Figura 18.- Western blot de las células H9c2 en las condiciones control y 33 mM glucosa + PA, a las 72 h de incubación.** SDS-PAGE al 10 %. Las bandas de actina G (42 KDa) fueron reveladas con un anticuerpo-pan-actina y las bandas de GAPDH (37 KDa) fueron reveladas con un anticuerpo-anti-GAPDH (control de carga). MPM corresponde al marcador de peso molecular. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Se realizó el cálculo del peso molecular aparente para las bandas obtenidas en la condición 33 mM glucosa + PA, según el método de (Shapiro et al., 1967). El valor correspondió a  $72.1 \text{ KDa} \pm 4.4 \text{ KDa}$ .

Con el fin de dilucidar si el cambio en el peso molecular de la actina en la banda de 33 mM glucosa + PA se debía únicamente a la concentración de glucosa (33 mM), a la concentración correspondiente de PA (500  $\mu\text{M}$ ) o a ambas, se realizó otro *western blot*, tal como muestra la Fig. 19. Se observó que la actina G presentaba su peso molecular habitual (42 KDa) en las condiciones 5.5 mM glucosa + PA y 33 mM glucosa. No obstante, la banda correspondiente a la condición 33 mM glucosa + PA es cercano a 72.1 KDa tal como se mostró y calculó previamente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos control, 5.5 mM glucosa + PA y 33 mM glucosa. La cuantificación se muestra en la Fig. 20.



**Figura 19.- Western blot de las células H9c2 cultivadas en las condiciones control (5.5 mM glucosa), 5.5 mM glucosa + PA, 33 mM glucosa y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación.** SDS-PAGE al 10 %. Las bandas de actina G (42 KDa) fueron reveladas con un anticuerpo-pan-actina y las bandas de GAPDH (37 KDa) mediante un anticuerpo-anti-GAPDH (control de carga). MPM corresponde al marcador de peso molecular. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

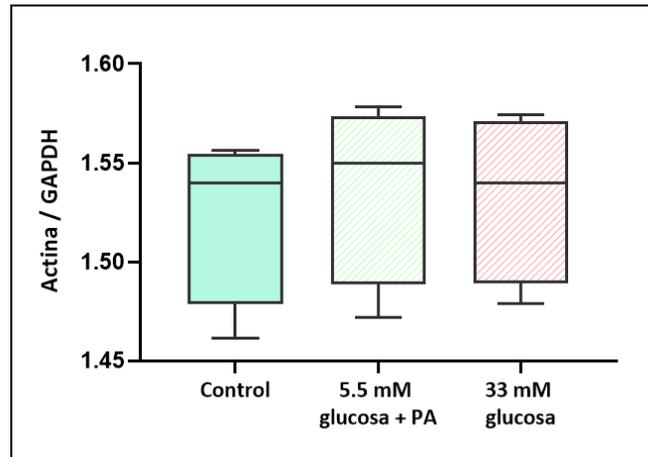


Figura 20.- Cuantificación de las bandas obtenidas por *western blot* de las células H9c2 cultivadas en las condiciones control, 5.5 mM glucosa + PA, 33 mM glucosa y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Las bandas resultantes del *western blot* fueron cuantificadas utilizando el software *ImageJ*. No se observaron diferencias significativas. Para el análisis estadístico se realizó el test de Kruskal-Wallis para comparar entre los grupos considerando como diferencia significativa un valor de  $p < 0.05$  (\*\*\*)).

En suma, el análisis de la expresión proteica de la actina total mostró que las bandas de las células cultivadas en la condición 33 M glucosa + PA presentaban un peso molecular mayor al esperado observándose únicamente dicho comportamiento en la condición sinérgica.

#### 5.2.6. Análisis de la nanomecánica celular

Las figuras obtenidas por MFA de las células vivas para ambos grupos (control y 33 mM glucosa + PA) a las 72 h de incubación, se muestran en la Fig. 21. En las imágenes de error de las células control se observan los haces, posiblemente correspondientes al citoesqueleto celular, ordenados y paralelos entre sí con una distribución muy similar a la observada previamente en la sección 5.2.4. Sin embargo en las células de la condición 33 mM glucosa + PA se observa una notoria disminución de la cantidad de haces y una organización de los mismos completamente diferente a lo observado en las células control.

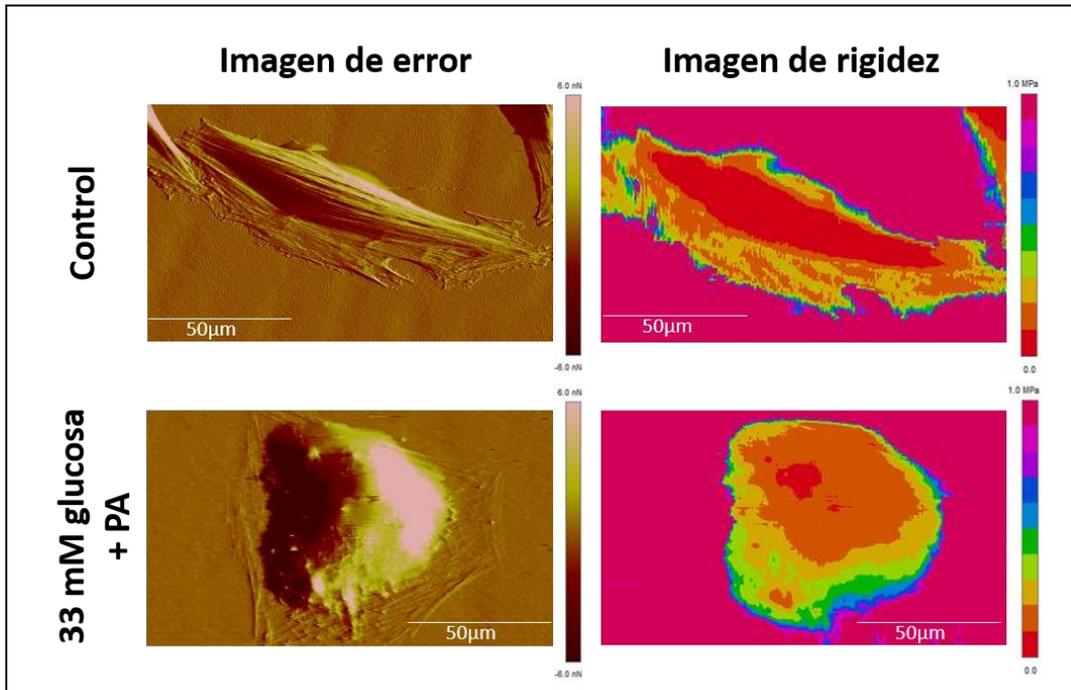


Figura 21.- Análisis de la nanomecánica celular de las células H9c2 cultivadas en la condición control y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Imágenes de error y rigidez representativas de células vivas obtenidas por MFA utilizando el software *NanoScope Analysis*. La escala de colores en la imagen de rigidez está subdividida en 10 colores, siendo el rojo un valor de entre 0-100 KPa, el naranja entre 100-200 KPa y así sucesivamente hasta alcanzar la dureza de la placa de Petri en la cual fueron cultivadas las células: 900-1000 KPa (fucsia). Tamaño de escaneo entre 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$  x 150  $\mu\text{m}$ , resolución de 512 x 512 y una fuerza máxima aplicada entre 5 nN y 8 nN. Se analizaron 9 células de cada grupo.

La cuantificación de los datos obtenidos de la rigidez celular se graficaron en la Fig. 22. En esta se muestran los histogramas obtenidos a partir de la frecuencia relativa y los valores de rigidez. Los valores extraídos del software *NanoScope Analysis* se encuentran expresados en MPa a diferencia del resto razón por la cual las gráficas de la siguiente figura se encuentran en dicha unidad. Se realizaron 4 histogramas representando la zona central y distal (determinando la misma como se detalló previamente en la sección 4.6.2) de ambas condiciones.

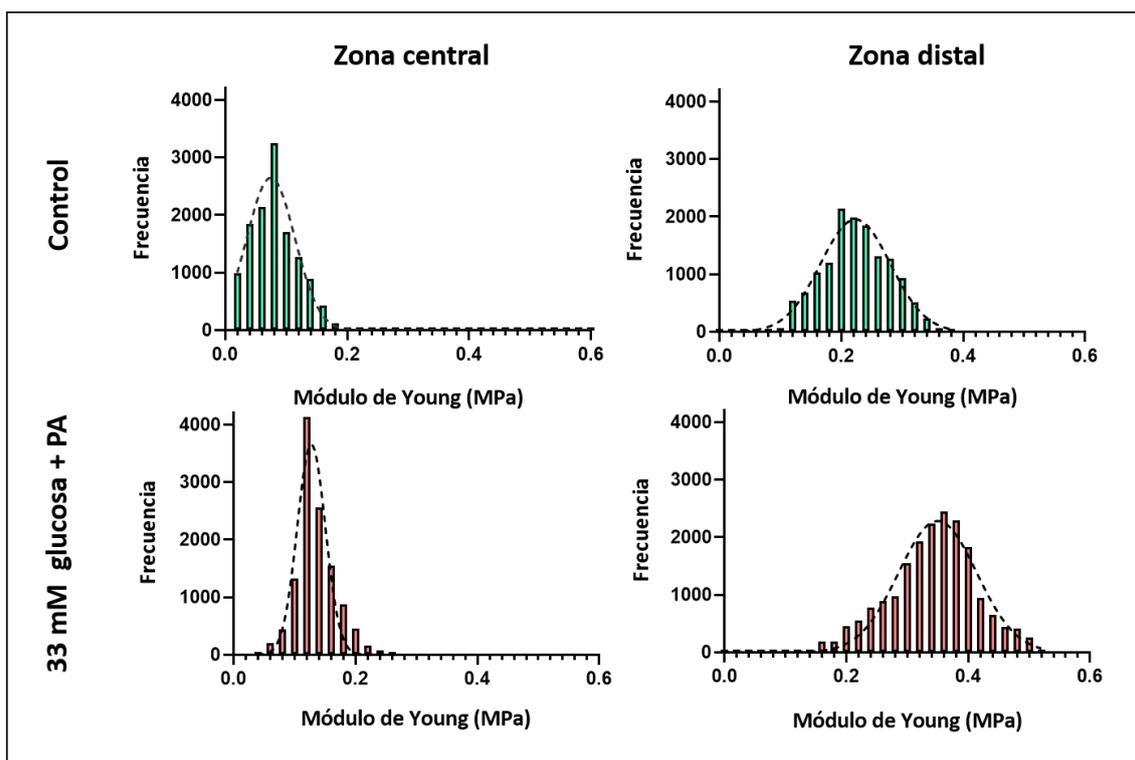


Figura 22.- Cuantificación de la rigidez celular de las células cultivadas en la condición control y 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Histogramas obtenidos a partir de los valores del módulo de Young (MPa). Se analizaron un total 9 células de cada condición. Las líneas punteadas corresponden a los ajustes gaussianos de cada histograma.

En la Tabla 3 se encuentran detallados los valores de la media y la desviación estándar obtenidos del ajuste gaussiano de la rigidez celular para cada condición en la zona central y distal de la célula. En la condición control se observó una diferencia significativa entre las zonas central y distal encontrando valores mayores de rigidez en la zona distal. Al comparar el control con el grupo 33 mM glucosa + PA, se observaron diferencias estadísticas entre ambas regiones: central y distal, presentando estos últimos valores de rigidez más elevados.

Tabla 3.- Valores de rigidez celular obtenidos a partir de los módulos de Young. Se muestra el valor medio del ajuste gaussiano y la desviación estándar para cada condición en las regiones centrales y distales de la célula. Para el análisis estadístico se realizó el test de Kruskal-Wallis para comparar entre los grupos y luego el test Mann-Whitney considerando como diferencia significativa un valor de  $p < 0.05$ . Zona central del grupo control vs. zona central del grupo 33 mM glucosa + PA (\*), zona central del grupo control vs. zona distal del grupo control (\*\*), zona distal del grupo control vs. zona distal del grupo 33 mM glucosa + PA (\*\*\*), zona central del grupo 33 mM glucosa + PA vs. Zona distal del grupo 33 mM glucosa + PA (\*\*\*\*).

	Zona central (KPa)	Zona distal (KPa)
Control	78,9 ± 36,4	220,2 ± 57,4 **
33 mM glucosa +PA	122,7 ± 26,1 (*)	358,8 ± 64,0 *** / ****

En suma, el análisis de la rigidez celular mostró que las células H9c2 son en general más rígidas al ser comparados con las controles y que su rigidez es aún mayor en la periferia celular.

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se utilizó la línea celular H9c2 incubada en un medio hiperglicémico-hiperlipidémico como modelo que emula la DM *in vitro*. Esta línea celular es la primera derivada de corazón que proviene del ventrículo izquierdo de embriones de rata. Se ha visto que mantienen las propiedades fisiológicas de los cardiomiocitos (Kimes & Brandt, 1976; Hescheler et al., 1991), razón por la cual han sido muy utilizadas como modelo para su estudio (Ménard et al., 1999; Cai & Kang, 2003; Zordoky & El-Kadi, 2007; Park et al., 2015).

Si bien se sabe que los cardiomiocitos neonatales o adultos se consideran como “estándar oro” para el estudio de enfermedades del miocardio (Liao & Jain, 2007; Lenčo et al., 2015), son células de difícil manipulación por lo que actualmente suelen ser sustituidas por líneas celulares ya establecidas. Las ventajas que presentan las líneas celulares frente a los cardiomiocitos es que son: células de fácil obtención, de vida útil larga y que permiten numerosas manipulaciones experimentales idénticas. Se han realizado diversas investigaciones con el fin de validarlas experimentalmente, considerándolas en la actualidad un buen modelo para el estudio de las patologías del miocardio. En este sentido, Watkins y colaboradores demostraron que es una línea válida para el estudio *in vitro* de las enfermedades cardíacas que generan hipertrofia al ser comparadas con cardiomiocitos primarios neonatales (Watkins et al., 2011). En 2007, otro trabajo constató que esta línea celular es un modelo útil para el estudio de la capacidad metabólica del corazón (Zordoky & El-Kadi, 2007). Además, ha sido utilizada como modelo de isquemia y reperfusión (Han et al., 2004) y de estrés oxidativo evaluando si el daño miocárdico inducido por la isquemia y reperfusión podrían estar involucrados en la generación de ROS (Chou et al., 2010). Liu y colaboradores observaron una expresión disminuida de la proteína transportadora de glucosa (GLUT4) al incubar las células H9c2 en altas concentraciones de glucosa (Liu et al., 2013), tal como se ha observado en la DM (Wall & Lopaschuk, 1989; Lopaschuk, 1996; Jia et al., 2018). Todos estos datos concluyen que la línea celular H9c2 es un modelo apropiado para el estudio de los objetivos planteados en esta tesis.

Se sabe que la hiperlipidemia desempeña un rol importante en el desarrollo de la MCD independientemente de otros factores (Zhou et al., 2000; Chiu et al., 2001). Estudios en pacientes con DM2 comprobaron que el PA en el plasma representa un 28% de la concentración de AG libres (Bergman & Ader, 2000; Stefan et al., 2001; Palomer et al., 2018). Varios trabajos

han utilizado una concentración de 500  $\mu\text{M}$  PA como modelo de MCD en la evaluación de ROS (Zhang et al., 2010), en la apoptosis (Dyntar et al., 2001; Leroy et al., 2008), en la hipertrofia celular (Chang et al., 2015) y para evaluar las propiedades funcionales y estructurales inducidas por la DM (Michaelson et al., 2014). La hiperglicemia crónica es el síntoma que define al grupo de patologías denominadas como DM y es primordial en el desarrollo de la MCD (Singh et al., 2000; O'Keefe & Bell, 2007). Sin embargo, en la bibliografía no existe un consenso sobre la concentración óptima de glucosa a utilizar para el estudio *in vitro* de la DM (Dyntar et al., 2001; Cai et al., 2002; Michaelson et al., 2014). Por esta razón y de acuerdo a la experiencia previa en nuestro laboratorio, se evaluaron dos de las concentraciones más utilizadas de glucosa (25 mM y 33 mM) con el objetivo de discernir cual es la concentración más adecuada para cumplir con los objetivos planteados en esta tesis.

### 6.1. Análisis de las condiciones óptimas experimentales

Kahn y colaboradores mostraron que la elevada concentración de glucosa y de lípidos se potencian generando un mayor porcentaje de muerte celular por el efecto glicolipotóxico (Kahn et al., 2006). En este trabajo se constató que entre 25 mM glucosa y 25 mM glucosa + PA la muerte celular se incrementó 1.2 veces, mientras que entre 33 mM glucosa y 33 mM glucosa + PA el incremento correspondió a 1.3 veces. Estos resultados demuestran el efecto sinérgico entre la concentración de glucosa empleada y el PA observándose un aumento en la muerte celular a mayor concentración de glucosa (Fig. 7 y 8), como también observaron (Kahn et al., 2006). Estos nuevos datos también son congruentes con los de Cai y colaboradores, quienes utilizaron medios hiperglicémicos de 22 mM y 33 mM sin PA, observando un mayor porcentaje de muerte celular con la concentración más elevada (Cai et al., 2002).

En nuestro trabajo al contrastar el control con 33 mM manitol no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de muerte celular (Fig. 8), descartando que dicho fenómeno se deba a un efecto hiperosmolar. Este resultado concuerda con los obtenidos por otros autores (Cai et al., 2002; Huisamen et al., 2016). Además, es sabido que la proteína BSA, que se encuentra formando el complejo PA/BSA, tampoco induce un porcentaje de muerte celular significativa (Leroy et al., 2008; Michaelson et al., 2014), razón por la cual no se realizaron los experimentos correspondientes.

En la DM la hiperglicemia y la hiperlipidemia producen niveles elevados de ROS los cuales generan cambios en la morfología de los cardiomiocitos afectando el contacto intercelular (Chou et al., 2010). Se ha reportado que la glicolipototoxicidad induce niveles elevados de ROS en nuestro modelo celular (Cai et al., 2002; Yu et al., 2006; Boudina & Abel, 2007, 2010). Han y

colaboradores observaron que al someter las células H9c2 a estrés oxidativo, mediante la inducción de  $H_2O_2$ , cambiaba su morfología y presentaban una disminución en el contacto célula - célula (Han et al., 2004). Un resultado muy similar fue obtenido en el presente trabajo, tal como se observa en la imagen de microscopía óptica obtenida con 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación (Fig. 7f). En nuestro caso, no realizamos ensayos con  $H_2O_2$  ya que experiencias previas en nuestro laboratorio (Alberro, 2016) y de otros autores indicaron interferencias entre el complejo PA/BSA y la sonda utilizada (H2DCFDA) (Michaelson et al., 2014).

Nuestros resultados sugieren que entre 25 mM glucosa y 25 mM glucosa + PA no hubo variación notable en el largo y ancho celular, mientras que para 33 mM glucosa y 33 mM glucosa + PA los cambios son significativos. En estos últimos se constató una disminución de 1.19 veces en el largo y un aumento de 1.04 veces en el ancho a las 72 h de incubación (Tabla 2). Al comparar el control a las 72 h con la condición 33 mM glucosa + PA, se constató una disminución de 1.7 veces en el largo, y un aumento 1.2 veces en el ancho. Estos resultados son congruentes con un estudio realizado en ratones DM1 inducidos por STZ en el cual se observó una disminución en el tamaño de los cardiomiocitos diabéticos (Kawaguchi et al., 1999). Se puede constatar también, que las variaciones entre el control y el tratamiento con 33 mM manitol no fueron significativos, lo que reafirma nuevamente que los cambios inducidos por el medio 33 mM glucosa + PA no son debidos a un efecto hiperosmolar.

Como corolario de los análisis anteriores se utilizó la concentración 33 mM glucosa como modelo de hiperglicemia ya que presentaba un alto porcentaje de muerte celular e importantes cambios significativos en la morfología celular a las 72 h de incubación.

En nuestro laboratorio hay experiencia en el manejo de un modelo animal de DM1 inducido por una única dosis de STZ en el cual los ratones son considerados diabéticos cuando la glicemia alcanza un valor mayor a 250 mg/dL. Realizando un cuidado intensivo de los animales (que incluye, entre otros, un cambio frecuente de la viruta de sus jaulas) se ha logrado aumentar la sobrevivencia de los ratones diabéticos (Benech et al., 2014). Actualmente se logró alcanzar una sobrevivencia del 100% a los tres meses en ratones con valores de glicemia por encima de los 600 mg/dL. El valor de 33 mM glucosa empleado es equivalente a una concentración de 590 mg/dL. Estos datos muestran que la concentración de glucosa utilizada en nuestro modelo *in vitro* es compatible con los niveles de glucosa en sangre determinados en un modelo animal de DM1.

## 6.2. Análisis de la condición control y 33mM glucosa + PA

### 6.2.1. Análisis de la muerte celular

La evaluación temporal de la muerte celular (Fig. 10) constató un aumento de 5.2 veces mayor para la condición 33 mM glucosa + PA que para el grupo control a las 72 h de incubación. Es sabido que la DM produce apoptosis en los cardiomiocitos humanos por activación de la caspasa 3 (Frustaci et al., 2000), en modelos de ratas y ratones inducidos por STZ (Fiordaliso et al., 2000; Cai et al., 2002), y en modelos *in vitro* (células H9c2) que emulan la DM en condiciones de hiperglicemia-hiperlipidemia (Leroy et al., 2008; Huisamen et al., 2016). Es conocido que la elevada concentración de glucosa aumenta la absorción y oxidación de AG libres generando un aumento de la apoptosis celular (Huisamen et al., 2016; Romanelli et al., 2019). Evidencias previas en nuestro laboratorio indican que el complejo PA/BSA induce interferencias con la anexina V en el análisis del tipo de muerte celular, razón por la cual, en este trabajo, se utilizó la técnica de la triple tinción para evaluar el tipo de muerte celular (Fig. 11). La muerte celular total obtenida fue 5.4 veces mayor en las células incubadas en el medio 33 mM glucosa + PA en comparación con el control, resultando acorde con el valor obtenido de la análisis de la muerte celular por IP (Fig. 10). El análisis del tipo de muerte celular arrojó que la muerte fue principalmente apoptótica tardía.

### 6.2.2. Análisis de la morfología celular

Se observaron diferencias significativas entre el largo y ancho conjuntamente solamente a las 72 h de incubación (Fig. 12). Por ambas razones se decidió utilizar para el resto de los experimentos dicho tiempo de incubación, acorde con lo observado por Cai y colaboradores (Cai et al., 2002). Si bien la mayoría de las células son afectadas por la condición hiperglicémica hiperlipidémica, se estableció un criterio para el resto de los experimentos. Se analizaron células menores a 60  $\mu\text{m}$  de largo para el grupo 33mM glucosa + PA.

El MFA es una técnica muy sensible en la cual es posible estudiar la locomoción, la diferenciación, el envejecimiento, los parámetros estructurales y los eventos fisiológicos y patológicos de las células (Kuznetsova et al., 2007; Qiu et al., 2010; Müller & Dufrêne, 2011; Chen et al., 2013). Debido a los cambios ya descritos en el largo y ancho celular se analizó si existían diferencias en el volumen, razón por la cual se midió la altura celular. Las células fijadas de la condición 33 mM glucosa + PA fueron 2.25 veces más altas que las células del grupo control

(Fig. 14). Asimismo, el análisis en células vivas reflejó una diferencia de 1.57 veces (datos no mostrados). Ambos resultados demuestran que la altura aumenta en la condición 33 mM glucosa PA. En la imagen de error es posible observar a la célula de la condición 33 mM glucosa + PA con una morfología muy similar a la observada por microscopía óptica (Fig. 7f). Las células son más cortas y más anchas que las pertenecientes del grupo control, y se observa una disminución de la matriz extracelular, confirmando la pérdida de contacto entre célula - célula. Se ha reportado un aumento de la altura de otras células patológicas (Joshi et al., 2001).

### 6.2.3. Análisis de la actina F

Se ha reportado que la DM causa alteraciones en la matriz extracelular, como la fibrosis y cambios en la expresión y organización de la actina F (Chou et al., 2010; Xie, 2017; Guo et al., 2018; Chen et al., 2018; Romanelli et al., 2020).

Con respecto a la expresión, se ha observado una expresión disminuida de la actina F tisular de corazones de ratas con DM1 (Kawaguchi et al., 1999; Nemoto et al., 2006; Zhang et al., 2008) y se constató que dicha diferencia no se debía a una disminución de la expresión de la alfa actina (principal isoforma de la actina en la musculatura estriada) (Romanelli et al., 2020). En contraste, Depre y colaboradores informaron una reducción en los niveles de expresión del ARNm de la alfa actina cardíaca en ratas DM1 inducidas por SZT (Depre et al., 2000). Sin embargo, no necesariamente la cantidad de proteína expresada se corresponde con los niveles de ARNm, lo que sugiere una fuerte regulación postranscripcional (Vandekerckhove et al., 1986; Ilkovski et al., 2005; Tondeleir et al., 2009). En lo que respecta a la organización de la actina F, Romanelli y colaboradores observaron una disminución significativa de las áreas ocupadas por la actina F en el miocardio de ratones diabéticos DM1 (Romanelli et al., 2020). Otro estudio *in vitro* sugiere que no existen diferencias en la distribución espacial de la actina F cuando los cardiomiocitos son incubados en condiciones de hiperglicemia e hiperlipidemia independientemente (Michaelson et al., 2014). Sin embargo, los autores, no analizaron los efectos sinérgicos entre ambas condiciones a pesar de que la glicolipototoxicidad genera importantes alteraciones en el citoesqueleto de actina (Dyntar et al., 2001; Cooper et al., 2004; Kemeny et al., 2013). Se encuentra reportado que una morfología celular adecuada es esencial para el correcto funcionamiento del músculo. Cambios en la desorganización espacial de la actina F causan el desmontaje de la comunicación célula-célula (Romanelli et al., 2019) siendo este resultado acorde con lo observado en nuestro trabajo, como se aprecia en las imágenes de la condición 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación obtenidas por microscopía óptica (Fig. 7f). La

desorganización estructural se encuentra asociada con contracciones disfuncionales y arritmia (Kanno & Saffitz, 2001; Hung et al., 2017; Romanelli et al., 2019).

Nuestros resultados preliminares mostraron una expresión disminuida de la actina F en la condición 33 mM glucosa + PA, al realizar la cuantificación por fluorescencia en el plano medio de la célula (datos no mostrados). Datos consistentes con Nemoto et al., (2006). Sin embargo, al realizar la cuantificación en varios planos (*stacks*) (Fig. 16) se demostró que la actina F no presenta diferencias significativas entre los grupos. Estos resultados sugieren que la disminución de la actina F previamente publicada por otros autores quizás se deba solamente a que las imágenes fueron recabadas en un único plano.

Sin embargo, a pesar de no haber constatado diferencias en la expresión de la actina F, se observó gran desorganización de la misma (Fig. 17). Se constató un marcado desplazamiento de los haces hacia la periferia celular. El número de haces de actina F en la zona distal fue 2.83 veces mayor y la distancia entre los mismos fue 1.9 veces menor para la condición 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Se observó el mismo comportamiento en células vasculares de la musculatura lisa (Qiu et al., 2010) y en las células H9c2 cuando estas son tratadas con un fuerte inductor de la hipertrofia como la endotelina (Watkins et al., 2011).

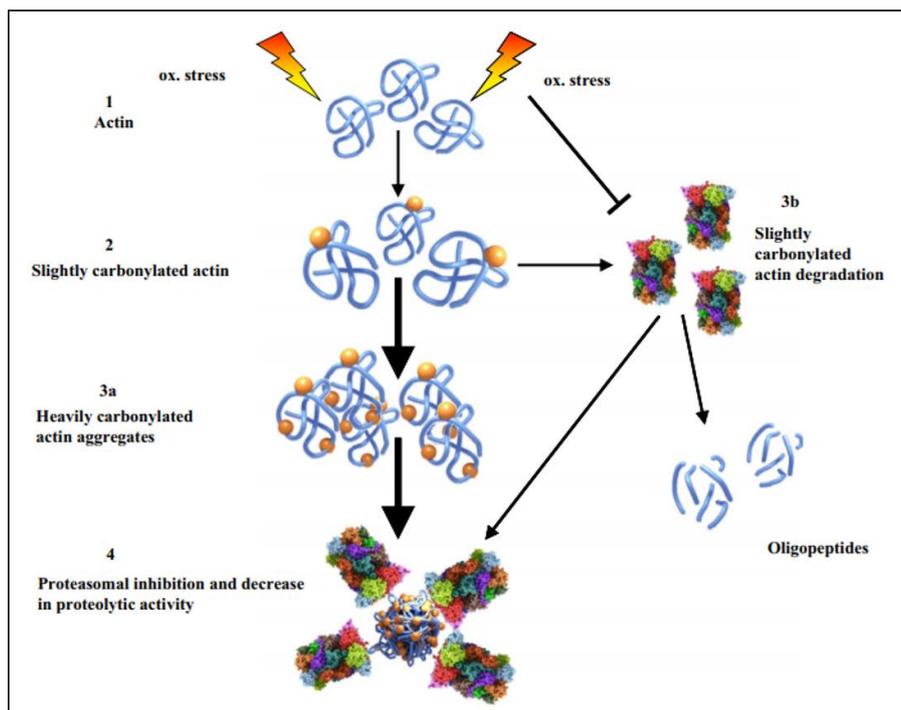
#### 6.2.4. Análisis de la expresión de la actina total por western blot

El análisis de la actina total reflejó que las bandas correspondientes al control presentan un peso molecular cercano a 42 KDa, sin embargo, las bandas del grupo 33 mM glucosa + PA presentan un peso molecular aparente de 72.1 KDa (Fig. 18). Se descartó, mediante otro *western blot* (Fig. 19), que la banda perteneciente al grupo 33mM glucosa + PA se deba a problemas en la lisis celular, ya que se utilizó en este caso una mayor concentración de *buffer* de lisis. Asimismo, se descartó que se deba a la acción de la hiperglicemia (33 mM) o a la hiperlipidemia (5.5 mM glucosa + PA) independientemente (Fig. 19). Estos resultados indicarían en conjunto que el comportamiento observado en la banda del grupo 33 mM glucosa + PA es resultado únicamente de la sinergia.

Se utilizó como control de carga GAPDH ya que otros trabajos mostraron que su expresión no se veía alterada en corazones diabéticos (Hu et al., 2008; Zhao et al., 2013; Liu et al., 2014). Este control demuestra que la cantidad de proteína total sembrada en el gel de poliacrilamida fue equivalente entre los grupos. Además, se incubaron las membranas solamente con anticuerpo secundario y no se observaron bandas.

La actina es una proteína involucrada en múltiples funciones celulares, por lo que se encuentra muy expuesta a diversas modificaciones postraduccionales (MPT) (Cytoskeleton Inc, 2018). Se han descrito al menos 17 MPT (Terman & Kashina, 2013). La carbonización es un proceso muy frecuente que conduce a la formación irreversible de un producto enzimático alterando el plegamiento de la proteína y promoviendo la formación de agregados (proteínas no solubles) (Dalle-Donne et al., 2003; Terman & Kashina, 2013).

Si una proteína se encuentra expuesta a oxidantes, se oxida causando un plegamiento incorrecto de la misma. En condiciones normales estos plegamientos son eliminados por el proteosoma (20s). Sin embargo, si la cantidad de oxidantes es creciente, excede la capacidad del proteosoma favoreciendo la formación de agregados (Jung et al., 2007). Castro y colaboradores demostraron que al incubar células Jurkat (células T) en elevadas concentraciones de  $H_2O_2$ , se forman grandes agregados de actina con un peso molecular cercano a 75 KDa (Castro et al., 2012). El mecanismo propuesto por estos autores se observa en la Fig. 23.



**Figura 23.- Eventos propuestos para la formación de agregados de actina y la inhibición del proteosoma.** La actina nativa (1) se oxida moderadamente si las células son estimuladas con  $H_2O_2$  (2). En condiciones normales la actina oxidada es degradada por el proteosoma (3b) pero si el estrés oxidativo persiste y es creciente, se comienza a deteriorar lentamente el proteosoma, inhibiéndose por completo cuando los agregados de actina (3a) se unen al mismo (4). Figura extraída de (Castro et al., 2012)

*In vitro*, la actina presenta una elevada susceptibilidad a la formación de agregados por la carbonización y se ha reportado en células de la médula espinal de rata (Aktories et al., 2011), células musculares de mejillón (Okamoto et al., 1997) y células T del sistema inmunitario (Castro

et al., 2012). Los agregados generan alteraciones en la estructura y dinamismo del citoesqueleto de actina y parecen inducir la senescencia en algunos tipos celulares (Sitte et al., 2000; Grune et al., 2004). Células que entran en senescencia pierden su capacidad de dividirse y proliferar presentando una morfología muy similar a las células observadas en el presente trabajo por microscopía óptica (Fig. 7f).

Nuestros resultados sugieren que la glicolipototoxicidad podría estar produciendo mayor cantidad de ROS que la hiperglicemia o la hiperlipidemia independientemente mostrando un efecto sinérgico e induciendo posiblemente la formación de agregados en la actina (banda de 72.1 KDa).

#### 6.2.5. Análisis de la nanomecánica celular

Las propiedades biomecánicas de las células animales están principalmente determinadas por su citoesqueleto (Zhu et al., 2000; Bao & Suresh, 2003; Rebelo et al., 2013), y reflejan su estado e interacción con el entorno circundante (relación intercelular y matriz extracelular) (Rianna & Radmacher, 2016). Se ha demostrado que la MCD provoca una pérdida de la elasticidad o endurecimiento del tejido cardíaco (Poornima et al., 2006; Murarka & Movahed, 2010; Battiprolu et al., 2013) por la acumulación de las fibras de colágeno que se intercalan entre las fibras musculares (Van Heerebeek et al., 2008). Sin embargo, experimentos realizados en cardiomiocitos provenientes de ratones DM1 han sugerido que la pérdida en la elasticidad celular se debe, en parte, a modificaciones en el citoesqueleto celular (Benech et al., 2014, 2015). Wu y colaboradores mostraron que el valor de módulo de Young, determinado por el método de nano-indentación, fue 80 % actina dependiente (Wu et al., 2010). Estos autores mostraron la disminución del módulo de Young en cardiomiocitos cuando las células eran tratadas con citocalasina D. En ausencia de citocalasina D, la rigidez fue aproximadamente de 30 kPa y de aproximadamente 5 kPa en presencia de la droga (Wu et al., 2010).

Es nuestro trabajo, la rigidez de las células incubadas en la condición 33 mM glucosa + PA fue mayor que las incubadas en la condición control, siendo 1.54 veces mayor en la región central y 1.63 veces mayor en la región distal (Fig. 22). Estos resultados son acordes con lo observado previamente por otros autores (Benech et al., 2014; Michaelson et al., 2014). Benech y colaboradores evidenciaron un aumento en el valor del módulo de Young (rigidez celular), al trabajar con cardiomiocitos aislados de ratones DM1, presentando los ratones controles una rigidez de 43 KPa  $\pm$  7 KPa y los diabéticos de 91 KPa  $\pm$  14 KPa (Benech et al., 2014, 2015). Michaelson y colaboradores también reportaron un aumento en la rigidez celular en

cardiomiocitos aislados cultivados en condiciones de hiperglicemia (30.5 mM) o hiperlipidemia (500  $\mu$ M PA). En ambas condiciones los autores reportan que no observaron modificaciones en el citoesqueleto de actina. Es importante destacar que los mencionados autores no realizaron el estudio en un medio hiperglicémico e hiperlipidémico como en nuestro caso. También el tiempo de incubación de las células fue menor (24 h) (Michaelson et al., 2014). Tal vez, para poder observar claramente las modificaciones del citoesqueleto de actina sea necesario una acción conjunta de hiperglicemia e hiperlipidemia durante un tiempo más prolongado.

Es sabido que el MFA es una herramienta muy versátil que presenta la capacidad de poder detectar cambios en el citoesqueleto de actina en células vivas (Vinckier & Semenza, 1998; Lieber et al., 2004; Rianna & Radmacher, 2016) por lo que nuestros resultados podrían sugerir que el corrimiento de la actina F hacia la periferia celular (Fig. 17) podría correlacionarse con el aumento de rigidez en la misma zona (Fig. 22). Para poder dilucidar esto, se intentó en varias oportunidades observar la misma célula por MFA y por MLC, de manera de obtener un mapa de rigidez correlacionado con la distribución espacial de la actina F pero no fue posible. Luego de ser escaneadas por el MFA las células pierden matriz extracelular y es posible que al realizar la tinción con faloidina las mismas se despeguen.

En suma, nuestro trabajo ha sido pionero en caracterizar y cuantificar, mediante mapas de elasticidad celular, el cambio en la rigidez de las células H9c2 inducido por incubación de las mismas en condiciones de hiperglicemia e hiperlipidemia. Además, se pudo correlacionar la distribución de la rigidez celular con la distribución espacial del citoesqueleto de actina. Estos resultados demuestran que el modelo *in vitro* utilizado se asemeja mucho a lo estudiado previamente por otros autores en cardiomiocitos aislados de ratones o ratas con DM.

## 7. CONCLUSIONES

En base a los resultados concluimos que: la condición 33 mM glucosa + PA fue la condición experimental que permitió realizar una evaluación cuantitativa de los cambios morfo-fisiológicos generados por la presencia de altas concentraciones de glucosa y de PA.

En esta condición, se detectó una mayor muerte celular apoptótica y un importante cambio morfológico como resultado de la glicolipototoxicidad. Estos cambios morfológicos se correspondieron con alteraciones en la distribución espacial de la actina F, sin alterar su expresión y un cambio en la actina total que conduce a una posible formación de agregados. La rigidez celular fue mayor en la condición 33 mM glucosa + PA al compararse con las células control, correspondiendo la zona de mayor rigidez a la periferia celular; la cual contiene mayor cantidad de haces de actina F.

## 8. PERSPECTIVAS

- Colocalizar la misma célula por MLC y MFA para poder observar los cambios inducidos por la condición 33 mM glucosa + PA en la misma célula.
- Análisis de la banda obtenida en la condición 33 mM glucosa + PA mediante espectrometría de masas para poder dilucidar a que se debe el aumento del peso molecular.
- Analizar el efecto de drogas para evaluar si logran revertir las alteraciones inducidas por la condición 33 mM glucosa + PA a las 72 h de incubación. Se podrían evaluar drogas como diaformina, resveratrol, o liraglutide. La diaformina es la droga por excelencia utilizada en el mercado para pacientes con DM2. El resveratrol es un potente antioxidante y experiencias previas en nuestro laboratorio indicarían que genera efectos positivos en la DM1 (Zambrana, 2016). Por otro lado, liraglutide es un nuevo fármaco que se encuentra en estudio para el tratamiento y prevención de obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares.

## 9. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a los miembros del tribunal por sus aportes tan enriquecedores. A mis tutores, el Dr. Juan Claudio Benech y al Dr. Gustavo Folle por su gran disposición y apoyo para poder llevar a cabo mi tesis de maestría. Asimismo, a Damián Estrada por brindarme en reiteradas ocasiones viales de la línea celular H9c2.

A mis compañeros de laboratorio, Gerardo Romanelli e Ines Rauschert por el apoyo constante tanto a nivel profesional como personal. A mi familia y mi pareja por su confianza y apoyo incondicional, hoy y siempre.

Además, y no menos importante, agradecer a PEDECIBA, al IIBCE y a la ANII.

A todos, gracias por hacer esto posible.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aktories, K., Lang, A. E., Schwan, C., & Mannherz, H. G. (2011). Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *The FEBS Journal*, 278(23), 4526-4543.
- Alabi, T. D., Chegou, N. N., Brooks, N. L., & Oguntibeju, O. O. (2020). Effects of *Anchomanes difformis* on Inflammation, Apoptosis, and Organ Toxicity in STZ-Induced Diabetic Cardiomyopathy. *Biomedicines*, 8(2).
- Alberro, A. (2016). *Diabetes mellitus: cambios morfológicos, muerte celular y alteraciones del citoesqueleto de actina inducidos por hiperglucemia e hiperlipidemia en la línea celular H9c2 de mioblastos de embriones de rata*. PEDECIBA, Tesis de Maestría. Universidad de la República.
- Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 15(7), 539-553.
- Althunibat, O. Y., Al Hroob, A. M., Abukhalil, M. H., Germoush, M. O., Bin-Jumah, M., & Mahmoud, A. M. (2019). Fisetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Life Sciences*, 221, 83-92.
- Amaral, N., & Okonko, D. O. (2015). Metabolic abnormalities of the heart in type II diabetes. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 12(4), 239-248.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(1), 81-90.
- American Diabetes Association. (2015). American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 38(1), 8-16.
- American Diabetes Association. (2019). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 42(Supplement 1), S13-S28.
- Avogaro, A., Nosadini, R., Doria, A., Fioretto, P., Velussi, M., Vigorito, C., Saccà, L., Toffolo, G., Cobelli, C., Trevisan, R., & al., et. (1990). Myocardial metabolism in insulin-deficient diabetic humans without coronary artery disease. *The American Journal of Physiology*, 258(4 Pt 1), E606-E618.
- Bao, G., & Suresh, S. (2003). Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*, 2(11), 715-725.
- Barden, J. A., Miki, M., Hambly, B. D., & Dos Remedios, C. G. (1987). Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *European Journal of Biochemistry*, 162(3), 583-588.
- Baribault, H. (2016). Mouse Models of Type 2 Diabetes Mellitus in Drug Discovery. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1438, 153-175.
- Barsotti, A., Giannoni, A., Di Napoli, P., & Emdin, M. (2009). Energy metabolism in the normal and in the diabetic heart. *Current Pharmaceutical Design*, 15(8), 836-840.
- Battiprolu, P. K., Lopez-Crisosto, C., Wang, Z. V., Nemchenko, A., Lavandero, S., & Hill, J. A. (2013). Diabetic cardiomyopathy and metabolic remodeling of the heart. *Life Sciences*, 92(11), 609-615.

- Benech, J. C., Benech, N., Zambrana, A. I., Rauschert, I., Bervejillo, V., & Oddone, N. (2015). Intrinsic nanomechanical changes in live diabetic cardiomyocytes. *Cardiovascular Regenerative Medicine*, 2(e893), 1-8.
- Benech, J. C., Benech, N., Zambrana, A. I., Rauschert, I., Bervejillo, V., Oddone, N., & Damián, J. P. (2014). Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 307(10), C910-C919.
- Bergman, R. N., & Ader, M. (2000). Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 11(9), 351-356.
- Berthier, S., Larrouquère, L., Champelovier, P., Col, E., Lefebvre, C., Cottet-Rouselle, C., Arnaud, J., Garrel, C., Laporte, F., Boutonnat, J., Faure, P., & Hazane-Puch, F. (2019). A new patient-derived metastatic glioblastoma cell line: Characterisation and response to sodium selenite anticancer agent. *Cancers*, 11(1), 12.
- Birchmeier, W. (1984). Cytoskeleton structure and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 9(4), 192-195.
- Boden, G. (2001). Pathogenesis of type 2 Diabetes: Insulin Resistance. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 30(4), 801-815.
- Boudina, S., & Abel, E. D. (2007). Diabetic Cardiomyopathy Revisited. *Circulation*, 115(25), 3213-3223.
- Boudina, S., & Abel, E. D. (2010). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 11(1), 31-39.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cai, & Kang, Y. . (2001). Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovascular Toxicology*, 1(3), 181-193.
- Cai, & Kang, Y. J. (2003). Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Toxicology*, 3(3), 219-228.
- Cai, Li, W., Wang, G., Guo, L., Jiang, Y., & Kang, Y. J. (2002). Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Mouse Myocardium. *Diabetes*, 51(6), 1938-1948.
- Candido, R., Srivastava, P., Cooper, M. E., & Burrell, L. M. (2003). Diabetes mellitus: a cardiovascular disease. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 4(9), 1088-1094.
- Carin, A. ., & Sund, R. . (2018). *Blebbing of hydrogel during volume-phase transition*. 1, 430-439.
- Castro, J. P., Ott, C., Jung, T., Grune, T., & Almeida, H. (2012). Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(4), 916-925.
- Chang, W., Zhang, M., Meng, Z., Yu, Y., Yao, F., Hatch, G. M., & Chen, L. (2015). Berberine treatment prevents cardiac dysfunction and remodeling through activation of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase in type 2 diabetic rats and in palmitate-induced hypertrophic H9c2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 769, 55-63.
- Chattopadhyay, J., Thompson, E. W., & Schmid, H. H. (1990). Elevated levels of nonesterified fatty acids in the myocardium of alloxan diabetic rats. *Lipids*, 25(6), 307-310.

- Chen, P.-Y., Shih, N.-L., Hao, W.-R., Chen, C.-C., Liu, J.-C., & Sung, L.-C. (2018). Inhibitory Effects of Momordicine I on High-Glucose-Induced Cell Proliferation and Collagen Synthesis in Rat Cardiac Fibroblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-11.
- Chen, Tsai, P.-J., Tai, H.-C., Tsai, R.-L., Chang, Y.-T., Wang, M.-C., Chiou, Y.-W., Yeh, M.-L., Tang, M.-J., Lam, C.-F., Shiesh, S.-C., Li, Y.-H., Tsai, W.-C., Chou, C.-H., Lin, L.-J., Wu, H.-L., & Tsai, Y.-S. (2013). Increased Aortic Stiffness and Attenuated Lysyl Oxidase Activity in Obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(4), 839-846.
- Chiu, H. C., Kovacs, A., Ford, D. A., Hsu, F. F., Garcia, R., Herrero, P., Saffitz, J. E., & Schaffer, J. E. (2001). A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(7), 813-822.
- Chou, H.-C., Chen, Y.-W., Lee, T.-R., Wu, F.-S., Chan, H.-T., Lyu, P.-C., Timms, J. F., & Chan, H.-L. (2010). Proteomics study of oxidative stress and Src kinase inhibition in H9C2 cardiomyocytes: a cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(1), 96-108.
- Cooper, G. J. S., Phillips, A. R. J., Choong, S. Y., Leonard, B. L., Crossman, D. J., Brunton, D. H., Saafi, 'Etuat L, Dissanayake, A. M., Cowan, B. R., Young, A. A., Occlshaw, C. J., Chan, Y.-K., Leahy, F. E., Keogh, G. F., Gamble, G. D., Allen, G. R., Pope, A. J., Boyd, P. D. W., Poppitt, S. D., ... Baker, J. R. (2004). Regeneration of the heart in diabetes by selective copper chelation. *Diabetes*, 53(9), 2501-2508.
- Cousin, S. P., Hügl, S. R., Wrede, C. E., Kajio, H., Myers Jr., M. G., & Rhodes, C. J. (2001). Free Fatty Acid-Induced Inhibition of Glucose and Insulin-Like Growth Factor I-Induced Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Pancreatic  $\beta$ -Cell Line INS-1. *Endocrinology*, 142(1), 229-240.
- Cytoskeleton Inc. (2018). *Post-Translational Modifications of Actin*. The protein experts. [www.cytoskeleton.com](http://www.cytoskeleton.com).
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 169-176.
- Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet*, 367(9513), 847-858.
- De Santis, L. P., Garcia, C. L., Balajee, A. S., Brea Calvo, G. T., Bassi, L., & Palitti, F. (2001). Transcription coupled repair deficiency results in increased chromosomal aberrations and apoptotic death in the UV61 cell line, the Chinese hamster homologue of Cockayne's syndrome B. *Mutation Research - DNA Repair*, 485(2), 121-132.
- De Vries, J., & Wieland, T. (1978). Influence of phallotoxins and metal ions on the rate of proteolysis of actin. *Biochemistry*, 17(10), 1965-1968.
- Depre, C., Young, M. E., Ying, J., Ahuja, H. S., Han, Q., Garza, N., Davies, P. J., & Taegtmeyer, H. (2000). Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(6), 985-996.
- Dominguez, R., & Holmes, K. (2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 169-186.
- Dyntar, D., Eppenberger-Eberhardt, M., Maedler, K., Pruschy, M., Eppenberger, H. M., Spinas, G. A., & Donath, M. Y. (2001). Glucose and Palmitic Acid Induce Degeneration of Myofibrils and Modulate Apoptosis in Rat Adult Cardiomyocytes. *Diabetes*, 50(9), 2105-2113.

- Earnshaw, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(3), 337-343.
- Etuk, E. (2010). Animal models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1, 130-134.
- Feuerstein, G. Z., & Young, P. R. (2000). Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovascular Research*, 45(3), 560-569.
- Fiordaliso, F., Li, B., Latini, R., Sonnenblick, E. H., Anversa, P., Leri, A., & Kajstura, J. (2000). Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II- dependent. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 80(4), 513-527.
- Fonarow, G. C., & Srikanthan, P. (2006). Diabetic Cardiomyopathy. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 35(3), 575-599.
- Forouhi, N. G., Koulman, A., Sharp, S. J., Imamura, F., Kröger, J., Schulze, M. B., Crowe, F. L., Huerta, J. M., Guevara, M., Beulens, J. W. J., van Woudenberg, G. J., Wang, L., Summerhill, K., Griffin, J. L., Feskens, E. J. M., Amiano, P., Boeing, H., Clavel-Chapelon, F., Dartois, L., ... Wareham, N. J. (2014). Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 2(10), 810-818.
- Frustaci, A., Kajstura, J., Chimenti, C., Jakoniuk, I., Leri, A., Maseri, A., Nadal-Ginard, B., & Anversa, P. (2000). Myocardial cell death in human diabetes. *Circulation Research*, 87(12), 1123-1132.
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 70, 5.47.1-5.47.20.
- Gil-Ortega, I., & Kaskia, C. (2006). *Miocardopatía diabética*. 127(15), 584-594.
- Glotzer, M. (2017). Cytokinesis in Metazoa and Fungi. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(10), 1-18.
- Grazi, E. (1997). What is the diameter of the actin filament? *FEBS Letters*, 405(3), 249-252.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., & Davies, K. J. A. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and «aggresomes» during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2519-2530.
- Grynberg, A. (2005). Effectors of fatty acid oxidation reduction: promising new anti-ischaemic agents. *Current Pharmaceutical Design*, 11(4), 489-509.
- Guan, G., Lei, L., Lv, Q., Gong, Y., & Yang, L. (2019). Curcumin attenuates palmitic acid-induced cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in H9C2 cardiomyocytes. *Human & Experimental Toxicology*, 38(6), 655-664.
- Guo, S., Meng, X., Yang, X., Liu, X., Ou-Yang, C., & Liu, C. (2018). Curcumin administration suppresses collagen synthesis in the hearts of rats with experimental diabetes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(2), 195-204.
- Han, H., Long, H., Wang, H., Wang, J., Zhang, Y., & Wang, Z. (2004). Progressive apoptotic cell death triggered by transient oxidative insult in H9c2 rat ventricular cells: a novel pattern of apoptosis and the mechanisms. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(6), H2169-H2182.

- Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., & Schultz, G. (1991). Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circulation Research*, *69*(6), 1476-1486.
- Hsiao, Y.-H., Lin, C.-I., Liao, H., Chen, Y.-H., & Lin, S.-H. (2014). Palmitic acid-induced neuron cell cycle G2/M arrest and endoplasmic reticular stress through protein palmitoylation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(11), 20876-20899.
- Hu, J., Klein, J. D., Du, J., & Wang, X. H. (2008). Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitin-proteasome system by insulin deficiency. *Endocrinology*, *149*(11), 5384-5390.
- Huisamen, B., Essop, M. F., & Johnson, R. (2016). Phenylpyruvic Acid-2-O- $\beta$ -D Glucoside Attenuates High Glucose-Induced Apoptosis in H9c2 Cardiomyocytes. *Planta Medica*, 1468-1474.
- Hung, C.-L., Pan, S.-H., Han, C.-L., Chang, C.-W., Hsu, Y.-L., Su, C.-H., Shih, S.-C., Lai, Y.-J., Chiang Chiau, J.-S., Yeh, H.-I., Liu, C.-Y., Lee, H.-C., & Lam, C. S. P. (2017). Membrane Proteomics of Impaired Energetics and Cytoskeletal Disorganization in Elderly Diet-Induced Diabetic Mice. *Journal of Proteome Research*, *16*(10), 3504-3513.
- Huynh, K., Kiriazis, H., Du, X.-J., Love, J. E., Gray, S. P., Jandeleit-Dahm, K. A., McMullen, J. R., & Ritchie, R. H. (2013). Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, *60*, 307-317.
- Ilkovski, B., Clement, S., Sewry, C., North, K. N., & Cooper, S. T. (2005). Defining alpha-skeletal and alpha-cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy. *Neuromuscular Disorders : NMD*, *15*(12), 829-835.
- International Diabetes Federation. (2017). *IFD Diabetes Atlas*. 1-24.
- International Diabetes Federation. (2019). *IFD Diabetes Atlas*. 1-176.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., ... Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, *422*(6928), 173-176.
- Jia, G., DeMarco, V. G., & Sowers, J. R. (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nature Reviews. Endocrinology*, *12*(3), 144-153.
- Jia, G., Whaley-Connell, A., & Sowers, J. R. (2018). Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*, *61*(1), 21-28.
- Jiang, H., Liang, C., Liu, X., Jiang, Q., He, Z., Wu, J., Pan, X., Ren, Y., Fan, M., Li, M., & Wu, Z. (2010). Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. *Atherosclerosis*, *210*(1), 71-77.
- Joshi, N. V., Medina, H., & Osuna, J. A. (2001). Ultrastructural pathology of varicocele spermatozoa by using Atomic Force Microscopy (AFM). *Archives of Andrology*, *47*(2), 143-152.

- Jung, T., Bader, N., & Grune, T. (2007). Oxidized proteins: Intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), 231-237.
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840-846.
- Kannel, W. B., & McGee, D. L. (1979). Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*, 59(1), 8-13.
- Kanno, S., & Saffitz, J. E. (2001). The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 10(4), 169-177.
- Kawaguchi, M., Asakura, T., Saito, F., Nemoto, O., Maehara, K., Miyake, K., Sugai, N., & Maruyama, Y. (1999). Changes in diameter size and F-actin expression in the myocytes of patients with diabetes and streptozotocin-induced diabetes model rats. *Journal of Cardiology*, 34(6), 333-339.
- Kemeny, S. F., Figueroa, D. S., & Clyne, A. M. (2013). Hypo- and hyperglycemia impair endothelial cell actin alignment and nitric oxide synthase activation in response to shear stress. *PLoS One*, 8(6), e66176-e66176.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kimes, B. W., & Brandt, B. L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental Cell Research*, 98(2), 367-381.
- Knaapen, P., Germans, T., Knuuti, J., Paulus, W. J., Dijkmans, P. A., Allaart, C. P., Lammertsma, A. A., & Visser, F. C. (2007). Myocardial energetics and efficiency: current status of the noninvasive approach. *Circulation*, 115(7), 918-927.
- Korn, E. D., Carlier, M. F., & Pantaloni, D. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science*, 238(4827), 638-644.
- Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A., & Zhdanov, R. I. (2007). Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 38(8), 824-833.
- Lee, M. M. Y., McMurray, J. J. V., Lorenzo-Almorós, A., Kristensen, S. L., Sattar, N., Jhund, P. S., & Petrie, M. C. (2019). Diabetic cardiomyopathy. *Heart*, 105(4), 337-345.
- Lenčo, J., Lenčová-Popelová, O., Link, M., Jirkovská, A., Tambor, V., Potůčková, E., Stulík, J., Šimůnek, T., & Štěřba, M. (2015). Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model. *Experimental Cell Research*, 339(2), 174-186.
- Leroy, C., Tricot, S., Lacour, B., & Grynberg, A. (2008). Protective effect of eicosapentaenoic acid on palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(11), 685-693.
- Li, L., Luo, W., Qian, Y., Zhu, W., Qian, J., Li, J., Jin, Y., Xu, X., & Liang, G. (2019). Luteolin protects against diabetic cardiomyopathy by inhibiting NF-kappaB-mediated inflammation and activating the Nrf2-mediated antioxidant responses. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 59, 152774.
- Li, Liu, L., Xi, N., & Wang, Y. (2018). Atomic force microscopy studies on cellular elastic and viscoelastic properties. *Science China Life Sciences*, 61(1), 57-67.

- Liao, R., & Jain, M. (2007). Isolation, culture, and functional analysis of adult mouse cardiomyocytes. *Methods in Molecular Medicine*, 139, 251-262.
- Lieber, S. C., Aubry, N., Pain, J., Diaz, G., Kim, S.-J., & Vatner, S. F. (2004). Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(2), H645-H651.
- Listenberger, L. L., & Schaffer, J. E. (2002). Mechanisms of lipoapoptosis: implications for human heart disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12(3), 134-138.
- Liu, Huang, Q. X., Lou, F. C., Zhang, L., Wang, K., Yu, S., Xu, H., Wang, Q., Zhang, Y., & Hou, W. K. (2013). Effects of glucose and insulin on the H9c2 (2-1) cell proliferation may be mediated through regulating glucose transporter 4 expression. *Chinese Medical Journal*, 126(21), 4037-4042.
- Liu, Q., Wang, S., & Cai, L. (2014). Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. *Journal of Diabetes Investigation*, 5(6), 623-634.
- Lopaschuk. (1996). Abnormal mechanical function in diabetes: relationship to altered myocardial carbohydrate/lipid metabolism. *Coronary Artery Disease*, 7(2), 116-123.
- Lopaschuk. (2002). Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Failure Reviews*, 7(2), 149-159.
- Lovejoy, J. C., Smith, S. R., Champagne, C. M., Most, M. M., Lefevre, M., DeLany, J. P., Denkins, Y. M., Rood, J. C., Veldhuis, J., & Bray, G. A. (2002). Effects of Diets Enriched in Saturated (Palmitic), Monounsaturated (Oleic), or trans (Elaidic) Fatty Acids on Insulin Sensitivity and Substrate Oxidation in Healthy Adults. *Diabetes Care*, 25(8), 1283-1288.
- Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., & Mayer-Davis, E. J. (2010). Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(3), 481-497.
- Manco, M., Mingrone, G., Greco, A. V., Capristo, E., Gniuli, D., De Gaetano, A., & Gasbarrini, G. (2000). Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(2), 220-224.
- Mei, S., Ni, H.-M., Manley, S., Bockus, A., Kassel, K. M., Luyendyk, J. P., Copple, B. L., & Ding, W.-X. (2011). Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339(2), 487-498.
- Ménard, C., Pupier, S., Mornet, D., Kitzmann, M., Nargeot, J., & Lory, P. (1999). Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2 cardiac cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 29063-29070.
- Michaelson, J., Hariharan, V., & Huang, H. (2014). Hyperglycemic and hyperlipidemic conditions alter cardiac cell biomechanical properties. *Biophysical Journal*, 106(11), 2322-2329.
- Miranda-Diaz, A. G., Pazarin-Villasenor, L., Yanowsky-Escatell, F. G., & Andrade-Sierra, J. (2016). Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy with Early Chronic Kidney Disease. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 7047238.
- Mozaffarian, D. et al. (2015). Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 131, 29-322.

- Mu, Y. M., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C. H., Mukasa, C., Okabe, T., Nomura, M., Goto, K., & Nawata, H. (2001). Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology*, *142*(8), 3590-3597.
- Müller, D. J., & Dufrêne, Y. F. (2011). Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology*, *21*(8), 461-469.
- Murarka, S., & Movahed, M. R. (2010). Diabetic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*, *16*(12), 971-979.
- Nemoto, O., Kawaguchi, M., Yaoita, H., Miyake, K., Maehara, K., & Maruyama, Y. (2006). Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Circulation Journal*, *70*(3), 327-334.
- Nichols, G. A., Hillier, T. A., Erbey, J. R., & Brown, J. B. (2001). Congestive Heart Failure in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, *24*(9), 1614-1619.
- Nolan, P. B., Carrick-Ranson, G., Stinear, J. W., Reading, S. A., & Dalleck, L. C. (2017). Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis. *Preventive Medicine Reports*, *7*, 211-215.
- O'Keefe, J. H., & Bell, D. S. H. (2007). Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Cardiology*, *100*(5), 899-904.
- O'Neill, S., & O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*, *16*(1), 1-12.
- Okamoto, H., Fujita, H., Matsuyama, S., & Tsuyama, S. (1997). Purification, Characterization, and Localization of an ADP-ribosylactin Hydrolase That Uses ADP-ribosylated Actin from Rat Brains as a Substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*, 28116-28125.
- Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. (2018). Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *29*(3), 178-190.
- Pappachan, J. M., Varughese, G. I., Sriraman, R., & Arunagirinathan, G. (2013). Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. *World Journal of Diabetes*, *4*(5), 177-189.
- Park, M., Sabetski, A., Kwan Chan, Y., Turdi, S., & Sweeney, G. (2015). Palmitate Induces ER Stress and Autophagy in H9c2 Cells: Implications for Apoptosis and Adiponectin Resistance. *Journal of Cellular Physiology*, *230*(3), 630-639.
- Paulson, D. J., & Crass, M. F. (1982). Endogenous triacylglycerol metabolism in diabetic heart. *The American Journal of Physiology*, *242*(6), H1084-H1094.
- Pawelczyk, T., Sakowicz, M., Szczepanska-Konkel, M., & Angielski, S. (2000). Decreased expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *375*(1), 1-6.
- Poornima et al. (2006). Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circulation Research*, *98*, 596-605.
- Pu, J., Zhu, S., Zhou, D., Zhao, L., Yin, M., Wang, Z., & Hong, J. (2019). Propofol Alleviates Apoptosis Induced by Chronic High Glucose Exposure via Regulation of HIF-1 $\alpha$  in H9c2 Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 4824035.

- Qiu, H., Zhu, Y., Sun, Z., Trzeciakowski, J. P., Gansner, M., Depre, C., Resuello, R. R. G., Natividad, F. F., Hunter, W. C., Genin, G. M., Elson, E. L., Vatner, D. E., Meininger, G. A., & Vatner, S. F. (2010). Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circulation Research*, *107*(5), 615-619.
- Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, *37*(12), 1595-1607.
- Rebelo, L. M., De Sousa, J. S., Mendes Filho, J., & Radmacher, M. (2013). Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*, *24*(5), 055102.
- Rianna, C., & Radmacher, M. (2016). Cell mechanics as a marker for diseases: Biomedical applications of AFM. *AIP Conference Proceedings*, *1760*(1).
- Romanelli, G., Varela, R., & Benech, J. C. (2020). Diabetes induces differences in the F-actin spatial organization of striated muscles. *Cytoskeleton*, *2020*, 1-12.
- Romanelli, G., Varela, R., Rauschert, I., Espasandín, C., & Benech, J. C. (2019). New approaches to the morphophysiological study of cardiomyocytes with clinical relevance. *Advances in Medicine and Biology*, *155*, 111-178.
- Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y. Z., Kumral, T., Branwood, A. W., & Grishman, A. (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *American Journal of Cardiology*, *30*(6), 595-602.
- Sari, F. R., Watanabe, K., Thandavarayan, R. A., Harima, M., Zhang, S., Muslin, A. J., Kodama, M., & Aizawa, Y. (2010). 14-3-3 protein protects against cardiac endoplasmic reticulum stress (ERS) and ERS-initiated apoptosis in experimental diabetes. *Journal of Pharmacological Sciences*, *113*(4), 325-334.
- Sasaki, A., Horiuchi, N., Hasegawa, K., & Uehara, M. (1989). Mortality and causes of death in type 2 diabetic patients. A long-term follow-up study in Osaka District, Japan. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *7*(1), 33-40.
- Savage, D. B., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2007). Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, *87*(2), 507-520.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., & Maizel Jr, J. V. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *28*(5), 815-820.
- Sharma, S., Sdroog, J. V., Golfman, L., Uray, I., Lemm, J., Youker, K., Noon, G. P., Frazier, O., & Taegtmeyer, H. (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *The FASEB Journal*, *18*(14), 1692-1700.
- Shin, J.-A., Lee, J.-H., Lim, S.-Y., Ha, H.-S., Kwon, H.-S., Park, Y.-M., Lee, W.-C., Kang, M.-I., Yim, H.-W., Yoon, K.-H., & Son, H.-Y. (2013). Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *Journal of Diabetes Investigation*, *4*(4), 334-343.
- Singh, J. P., Larson, M. G., O'Donnell, C. J., Wilson, P. F., Tsuji, H., Lloyd-Jones, D. M., & Levy, D. (2000). Association of hyperglycemia with reduced heart rate variability (The Framingham Heart Study). *The American Journal of Cardiology*, *86*(3), 309-312.

- Sitte, N., Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W. D., Von Zglinicki, T., & Davies, K. J. (2000). Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *14*(11), 1490-1498.
- Stefan, N., Wahl, H. G., Fritsche, A., Häring, H., & Stumvoll, M. (2001). Effect of the pattern of elevated free fatty acids on insulin sensitivity and insulin secretion in healthy humans. *Hormone and Metabolic Research*, *33*(7), 432-438.
- Stone, P. H., Muller, J. E., Hartwell, T., York, B. J., Rutherford, J. D., Parker, C. B., Turi, Z. G., Strauss, H. W., Willerson, J. T., Robertson, T., Braunwald, E., & Jaffe, A. S. (1989). The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: Contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. *Journal of the American College of Cardiology*, *14*(1), 49-57.
- Susic, D., Varagic, J., Ahn, J., & Frohlich, E. D. (2004). Collagen cross-link breakers: a beginning of a new era in the treatment of cardiovascular changes associated with aging, diabetes, and hypertension. *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders*, *4*(1), 97-101.
- Svitkina, T. (2018). The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(1), 1-22.
- Swynghedauw, B. (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological Reviews*, *79*(1), 215-262.
- Szczepaniak, L. S., Victor, R. G., Orci, L., & Unger, R. H. (2007). Forgotten but not gone: The rediscovery of fatty heart, the most common unrecognized disease in America. *Circulation Research*, *101*(8), 759-767.
- Terman, J. R., & Kashina, A. (2013). Post-translational modification and regulation of actin. *Current Opinion in Cell Biology*, *25*(1), 30-38.
- Titus, M. A. (2018). Myosin-Driven Intracellular Transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(3), a021972.
- Tondeleir, D., Vandamme, D., Vandekerckhove, J., Ampe, C., & Lambrechts, A. (2009). Actin isoform expression patterns during mammalian development and in pathology: insights from mouse models. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *66*(10), 798-815.
- Tong, Z., Rajeev, G., Guo, K., Ivask, A., McCormick, S., Lombi, E., Priest, C., & Voelcker, N. H. (2018). Microfluidic Cell Microarray Platform for High Throughput Analysis of Particle-Cell Interactions. *Analytical Chemistry*, *90*(7), 4338-4347.
- Turku, A., Rinne, M. K., Boije Af Gennäs, G., Xhaard, H., Lindholm, D., & Kukkonen, J. P. (2017). Orexin receptor agonist Yan 7874 is a weak agonist of orexin/hypocretin receptors and shows orexin receptor-independent cytotoxicity. *PLoS One*, *12*(6), e0178526-e0178526.
- Van Heerebeek, L., Hamdani, N., Handoko, M. L., Falcao-Pires, I., Musters, R. J., Kupreishvili, K., Ijsselmuiden, A. J. J., Schalkwijk, C. G., Bronzwaer, J. G. F., Diamant, M., Borbély, A., van der Velden, J., Stienen, G. J. M., Laarman, G. J., Niessen, H. W. M., & Paulus, W. J. (2008). Diastolic Stiffness of the Failing Diabetic Heart. *Circulation*, *117*(1), 43-51.
- Vandekerckhove, J., Bugaisky, G., & Buckingham, M. (1986). Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, *261*(4), 1838-1843.

- Viana, G. S. B., Medeiros, A. C. C., Lacerda, A. M. R., Leal, L. K. A. M., Vale, T. G., & Matos, F. J. D. A. (2004). Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacology*, *4*, 4-9.
- Vinckier, A., & Semenza, G. (1998). Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Letters*, *430*(1), 12-16.
- Waddingham, M. T., Edgley, A. J., Tsuchimochi, H., Kelly, D. J., Shirai, M., & Pearson, J. T. (2015). Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World Journal of Diabetes*, *6*(7), 943-960.
- Wall, S. R., & Lopaschuk, G. D. (1989). Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1006*(1), 97-103.
- Walther, T. C., & Farese, R. V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 687-714.
- Wang, & Liao, J. . (2012). A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in Molecular Biology*, *821*, 421-433.
- Wang, Song, Y., Wang, Q., Kralik, P. M., & Epstein, P. N. (2006). Causes and Characteristics of Diabetic Cardiomyopathy. *The Review of Diabetic Studies*, *3*(3), 108-117.
- Watkins, S. J., Borthwick, G. M., & Arthur, H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, *47*(2), 125-131.
- Wegner, A., & Isenberg, G. (1983). 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(16), 4922-4925.
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *94*(3), 311-321.
- Wieland, T. (1986). The Chemistry of the Amatoxins, Phallotoxins and Virotoxins. *Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms*, *1*, 47-100.
- Winzell, M. S., & Ahrén, B. (2004). The High-Fat Diet–Fed Mouse. *Diabetes*, *53*(3), S215-S219.
- Wu, X., Sun, Z., Foskett, A., Trzeciakowski, J. P., Meininger, G. A., & Muthuchamy, M. (2010). Cardiomyocyte contractile status is associated with differences in fibronectin and integrin interactions. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *298*(6), H2071-H2081.
- Wyllie, A. H., Beattie, G. J., & Hargreaves, A. D. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *The Histochemical Journal*, *13*(4), 681-692.
- Xie, X.-W. (2017). Liquiritigenin attenuates cardiac injury induced by high fructose-feeding through fibrosis and inflammation suppression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *86*, 694-704.
- Yagyu, H., Chen, G., Yokoyama, M., Hirata, K., Augustus, A., Kako, Y., Seo, T., Hu, Y., Lutz, E. P., Merkel, M., Bensadoun, A., Homma, S., & Goldberg, I. J. (2003). Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, *111*(3), 419-426.

- Yu, T., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(8), 2653-2658.
- Zambrana, A. (2016). *Efecto del resveratrol en el corazón de ratones diabéticos*. PEDECIBA, Tesis de Maestría. Universidad de la República.
- Zhang, Cannell, M. B., Phillips, A. R. J., Cooper, G. J. S., & Ward, M.-L. (2008). Altered calcium homeostasis does not explain the contractile deficit of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, *57*(8), 2158-2166.
- Zhang, Wilson, L., Pettey, D., Arrant, C., Kowalski, C., Abel, E. D., & Symons, J. D. (2010). Palmitate evokes ceramide-dependent reactive oxygen species (ROS) generation from sources other than NADPH oxidase in bovine aortic endothelial cells (BAECs). *The FASEB Journal*, *24*(1), 602.7-602.7.
- 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. (2013). Heme oxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy. *PloS One*, *8*(9), e75927-e75927.
- Zhou, Y. T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., & Unger, R. H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(4), 1784-1789.
- Zhu, C., Bao, G., & Wang, N. (2000). Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *2*, 189-226.
- Zordoky, B. N. M., & El-Kadi, A. O. S. (2007). H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *56*(3), 317-322.