



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Tesi Doctoral

Estudi dels mecanismes  
moleculars implicats  
en el desenvolupament de  
la cardiomiopatia diabètica:  
paper del receptor  
nuclear ERR $\gamma$

Jaime Lasheras Márquez  
2016









Tesi Doctoral

## **Estudi dels mecanismes moleculars implicats en la cardiomiopatia diabètica: paper del receptor nuclear ERR $\gamma$**

**Jaime Lasheras Márquez**  
Barcelona, 2016

Laboratori de Metabolisme i Obesitat  
Unitat de Diabetis i Metabolisme  
Institut de Recerca Vall d'Hebron

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat Autònoma de Barcelona





Tesi Doctoral

## **Estudi dels mecanismes moleculars implicats en la cardiomiopatia diabètica: paper del receptor nuclear ERR $\gamma$**

**Jaime Lasheras Márquez**

Programa de Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina  
Barcelona, 2016

Josep Villena Delgado  
Director

Anna Meseguer Navarro  
Tutor

Jaime Lasheras Márquez





Per fi. Ha estat un camí llarg i dur, però ja s'acaba. Òbviament no he l'he fet sol. És un camí que fas acompanyat. Acompanyat de gent que t'ajuda i de qui aprens. Perquè jo he tingut la sort de poder compartir aquesta experiència amb gent que m'ha donat el seu suport, i això sempre ho fa tot més fàcil.

Primer de tot vull agrair al meu director, Pep, el haver-me donat aquesta oportunitat. També li vull agrair la seva ajuda, perquè sense ell, jo no estaria on soc ara. Gràcies per tot el que m'has ensenyat, per la teva paciència y per la teva ajuda. Estic orgullós d'haver-te tingut com a jefe

Han estat uns anys molt agradables, i això és gràcies a la gent amb qui he tingut l'honor de compartir tot aquest temps. Moltes gràcies Rosi. Sempre has estat allà cuidant de tots nosaltres. No podria haver tingut una millor companya enlloc. Gràcies Natàlia, per la teva ajuda, per ser com ets, i perquè he après molt de tu. Gràcies també a la gent que ha passat pel laboratori i amb qui he pogut compartir molts i grans moments: Patri, Lidia, Cristina, Mireia, Núria, Pau. No m'oblidaré mai de vosaltres.

També estic molt content d'haver pogut conèixer a tanta gent amb qui poder gaudir d'aquesta aventura. El personal del VHIR: Eulàlia, Rosa, Anna, Núria, Rai, Tao, Xavi i Pili. Els amics del VHIR: Conxi, Bea, Edu, Thais, Anna, Joan, Natàlia i Carla. I molta més gent. Ha sigut un gran plaer haver compartit tot això amb vosaltres.

Anna, a tu et vull agrair la teva ajuda, els teus ànims i que m'hagis fet costat. Sense tu m'hagués costat més del que em puc imaginar. Gràcies per compartir la teva vida amb mi.

Per últim vull donar les gràcies als meus pares, perquè sempre s'han sacrificat per mi i perquè és gràcies a ells que jo he pogut arribar fins aquí. També a la meva germana, per tot el que ha fet per mi.

Perquè tot això no és fàcil, però va millor si estàs ben acompanyat.



# Índex

Abreviacions

## **1. Introducció**

### 1.1. Diabetis Mellitus

### 1.2. Cardiomiopatia diabètica

1.2.1. Definició i prevalença de la cardiomiopatia diabètica

1.2.2. Fisiopatologia de la cardiomiopatia diabètica en humans

1.2.3. Diagnosi de la cardiomiopatia diabètica

1.2.4. Mecanismes patogènics de la cardiomiopatia diabètica

1.2.5. Tractament de la CMD

1.2.6. Models animals per a l'estudi de la CMD

### 1.3. Estrogen-Related Receptors

1.3.1. Receptors Nuclears

1.3.2. La família dels ERR

## **2. Hipòtesi i objectius**

## **3. Materials i Mètodes**

### 3.1. Estudis in vivo

3.1.1. Model de DMI

3.1.2. Model de DMII

3.1.3. Generació dels ratolins transgènics que sobreexpressen hERRγ a cor

3.1.4. Genotipatge dels ratolins

- 3.1.5. Estudis ecocardiogràfics
- 3.1.6. Obtenció de teixits i de sang
- 3.1.7. Anàlisi de l'expressió del transgen  $\alpha$ -MHC-2xFlag-ERR $\gamma$  en ratolins transgènics
  - 3.1.8. Anàlisis histològics
  - 3.1.9. Anàlisi dels paràmetres serològics
- 3.2. Estudis in vitro
  - 3.2.1. Línies cel·lulars
  - 3.2.2. Cultius cel·lulars
  - 3.2.3. Generació d'un adenovirus per sobreexpressar 2xFlag-hERR $\gamma$
  - 3.2.4. Transducció de cèl·lules amb vectors adenovirals.
- 3.3. Anàlisi de l'expressió gènica
  - 3.3.1. Extracció de RNA
  - 3.3.2. Quantificació i determinació de la qualitat del RNA
  - 3.3.3. Anàlisi dels perfils d'expressió gènica mitjançant microarrays de DNA de cors de ratolins diabètics
  - 3.3.4. Mesura de l'expressió gènica mitjançant PCR quantitativa en temps real
- 3.4. Anàlisi de proteïnes
  - 3.4.1. Extracció de proteïnes
  - 3.4.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS
  - 3.4.3. Western Blot
- 3.5. Anàlisi estadística

## **4. Resultats**

- 4.1. Models experimentals per l'estudi de la CMD
  - 4.1.1. Caracterització del model de DMI induït per STZ
  - 4.1.2. Caracterització del model de DMII *db/db*

## 4.2. Perfils d'expressió gènica dels ratolins db/db

4.2.1. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant microarrays de DNA

4.2.2. Anàlisi de l'expressió gènica per RT-qPCR

4.2.3. Identificació de potencials reguladors transcripcionals dels programes gènics alterats en la CDM

## 4.3. Estudi dels efectes de la sobreexpressió del receptor nuclear ERRγ en cardiomiòcits en cultiu.

4.3.1 Optimització de la transducció amb vectors adenovirals de cardiomiòcits en cultiu HL-1

4.3.2. Anàlisi de la sobreexpressió d'ERRγ en cardiomiòcits HL-1

## 4.4. Estudi dels efectes de la sobreexpressió cardíaca d'ERRg in vivo.

4.4.1. Generació d'un model de ratolí transgènic de sobreexpressió d'ERRγ específica a cor

4.4.2. Anàlisi de la funció cardíaca en animals transgènics Tg-hERRγ.

4.4.3. Anàlisi de la supervivència en animals transgènics que sobreexpressen hERRγ a cor.

4.4.4. Anàlisi de l'expressió gènica en cor d'animals transgènics Tg-hERRγ

4.4.5. Anàlisi histològic dels cors en animals de la línia transgènica L2 que sobreexpressen hERRγ

## 5. Discussió

5.1 Els ratolins db/db com a model per a l'estudi de la cardiomiopatia diabètica

5.2 Alteracions metabòliques en la cardiomiopatia diabètica

5.3 ERRγ com a possible mediador de les alteracions en l'expressió gènica observada en la cardiomiopatia diabètica

## 6. Conclusions

## 7. Referències



## Abreviacions

<b>A</b>	<b><math>\alpha</math>-MHC</b>	$\alpha$ -miosina cardíaca
	<b>ACAA2</b>	acetyl-CoA acyltransferase 2
	<b>ACADL</b>	acyl-CoA dehydrogenase, long chain (LCAD)
	<b>ACADM</b>	acyl-CoA dehydrogenase, C-4 To C-12 straight chain (MCAD)
	<b>ACADVL</b>	acyl-CoA dehydrogenase, very long-chain (VLCAD)
	<b>ACLS1</b>	long-chain acyl-CoA synthetase 1
	<b>ACO2</b>	aconitase 2
	<b>ACOT1</b>	acyl-CoA thioesterase 1
	<b>ACOX</b>	peroxisomal Acyl-CoA oxidase
	<b>ACSM5</b>	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5
	<b>ACTA1</b>	actin, alpha 1, skeletal muscle
	<b>AGE</b>	advanced glycation end-products
	<b>AGPAT3</b>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3
	<b>ANF</b>	natriuretic peptide A (Nppa)
	<b>ANGPTL4</b>	angiopoietin-like 4
	<b>ATP5B</b>	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, beta
	<b>ATP5G3</b>	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex subunit C3 subunit 9
<b>B</b>	<b><math>\beta</math>-MHC</b>	$\beta$ -miosina cardíaca
	<b>BNP</b>	natriuretic peptide B (Nppb)
<b>C</b>	<b>CAT</b>	catalasa
	<b>CD36</b>	fatty acid translocase
	<b>ChIP</b>	immunoprecipitació de la cromatina
	<b>CITP</b>	carboxy-terminal telopeptide of collagen type I



	<b>CMD</b>	cardiomiopatia diabètica
	<b>COQ7</b>	coenzyme Q7
	<b>COX4I1</b>	cytochrome C oxidase subunit 4I1
	<b>COX6B2</b>	cytochrome C oxidase subunit 6B2
	<b>COX6C</b>	cytochrome C oxidase subunit 6C
	<b>COX8a</b>	cytochrome C oxidase subunit 8A
	<b>COX8B</b>	cytochrome C oxidase subunit 8B
	<b>CPT1A</b>	carnitine palmitoyltransferase 1A
	<b>CPT1B</b>	carnitine palmitoyltransferase 1B
	<b>CPT2</b>	carnitine palmitoyltransferase 2
	<b>CYCS</b>	cytochrome C, somàtic
<b>D</b>	<b>DBD</b>	DNA Binding Domain
	<b>DMI</b>	diabetis mellitus tipus 1
	<b>DMII</b>	diabetis mellitus tipus 2
	<b>DVEd</b>	diàmetre del ventricle esquerre a diàstole
	<b>DVEs</b>	diàmetre del ventricle esquerre a sístole
<b>E</b>	<b>ECH1</b>	enoyl-CoA hidratase 1
	<b>EHHADH</b>	enoyl-CoA, hidratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase
	<b>ER</b>	receptor d'estrògens
	<b>ERR</b>	estrogen-related receptor
	<b>ERRE</b>	ERR response element
<b>F</b>	<b>FABP3</b>	fatty acid binding protein 3
	<b>FAO</b>	fatty acid oxidation
	<b>FATP1</b>	fatty acid transport protein 1
	<b>FBP2</b>	fructose-biphosphatase 2
	<b>FE</b>	fracció d'ejecció
	<b>FS</b>	fracció d'escurçament

<b>G</b>	<b>GCK</b>	glucokinase
	<b>GLUT</b>	glucose transporter
	<b>GO</b>	gene ontology
<b>H</b>	<b>HADHA</b>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA
	<b>HMGCS2</b>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
	<b>HOMA-IR</b>	homeostatic model assessment for insulin resistance
	<b>HRP</b>	horseradish peroxidase
	<b>HSP</b>	heat shock proteins
<b>I</b>	<b>ICE</b>	interleukin converting enzyme
	<b>IDH3<math>\alpha</math></b>	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD(+)) alpha
	<b>IKK<math>\beta</math></b>	inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase
	<b>IL-6</b>	interleukin 6
	<b>IL1<math>\beta</math></b>	interleukin 1 beta
	<b>IL-18</b>	interleukin 18
	<b>IPA</b>	Ingenuity Pathway Analysis
	<b>IRS</b>	insulin receptor substrate
<b>J</b>	<b>JNK</b>	c-jun N-terminal kinase
<b>L</b>	<b>LBD</b>	ligand binding domain
	<b>LIPE</b>	hormone-sensitive lipase
	<b>LPL</b>	lipoprotein lipase
<b>M</b>	<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase

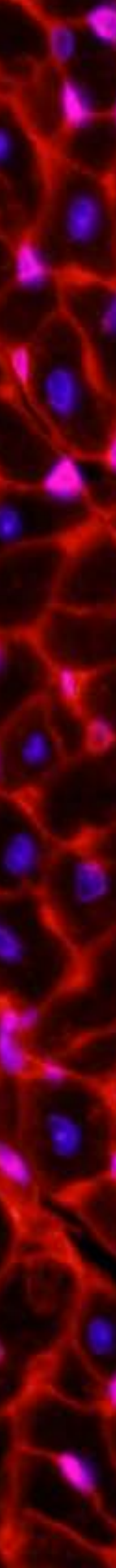
	<b>MFN2</b>	mitofusin 2
	<b>MMP</b>	matrix metalloproteinase)
	<b>MOI</b>	multiplicity of infection
	<b>MYH7</b>	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta
	<b>MYL3</b>	myosin light chain 3
	<b>MYL7</b>	myosin light chain 7
<b>N</b>	<b>NDUFA4</b>	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit A4
	<b>NDUFA8</b>	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit A8
	<b>NDUFS1</b>	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1
	<b>NDUFS4</b>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S4
	<b>NDUFS7</b>	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S7
	<b>NFkB</b>	nuclear factor kappa B
	<b>NR</b>	receptor nuclear
	<b>NRF2</b>	nuclear respiratory factor 2 subunit alpha (GABPA, GA binding protein transcription factor alpha subunit)
<b>O</b>	<b>OxPhos</b>	oxidative phosphorylation
<b>P</b>	<b>PDH</b>	piruvat deshidrogenasa
	<b>PECI</b>	enoyl-CoA delta isomerase 2
	<b>PEPCK</b>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2
	<b>PDK4</b>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
	<b>PFKFB2</b>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2
	<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
	<b>PGC-1<math>\beta</math></b>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta
	<b>PICP</b>	carboxy-terminal propeptide of type I procollagen

	<b>PKC</b>	protein kinase C
	<b>PLA2G12A</b>	phospholipase A2 group XIA
	<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
	<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	peroxisome proliferator activated receptor gamma
	<b>PVEd</b>	gruix de la paret del ventricle esquerre a diàstole
<b>R</b>	<b>RE</b>	element resposta
	<b>RIP140</b>	receptor interacting protein 140
	<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>S</b>	<b>SCD4</b>	stearoyl-CoA desaturase 4
	<b>SCN5A</b>	sodium voltage-gated channel alpha subunit 5
	<b>SDH</b>	succinate dehydrogenase complex flavoprotein
	<b>SEM</b>	error estàndard de la mitjana
	<b>SERCA2a</b>	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
	<b>SIVd</b>	gruix del septe interventricular a diàstole
	<b>SOD2</b>	superoxide dismutase 2
<b>T</b>	<b>TAB</b>	teixit adipós blanc
	<b>TAM</b>	teixit adipós marró
	<b>TCA</b>	cicle dels àcids tricarboxílics
	<b>TFAM</b>	transcription factor A, mitochondrial
	<b>TFB2M</b>	transcription factor B2, mitochondrial
	<b>TGF<math>\beta</math></b>	transforming growth factor beta
	<b>TIMP</b>	tissue inhibitor of metalloproteinase
	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor-alpha
	<b>TLR4</b>	toll-like receptor 4
	<b>TPM4</b>	tropomyosin 4
	<b>TTN</b>	titin

<b>U</b>	<b>UCP</b>	uncoupling protein
<b>W</b>	<b>WT</b>	wild type
<b>X</b>	<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosid
<b>Z</b>	<b>ZDF</b>	zucker diabetic fatty

# Introducció

---





## 1. Introducció

### 1.1. Diabetis Mellitus

La diabetis mellitus és una malaltia crònica àmpliament estesa arreu del món, amb una incidència de proporcions epidèmiques que afecta a més de 380 milions de persones, el que representa un 8,3% de la població mundial segons dades de la Federació Internacional de Diabetis (IDF, 2011). A Europa, aproximadament uns 52 milions de persones són diabètiques (7,9%) (Figura 1.1). En el cas d'Espanya, la prevalença de la diabetis augmenta fins a més del 12%, el que representa uns 4 milions de persones afectades (Soriguer et al., 2012). Al 2014 es van produir en tot el món 4,9 milions de morts derivades de la diabetis i s'estima que d'aquí a 20 anys, al 2035, el nombre de persones afectades per la malaltia s'incrementarà fins a més de 590 milions (IDF, 2011). Per tant, tenint en compte aquestes dades, la diabetis constitueix un problema sanitari a nivell mundial de primera magnitud.

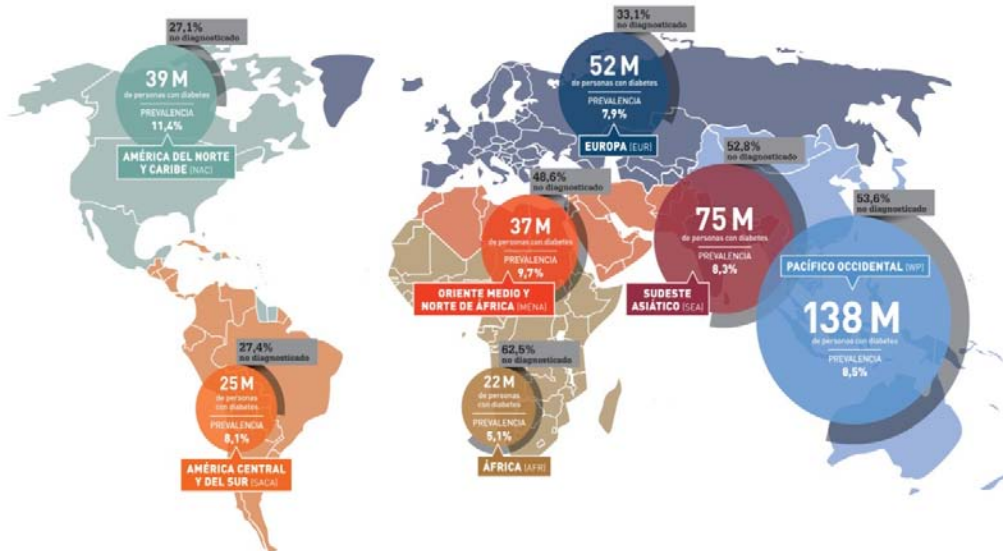


Figura 1.1. Mapa il·lustratiu de l'afectació de persones amb diabetis al món l'any 2012 (IDF, 2011).

La diabetis és un desordre metabòlic complex que esdevé quan el pàncrees és incapaç de produir insulina o quan els teixits no responen correctament a la insulina produïda. La insulina és una hormona peptídica que es produeix a les cèl·lules beta dels illots pancreàtics i que permet que la glucosa de la sang pugui ser captada i metabolitzada per les cèl·lules. Per tant, l'absència d'insulina o una resposta incorrecte per part dels teixits diana a aquesta hormona es tradueix en un augment dels nivells de glucosa en sang, el que es coneix com



## Introducció

hiperglucèmia. La concentració normal de glucosa en plasma és de 5,6-7 mmol/L, mentre que valors superiors a 7 mmol/L en dejú es consideren hiperglucèmia i defineixen l'estat diabètic.

La diabetis es pot classificar en dos tipus principals: la diabetis tipus 1 i la diabetis tipus 2. La **diabetis de tipus 1 (DMI)** es desenvolupa normalment a edats primerenques, durant la infància i l'adolescència, degut a un desordre autoimmune, sovint d'origen genètic, que destrueix de manera irreversible les cèl·lules beta pancreàtiques, donant lloc a una total deficiència d'insulina. La DMI representa gairebé el 10% dels casos de diabetis i es coneix també amb el nom de diabetis juvenil o diabetis dependent d'insulina, ja que els pacients requereixen injeccions d'insulina per controlar els nivells de glucosa i poder sobreviure (Taula1.1).

Diabetis de tipus 1	Diabetis de tipus 2
Es dona en individus joves	Es dona en edat adulta
Els símptomes tenen lloc en estadis primerencs (cetoacidosi)	No presenta símptomes evidents en les primeres etapes
No associada a obesitat	Associada a obesitat
Deficiència total de insulina	La secreció de insulina pot ser normal o no, però les cèl·lules són resistents a la insulina
Es pot controlar amb injeccions de insulina, dieta i exercici	Es pot controlar amb medicació oral o injeccions de insulina, dieta i exercici

Taula1.1. Principals característiques distintives de la diabetis tipus 1 (DMI) i tipus 2 (DMII).

La **diabetis de tipus 2 (DMII)** es dona generalment en adults, i està freqüentment associada a l'obesitat o al procés d'envelliment. Més del 90% dels casos de diabetis corresponen a DMII, un percentatge que continua creixent degut a l'estil de vida actual que destaca per canvis en la dieta i una disminució en l'activitat física, els quals constitueixen els principals factors de risc ambiental per desenvolupar la malaltia. Juntament amb els factors de risc ambientals com el sobrepès, una dieta poc saludable, la inactivitat física o l'edat, existeixen també factors genètics que predisposen la DMII (per exemple gens que regulen l'activitat pancreàtica o la funció adequada de la insulina). En el cas de la DMII, la hiperglucèmia que la caracteritza és fonamentalment el resultat de la resistència a la insulina dels teixits, en els que les cèl·lules no responen adequadament als nivells normals d'insulina. La DMII sol caracteritzar-se, principalment en les seves etapes primerenques, per una hiperinsulinèmia

(elevats nivells d'insulina en sang), el que representa un intent del pàncrees de compensar la resistència a la insulina dels teixits diana i mantenir la normoglicèmia. Tot i així, a mesura que la malaltia va progressant, les cèl·lules beta no poden fer front a la demanda d'insulina requerida per a superar la resistència a la insulina i mantenir els nivells de glucosa, el que finalment desemboca irreversiblement en hiperglicèmia. En les etapes més avançades de la malaltia, les cèl·lules beta pràcticament ja no produeixen insulina i el pacient es veu obligat a seguir teràpies basades en la suplementació amb insulina (Taula 1.1).

Tal i com s'ha esmentat en el paràgraf anterior, la resistència a insulina es defineix com la incapacitat de respondre a la insulina per part dels teixits diana (principalment fetge, múscul esquelètic i teixit adipós blanc). Donat que la resistència a la insulina sol precedir la DMII en pacients normoglicèmics amb risc de desenvolupar diabetis, bé sigui degut a antecedents familiars o a estils de vida poc saludables, la resistència a la insulina es considera com el factor etiopatogènic clau en el desenvolupament de la DMII. Són diversos els mecanismes identificats que contribueixen al desenvolupament de la resistència a la insulina; aquests inclouen lipotoxicitat, disfunció mitocondrial, inflamació, i estrès del reticle endoplasmàtic (Zamora and Villena, 2014) (Figura 1.2).

L'augment en la captació d'àcids grassos per part dels teixits diana de la insulina com a conseqüència de l'excés de lípids circulants provinents de la dieta o del teixit adipós, degut a la incapacitat de la insulina d'inhibir de manera efectiva la lipòlisi, afavoreix l'acumulació intracel·lular d'intermediaris lipídics com els diacilglicerols o les ceramides. S'ha demostrat que aquests intermediaris lipídics bloquegen la via de senyalització de la insulina activant noves isoformes de la PKC (*protein kinase C*), com PKC $\delta$ , PKC $\theta$  o PKC $\zeta$ , les quals fosforilen els substrats del receptor de la insulina (IRS) en residus serina tot inhibint la transducció de senyal (Yu et al., 2002a), un procés que es coneix com a lipotoxicitat. Diversos estudis han proposat també que la disfunció mitocondrial podria contribuir a la resistència a la insulina tot afavorint l'acumulació intracel·lular de lípids degut a la incapacitat de la cèl·lula d'oxidar-los eficientment (Lowell and Shulman, 2005). La inflamació crònica que sovint acompanya als pacients obesos també juga un paper important en el desenvolupament de la resistència a insulina. Els elevats nivells circulants de citoquines proinflamatòries com TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*), IL1 $\beta$  (*interleukin 1 beta*) i IL-6 (*interleukin 6*) donen lloc a l'activació de diverses serina/treonina proteïna cinases, com JNK (*c-jun N-terminal kinase*) i IKK $\beta$  (*inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase*), les quals actuen també a nivell dels IRS inhibint la via de senyalització de la insulina (Zick, 2003). Els àcids grassos també poden activar directament la via inflamatòria de JNK a través de la unió als *Toll-like receptors 4* (TLR4) (Shi et al., 2006), establint una relació sinèrgica entre lipotoxicitat i inflamació. Més recentment, l'estrès del reticle endoplasmàtic s'ha proposat també com a un mecanisme inductor de resistència a insulina que, de manera semblant a les citoquines inflamatòries, resulta en l'activació de JNK i IKK, i la conseqüent inhibició de la via de senyalització de la insulina a nivells dels IRS (Ozcan

## Introducció

et al., 2004). És interessant destacar que els àcids grassos intracel·lulars també poden produir estrès del reticle endoplasmàtic (Wang et al., 2006).

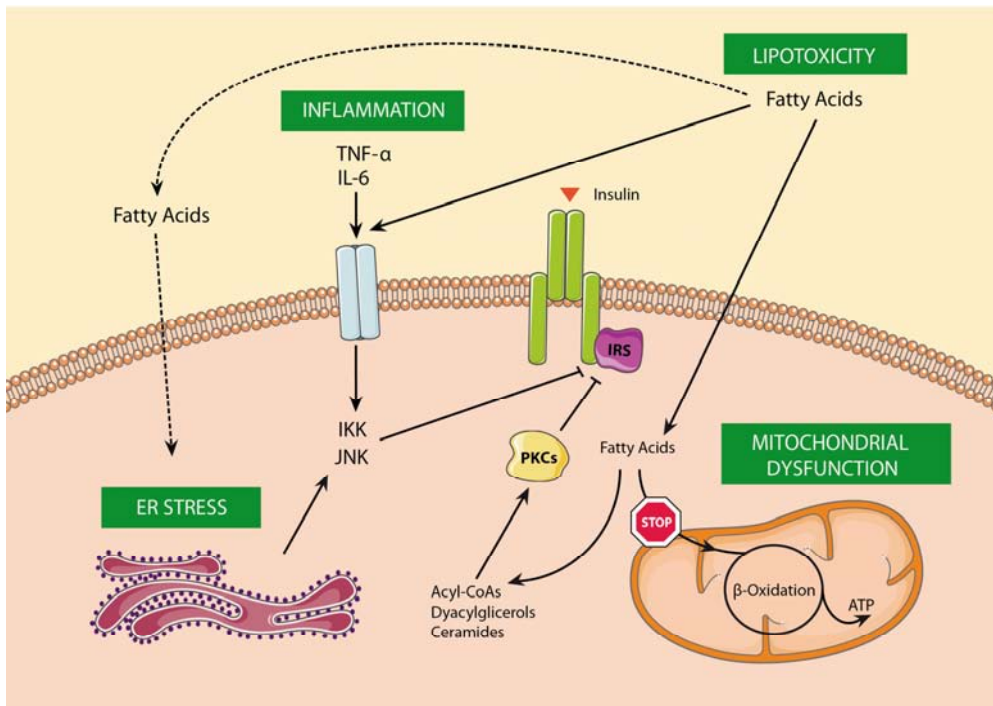


Figura 1.2. Principals mecanismes cel·lulars implicats en la patogènesi de la resistència a insulina (Zamora and Villena, 2014).

La diabetis, independentment de si es tracta de DMI o DMII, està associada a diferents complicacions que inclouen patologies cardiovasculars, neurològiques i renals, i que són les últimes responsables de l'elevada morbiditat i mortalitat present entre la població diabètica (Figura 1.3). Una complicació que sovint acompanya a la diabetis és la **retinopatia diabètica**, causada per danys en la retina que donen lloc a una progressiva pèrdua de visió i que, fins i tot, pot acabar en ceguesa. De fet, la retinopatia diabètica és la principal causa de ceguesa en adults (Fong et al., 2004). La **nefropatia diabètica** és una altra complicació molt comú derivada de la diabetis. En aquest cas, el ronyó és l'òrgan afectat, podent arribar a produir-se fallada renal (Alsaad and Herzenberg, 2007). La nefropatia diabètica afecta entre el 30% i el 40% de la població diabètica i roman la causa més comú de fallada renal entre la població general. La **neuropatia perifèrica**, que afecta als nervis, també és bastant habitual i pot provocar impotència en homes així com pèrdua de la sensibilitat, particularment en les extremitats inferiors. La disfunció del sistema nerviós perifèric, juntament amb els

problemes vasculars derivats de la diabetis afavoreixen la ulceració dels teixits, arribant a ser la principal causa d'amputacions no traumàtiques en la població (Callaghan et al., 2012). La diabetis també s'ha associat a diversos **problemes cardiovasculars** que contribueixen de manera important a la major mortalitat entre la població diabètica. Per exemple, la diabetis està associada amb hipertensió, i els pacients diabètics són també més propensos a desenvolupar aterosclerosi (Fang et al., 2004). A més, la diabetis és un reconegut factor de risc per fallada cardíaca, independentment de l'edat, l'obesitat, la hipercolesterolèmia, la hipertensió i l'aterosclerosi (Rayden et al., 2007).

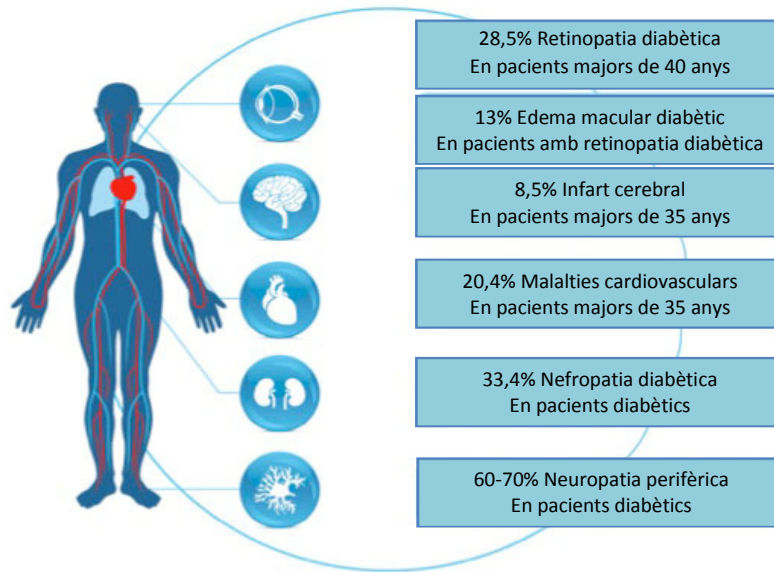


Figura 1.3. Prevalença de les principals comorbilitats associades a la diabetis (adaptat de [www.luncentis.com](http://www.luncentis.com)).

## 1.2. Cardiomiopatia diabètica

### 1.2.1. Definició i prevalença de la cardiomiopatia diabètica

Tal i com s'ha mencionat en el paràgraf anterior, existeix una forta associació entre la diabetis i la disfunció cardíaca, sovint però associada a la presència d'hipertensió i/o aterosclerosi. Tot i això, certs pacients diabètics presenten una disfunció del ventricle esquerre en absència d'elevada pressió arterial o malaltia coronària arterial, una condició patològica que es defineix com a **cardiomiopatia diabètica (CMD)**. La cardiomiopatia

## Introducció

diabètica va ser descrita per primera vegada el 1972 per Rubler i col·laboradors (Rubler et al., 1972) en quatre pacients diabètics amb fallada cardíaca però que presentaven arteries coronàries normals i una hipertròfia del ventricle esquerre associada a fibrosi. L'evidència d'aquesta nova forma de cardiopatia va ser confirmada més tard en un estudi liderat per Regan en famílies amb diabetis i sense hipertensió, aterosclerosi o obesitat, en les que a més es va observar que els individus presentaven disfunció ventricular associada a un elevat contingut de lípids i col·lagen al miocardi (Regan et al., 1977).

Els diversos estudis epidemiològics portats a terme fins al moment mostren dades molt variables i inconsistentes en quant a la prevalença de la CMD entre la població diabètica. Per exemple, segons estudis basats en ecocardiografia Doppler per valorar la funció diastòlica, aproximadament un 30% dels pacients diabètics presenten CMD (Di Bonito et al., 1996; Nicolino et al., 1995). La prevalença de la malaltia en pacients diabètics pot arribar fins al 60% si s'afegeix la maniobra de Valsalva per a la valoració del flux mitral (Poirier et al., 2001), i fins a un 75% si a més s'utilitzen tècniques Doppler tissulars i mode M-Color (Boyer et al., 2004). És per això que la variabilitat en la prevalença de la CMD no és deguda només al caràcter subclínic que presenta la malaltia en els estadis primerencs, sinó també a l'ús de diferents tècniques a l'hora de valorar les funcions sistòlica i diastòlica, i al fet que els estudis s'han realitzat en mostres poblacionals d'origen diferent i en un nombre relativament baix de pacients.

### 1.2.2. Fisiopatologia de la cardiomiopatia diabètica en humans

Tot i que les causes que donen lloc a la DMI i la DMII són diferents, ambdós tipus de diabetis poden donar lloc a una cardiopatia d'ídèntiques característiques. Els pacients amb CMD, tant si pateixen DMI com DMII, presenten unes alteracions de la funció cardíaca similars (Miki et al., 2013). Aquesta es caracteritza per una disfunció diastòlica del ventricle esquerre, sovint acompanyada per una disminució en la fracció d'ejecció (FE) (Devereux et al., 2000), si bé hi ha estudis que mostren una fracció d'ejecció normal (Shivalkar et al., 2006). La funció sistòlica del ventricle esquerre també pot estar alterada, encara que la seva incidència és menor que la de la disfunció diastòlica o es presenta en etapes més avançades (Fang et al., 2005). De totes maneres, molts d'aquests individus que tenen una funció sistòlica del ventricle esquerre normal en repòs poden presentar anormalitats durant l'exercici o situacions d'estrès cardiovascular.

El cor dels pacients amb CMD també es caracteritza per unes dimensions i una estructura anòmales. La remodelació concèntrica, que ve definida com un increment en el gruix de la paret del ventricle amb un índex normal de la massa del ventricle esquerre, i la hipertròfia del ventricle esquerre, definida com un valor anormal del índex de massa del ventricle

esquerre, són les alteracions morfològiques més freqüents relacionades amb la diabetis. L'augment del gruix de la paret i la massa del ventricle esquerre s'ha associat amb una disminució de la fracció d'escurçament (FS) i tenen un mal pronòstic (Devereux et al., 2000). La hipertròfia cardíaca observada en la CMD, així com en altres patologies cardíques, es produeix com a mecanisme compensatori per tal de mantenir la funció cardíaca reduint l'estrès de la paret del cor, però tot i això resulta insuficient i que acaba donant lloc a fallada cardíaca (Hirayama et al., 2005). Almenys en humans, la hipertròfia dels cardiomiòcits és freqüent, però no un requisit indispensable de la cardiomiopatia diabètica, i de fet s'han trobat cardiomiòcits hipertròfics i atròfics barrejats en pacients amb cardiomiopatia diabètica. De fet, la diabetis provoca diferents nivells d'hipertròfia, atròfia i pèrdua de cardiomiòcits en el miocardi dependent de l'etapa i la duració de la malaltia (Miki et al., 2013).

A més, una de les característiques més importants observada al miocardi dels pacients diabètics amb CMD és la presència de fibrosi associada a la hipertròfia del ventricle esquerre (Kannel and McGee, 1979; Maisch et al., 2011; Nunoda et al., 1985). En fases avançades de la malaltia, hi ha una pèrdua progressiva de cardiomiòcits, els quals són reemplaçats per fibres de col·lagen i altres proteïnes de matriu extracel·lular. La presència de fibrosi, que pot ser perivascular o intersticial, és un factor de risc addicional per la fallada cardíaca.

### **1.2.3. Diagnosi de la cardiomiopatia diabètica**

La CMD apareix de forma asimptomàtica en les seves etapes inicials, el que dificulta la seva diagnosi. Actualment, la millor manera de diagnosticar la CMD és la detecció de canvis funcionals i estructurals en el ventricle esquerre, independents d'altres malalties cardiovasculars, essent la disfunció diastòlica del ventricle esquerre el signe de disfunció ventricular més primerenc induït per la diabetis.

L'ecocardiografia és la tècnica més utilitzada, i també la més practicada quan es combina amb altres tècniques com la imatge Doppler tissular, per identificar la disfunció ventricular en pacients diabètics. Les ecocardiografies ens permeten analitzar la funció diastòlica i sistòlica, això com detectar la presència d'hipertròfia cardíaca. A més, la fibrosi i la hipertròfia donen lloc a una rigidesa cardíaca que pot ser valorada de forma no invasiva per estudis del flux transmitral mitjançant tècniques Doppler (Boyer et al., 2004).

L'anàlisi de la funció cardíaca es pot fer també mitjançant altres tècniques com la ressonància magnètica, l'angiografia o la tomografia per emissió de positrons. La ressonància magnètica, juntament amb les imatges Doppler tissulars abans esmentades, és una de les tècniques més utilitzades actualment per detectar la CMD en els seus estadis més primerencs. Amb la ressonància magnètica i l'angiografia es poden detectar alteracions en els moviments de la paret cardíaca i en la fracció d'ejecció (Achenbach et al., 2001), mentre

## Introducció

que l'ús de la tomografia per emissió de positrons *in vivo* permet detectar una disminució en la reserva vascular cardíaca, així com la captació i la utilització d'àcids grassos al cor en pacients obesos amb resistència a la insulina (Yokoyama et al., 1997).

L'ús de determinats biomarcadors, com el BNP (*natriuretic peptide B*) o l'ANF (*natriuretic peptide A*) poden ser molt útils en el diagnòstic de la CMD, donat que la seva mesura en sang és un mètode poc invasiu i molt sensible (Lubien et al., 2002). Els pèptids natriurètics són hormones secretades pels cardiomiòcits que participen en la homeòstasi ventricular i són secretats en resposta a la distensió de la paret cardíaca. El BNP és un conegut marcador d'hipertrofia i del grau de disfunció ventricular, tant sistòlica com diastòlica, si bé no és un marcador específic de CMD ja que també es troba incrementat en altres malalties cardiovasculars com la malaltia coronària o la hipertrofia ventricular. Diversos estudis han demostrat que el BNP pot ser un marcador precoç en pacients amb disfunció ventricular asimptomàtica (Epshteyn et al., 2003; Nielsen et al., 2003). Malgrat això, existeix certa controvèrsia sobre la utilitat de la mesura dels pèptids natriurètics com a prova diagnòstica de la CMD, ja que altres estudis no han trobat una correlació entre els nivells de BNP i la presència subclínica de cardiomiopatia (Dahlstrom, 2004).

Com s'ha esmentat anteriorment, la fibrosi del miocardi és una de les principals conseqüències dels efectes adversos de la diabetis al cor. Biomarcadors de la síntesi del col·lagen com PICP (*carboxy-terminal propeptide of type I procollagen*), o de la seva degradació com C1P (*carboxy-terminal telopeptide of collagen type I*), així com marcadors de la remodelació de la matriu extracel·lular com MMP (*matrix metalloproteinase*) o TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) s'utilitzen sovint per detectar fibrosi (Lopez et al., 2010). La presència de fibrosi i d'hipertrofia també es pot estudiar mitjançant biòpsies, que a més ens poden donar informació sobre alteracions en la microvasculatura, però el seu caràcter altament invasiu ho fa desaconsellable.

### 1.2.4. Mecanismes patològics de la cardiomiopatia diabètica

El desenvolupament de la CMD és multifactorial i els mecanismes implicats encara no estan ben definits. Tot i així, els estudis realitzats, principalment en models animals de diabetis, per tal d'investigar els factors implicats en la patogènesi de la CMD han identificat diversos mecanismes potencials, entre els quals s'inclouen alteracions metabòliques, disfunció mitocondrial, lipotoxicitat, estrès oxidatiu, mort cel·lular i fibrosi, els quals contribueixen als canvis funcionals i estructurals característics de la malaltia (Figura 1.4).

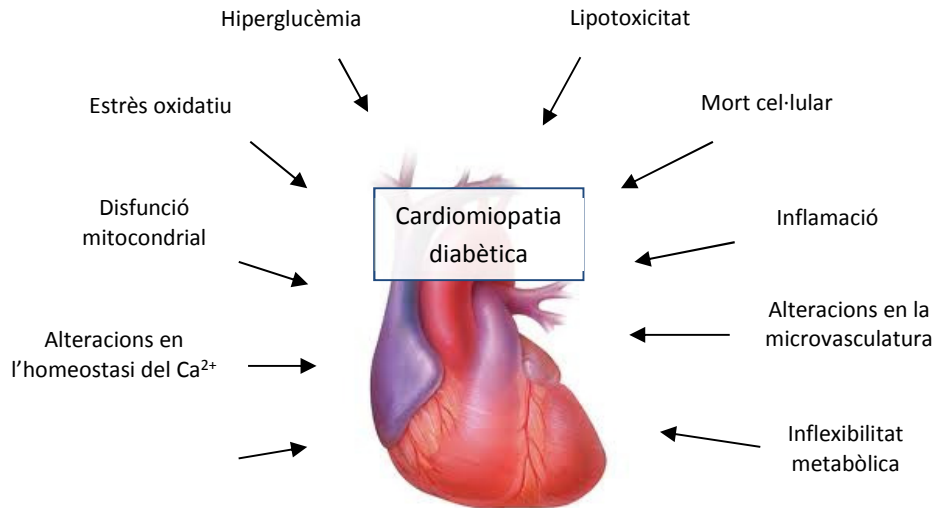


Figura 1.4. Factors patològics que implicats en l'etiopatogènesi de la cardiomiopatia diabètica (adaptat de Bugger et al., 2014).

A continuació es detallen els principals mecanismes que han estat descrits com a possibles factors desencadenants de la CMD o que contribueixen a la seva progressió.

#### 1.2.4.1. Hiperglucèmia i els productes avançats de glicació final

La hiperglucèmia que acompanya la diabetis és un dels principals inductors del dany cel·lular que pateixen els diversos teixits dels pacients diabètics, incloent-hi el teixit cardíac. Estudis *in vitro* i *in vivo* demostren que nivells elevats de glucosa donen lloc a mort cel·lular per apoptosi en cardiomiòcits de ratolí i afecten a la funció contràctil del cor (Cai et al., 2002; Frustaci et al., 2000). Donada la deficient senyalització en la via de la insulina, bé sigui degut a la manca de l'hormona en la DMI o degut a la resistència a l'acció de la insulina en el cas de la DMII, els cors d'individus diabètics presenten, tot i l'elevada disponibilitat de glucosa circulant, una disminució de la glucòlisi i de l'oxidació de la glucosa (Mokuda et al., 1990). La disminució en la metabolització de la glucosa és també el resultat de la disminució dels transportadors de glucosa GLUT1 (*glucose transporter type 1*) i GLUT4 (*glucose transporter type 4*), encara que una part pot ser captada per la cèl·lula mitjançant transportadors independents d'insulina (Garvey et al., 1993). La importància del metabolisme de la glucosa en la patogènesi de la CMD està recolzada per dades experimentals en ratolins diabètics en



## Introducció

els que la sobreexpressió de GLUT4 (Semeniuk et al., 2002) o GLUT1 (Luptak et al., 2005) és suficient per normalitzar el metabolisme i l'activitat contràctil del cor.

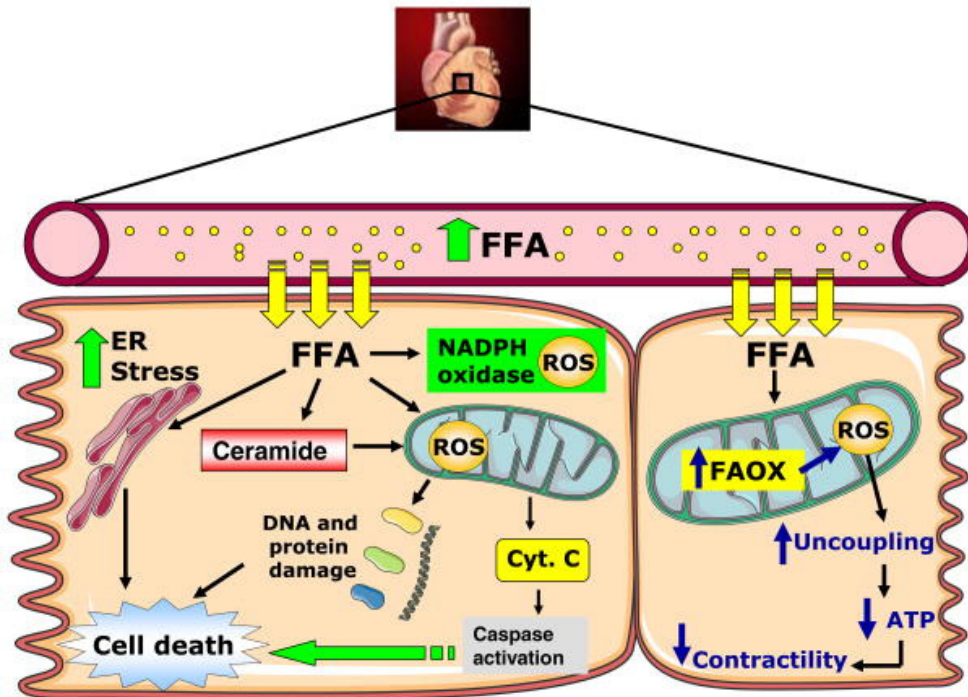
A més, una altra conseqüència dels alts nivells de glucosa circulant és la glucosilació, entre d'altres, de proteïnes estructurals com el col·lagen, el que acaba afectant la flexibilitat del miocardi i provocant disfunció contràctil (Avendano et al., 1999). Aquestes proteïnes glucosilades, anomenades AGE (*advanced glycation end-products*) o productes avançats de glicació final, poden activar diverses vies de senyalització a través de la seva interacció amb receptors d'AGE, l'expressió dels quals està incrementada en els cors d'individus diabètics (Aragno et al., 2006). L'acció dels AGE, per exemple, porta a l'activació de la via de NFκB (*nuclear factor kappa B*), la qual, a part d'induir la producció de citokines inflamatòries, també és parcialment responsable de l'increment anòmal en l'expressió de la cadena pesada de la β-miosina (β-MHC) en els cors diabètics (Aragno et al., 2006), la qual afecta negativament a la funció contràctil del cor.

### 1.2.4.2. Lipotoxicitat

La diabetis, l'obesitat i la resistència a la insulina estan freqüentment associades a un increment de lípids al miocardi (Wende et al., 2010). Efectivament, en un estudi realitzat per Sharma i col·laboradors, la tinció de seccions de cors amb *Oil Red O*, un colorant específic per a lípids neutres, va revelar un notable increment en el dipòsit de triglicèrids en el miocardi de pacients diabètics en estreta associació a una disfunció contràctil (Sharma et al., 2004). Altres estudis han obtingut resultats similars. Per exemple, estudis amb individus diabètics sense hipertensió ni obesitat demostren que aquests presenten concentracions de triglicèrids i colesterol al ventricle esquerre superiors als trobats en individus sans (Regan et al., 1977). De manera semblant, rates diabètiques presenten una major acumulació de lípids al cor (Sharma et al., 2004).

L'esteatosi cardíaca observada en pacients diabètics és, al menys en part, conseqüència d'un increment en la captació i magatzematge d'àcids grassos en forma de triglicèrids al miocardi. Tot i això, les evidències experimentals indiquen que els efectes tòxics sobre les cèl·lules cardíques no són deguts a l'acumulació de triglicèrids *per se*, si no a l'acumulació de certs intermediaris lipídics com ara ceramides, àcids grassos lliures o diacilglicerols. Aquestes espècies lipídiques contribueixen a la CMD mitjançant la producció d'espècies reactives de l'oxigen o ROS (*reactive oxygen species*), i provocant estrès del reticle endoplasmàtic, els quals poden produir mort cel·lular, desacoblament mitocondrial i una reducció en l'eficiència cardíaca, donant lloc a una disfunció contràctil (Borradaile et al., 2006; Goldberg et al., 2012; Listenberger et al., 2001) (Figura 1.5). A més, l'activació de l'apoptosi en cardiomiòcits com

a conseqüència de concentracions altes d'àcid palmític contribueix a la disfunció cardíaca de la CMD (Ying et al., 2015).



**Figura 1.5. Mecanismes induïts pels àcids grassos que contribueixen a la disfunció cardíaca en diabetis.** L'increment en la captació d'àcids grassos provoca disfunció en cardiomiòcits mitjançant diferents mecanismes que inclouen la producció de ROS i l'estrès del reticle endoplasmàtic, els quals contribueixen a incrementar la mort cel·lular. La producció de ROS derivada dels àcids grassos també dona lloc al desacoblament mitocondrial, reduint la producció d'ATP i l'eficiència cardíaca (Boudina and Abel, 2010).

L'ús de diversos models animals modificats genèticament han aportat les evidències experimentals que recolzen el paper de la lipotoxicitat com a un dels factors implicats en l'etiopatogènesi de la CMD. Per exemple, la sobreexpressió a cor de LPL (*lipoprotein lipase*) promou l'acumulació de lípids al cor de ratolins, els quals desenvolupen cardiomiopatia (Yagy et al., 2003). De manera similar, la sobreexpressió en cardiomiòcits de l'enzim ACLS1 (*long-chain acyl-CoA synthetase 1*) és suficient per induir esteatosi cardíaca i disfunció contràctil (Chiu et al., 2001). També la sobreexpressió a cor de FATP1 (*fatty acid transport protein 1*), el transportador d'àcids grassos del sarcolemma, incrementa la captació d'àcids grassos i la seva oxidació intracel·lular, però els ratolins transgènics que sobreexpressen aquesta proteïna presenten signes evidents de disfunció diastòlica (Chiu et al., 2005).

### 1.2.4.3. Estrès oxidatiu

Estudis en models animals i en humans han descrit que la producció de ROS es troba incrementada en els cors d'individus amb CMD (Anderson et al., 2009; Barouch et al., 2003). Les ROS són molècules molt reactives i que inclouen ions d'oxigen, radicals lliures i peròxids. La major part d'aquestes ROS que es generen a les cèl·lules prové de les mitocondries. Les ROS poden danyar directament les proteïnes, els fosfolípids i el DNA, i si els seus nivells s'incrementen de manera descontrolada poden alterar greument la funció i la viabilitat cel·lular, que és el que es coneix com estrès oxidatiu. Per aquest motiu, les cèl·lules disposen de mecanismes de defensa, que inclouen els enzims superòxid dismutasa, glutatió peroxidasa i catalasa entre d'altres, els quals actuen disminuint els nivells de ROS a la cèl·lula (Andreyev et al., 2005). Tant l'augment en la producció de ROS com el mal funcionament de les defenses antioxidants contribueixen en l'estrès oxidatiu en cors diabètics, i els sistemes de captació de ROS han demostrat ser eficaços en reduir la disfunció cardíaca en diabetis. Contràriament, s'ha vist que la disminució dels nivells de ROS mitjançant la potenciació dels diferents mecanismes antioxidants millora la funció cardíaca en models animals de CMD. Per exemple, la sobreexpressió de superòxid dismutasa en models animals normalitza la morfologia i la funció contràctil del cor diabètic (Shen et al., 2006), igual que succeeix amb la sobreexpressió de la glutatió peroxidasa (Matsushima et al., 2006) o de la catalasa (Ye et al., 2004). A més, també s'ha vist que la sobreexpressió en animals diabètics de metal·lotioneïna, una altra proteïna amb funció antioxidant, redueix la mort cel·lular a cor mitjançant la disminució de l'estrès oxidatiu i millora la funció cardíaca (Cai et al., 2006; Liang et al., 2002).

### 1.2.4.4. Disfunció mitocondrial

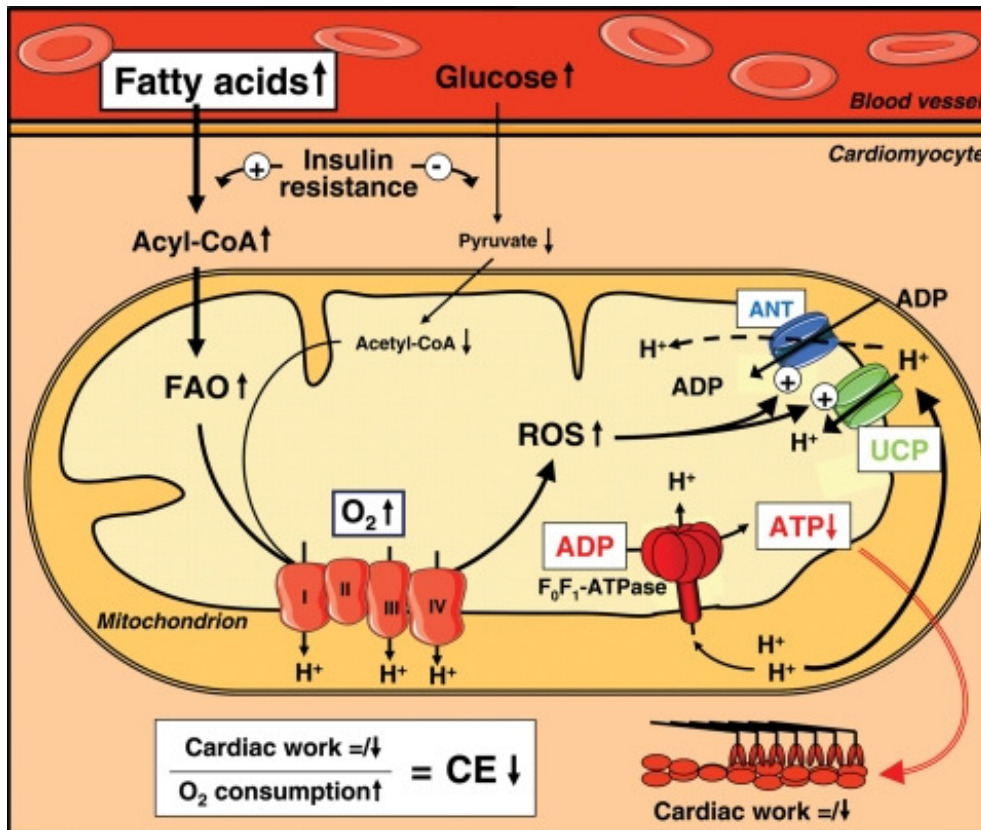
Diversos estudis suggereixen que la disfunció mitocondrial podria jugar un paper important en el desenvolupament de la cardiomiopatia diabètica. En humans, els estudis pioners de Regan i col·laboradors van descriure un incrementen el nombre de mitocondris en el miocardi de pacients diabètics (Regan et al., 1977). Altres estudis han demostrat també, mitjançant l'ús de tècniques d'espectrometria de ressonància magnètica nuclear, que els cors de pacients diabètics sense malaltia arterial coronària presenten una disminució dels ràtiosfosfocreatina/ATP (PCr/ATP), el que indica una disminució de la capacitat energètica mitocondrial (Diamant et al., 2003; Metzler et al., 2002; Scheuermann-Freestone et al., 2003). Aquesta reducció en la funció dels mitocondris en pacients diabètics està associada a una major producció de ROS (Hassouna et al., 2006). Així doncs, alteracions en la funció mitocondrial contribuirien a la disfunció cardíaca present en individus amb CMD, en part afavorint l'estrès oxidatiu.

Donada la dificultat d'obtenir mostres humanes, la majoria d'estudis sobre el paper de la funció mitocondrial en el desenvolupament de CMD provenen d'estudis en models animals, tant de DMI com DMII. En general, la majoria d'aquests models coincideixen en demostrar que els mitocondris dels individus amb CMD són menys eficients a l'hora de produir ATP degut a una disminució de la seva capacitat respiratòria juntament amb un major grau de desacoblament. El **desacoblament mitocondrial** que es produeix al cor diabètic es degut a la activació de les proteïnes desacoblants UCP (*uncoupling proteins*) (Boudina et al., 2005; Boudina et al., 2007). Aquestes proteïnes, més concretament UCP2 i UCP3, localitzades a la membrana mitocondrial interna, s'encarreguen de dissipar el gradient de protons generat per la cadena respiratòria entre la matriu mitocondrial i l'espai intermembrana, independentment de que hi hagi o no canvis en els seus nivells d'expressió (Boudina et al., 2007). L'oxidació de substrats dóna lloc a productes més reduïts que envien electrons a la cadena de transport d'electrons. L'energia associada al transport d'electrons a través dels diferents complexos de la cadena respiratòria s'utilitza per crear un gradient de protons ( $H^+$ ) entre la matriu mitocondrial i l'espai intermembrana. Aquests ions tornen a la matriu mitjançant l'enzim ATP sintasa (complex V mitocondrial) que utilitza l'energia associada al transport de protons per produir ATP. Les UCP fan possible que aquests protons evitin l'ATP sintasa, de manera que hi ha consum d'oxigen sense producció d'ATP (Figura 1.6). Per tant, el desacoblament mitocondrial es tradueix en una menor capacitat de síntesi d'ATP, el qual és essencial per a la contracció de les cèl·lules cardíaques. L'increment en el metabolisme dels àcids grassos que es produeix en el cor diabètic (descriu en l'apartat 1.2.4.2) està associat amb un increment de l'expressió de proteïnes desacoblants i amb una reducció de l'eficiència cardíaca (Boehm et al., 2001; Murray et al., 2005). De fet, s'ha observat que els àcids grassos poden induir desacoblament mitjançant la inducció de l'expressió d'UCP3 per part de PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) (Murray et al., 2005).

A més de l'increment en l'expressió de les UCP, en alguns models de diabetis també s'ha observat una disminució en l'expressió de proteïnes implicades en la fosforilació oxidativa i en la síntesi d'ATP (Boudina et al., 2005; Kanazawa et al., 2002; Nishio et al., 2004; Turko and Murad, 2003). Aquesta disminució en l'expressió dels components de la cadena respiratòria i el sistema de fosforilació oxidativa es tradueix en una disminució en la capacitat oxidativa d'aquests orgànuls i una disminució del ràtio ATP/consum d'oxigen (Kuo et al., 1983; Pierce and Dhalla, 1985; Tanaka et al., 1992). Es a dir, els mitocondris dels individus diabètics són menys eficients que els dels individus sans. Aquesta limitació en la capacitat oxidativa dels mitocondris, juntament amb l'elevada captació d'àcids grassos com a substrat per a la  $\beta$ -oxidació mitocondrial que es tradueix en uns elevats nivells de poder reductor disponible per a ésser oxidat per la cadena respiratòria, pot donar lloc a una sobreproducció de ROS,

## Introducció

el qual danya les proteïnes i la membrana mitocondrial, i a la vegada incrementa la ineficiència energètica dels mitocondris.



**Figura 1.6 -Disfunció mitocondrial en l'etiologia de la cardiomiopatia diabètica.** Un excessiu increment en la captació i oxidació d'àcids grassos als cardiomiòcits pot donar lloc a un increment de ROS si la mitocondria no pot fer front a l'excés de poder reductor produït degut a un dèficit en els components de la cadena respiratòria del sistema de fosforilació oxidativa. L'increment de ROS activa proteïnes desacoblants (UCP) com a mecanisme de defensa per disminuir la seva producció. Com a conseqüència la mitocondria funciona de manera menys eficient, incrementant el consum d'oxigen sense que hi hagi un increment proporcional en la síntesi d'ATP, el que es tradueix en una reducció de la reserva d'energia i la conseqüent disfunció contràctil (Bugger and Abel, 2010).

En diferents models de DMI i DMII, però no pas en tots, a més dels canvis en l'expressió de proteïnes mitocondrials i la disminució en la capacitat respiratòria, també s'han observat canvis en la morfologia dels mitocondris. Paradoxalment, en alguns casos, aquesta disminució de la funció mitocondrial està associada a un increment de la biogènesi mitocondrial. Més concretament, el que s'ha observat en aquests estudis és un augment del

nombre de mitocondris i en l'àrea d'aquests, tal i com indiquen els anàlisis morfològics, això com un increment en el nombre de molècules de DNA mitocondrial, però sense que aquest suposi una millora de la funció mitocondrial (Boudina et al., 2005; Shen et al., 2004). Aquest increment de la biogènesi mitocondrial s'interpreta com a un intent per part de la cèl·lula cardíaca de compensar el dèficit en la producció d'ATP mitjançant un augment de la maquinària necessària per a produir-ne més.

#### 1.2.4.5. Fibrosi

La cardiomiopatia diabètica, en els seus estadis més avançats, es caracteritza també per presentar fibrosi intersticial i perivascular. En humans, Regan i col·laboradors van ser els primers que van detectar la presència de dipòsits de col·lagen al voltant dels vasos sanguinis intramurals i entre les miofibres cardíques (Regan et al., 1977). Altres estudis han corroborat la presència de dipòsits de col·lagen tipus III en biòpsies d'endomiocardi de pacients amb DMII (Shimizu et al., 1993). De manera semblant, alguns models animals amb DMII presenten també un increment de la fibrosi cardíaca, en alguns casos fins i tot abans de l'aparició de la hiperglucèmica, el que suggereix un paper rellevant de la fibrosi en la patogènesi de la CMD (Mizushige et al., 2000; Way et al., 2002). Els mecanismes responsables de l'augment de la fibrosi cardíaca en pacients diabètics són poc coneguts, però diversos estudis apunten a la via de senyalització del TGF $\beta$  (*transforming growth factor beta*) com a un dels principals inductors. Així, s'ha observat que el receptor II del TGF $\beta$  està augmentat en el miocardi d'individus diabètics (Ban and Twigg, 2008).

Tal i com s'ha esmentat en apartats anteriors, els AGE també tenen un paper rellevant en el desenvolupament de fibrosi cardíaca en pacients diabètics. Una de les conseqüències dels alts nivells de glucosa circulant és la formació de AGE, els quals alteren les proteïnes estructurals y produeixen canvis en la matriu de col·lagen que afecten a la flexibilitat del miocardi. Els AGE causen entrellaçaments entre les molècules de col·lagen, impeding que aquestes siguin degradades eficientment i afavorint-ne la seva acumulació. A més, la reducció en l'expressió de les metal·loproteïnases observada en pacients diabètics pot alterar la degradació de la matriu extracel·lular, contribuint també al increment en el contingut de teixit connectiu al cor diabètic (Westermann et al., 2007a).

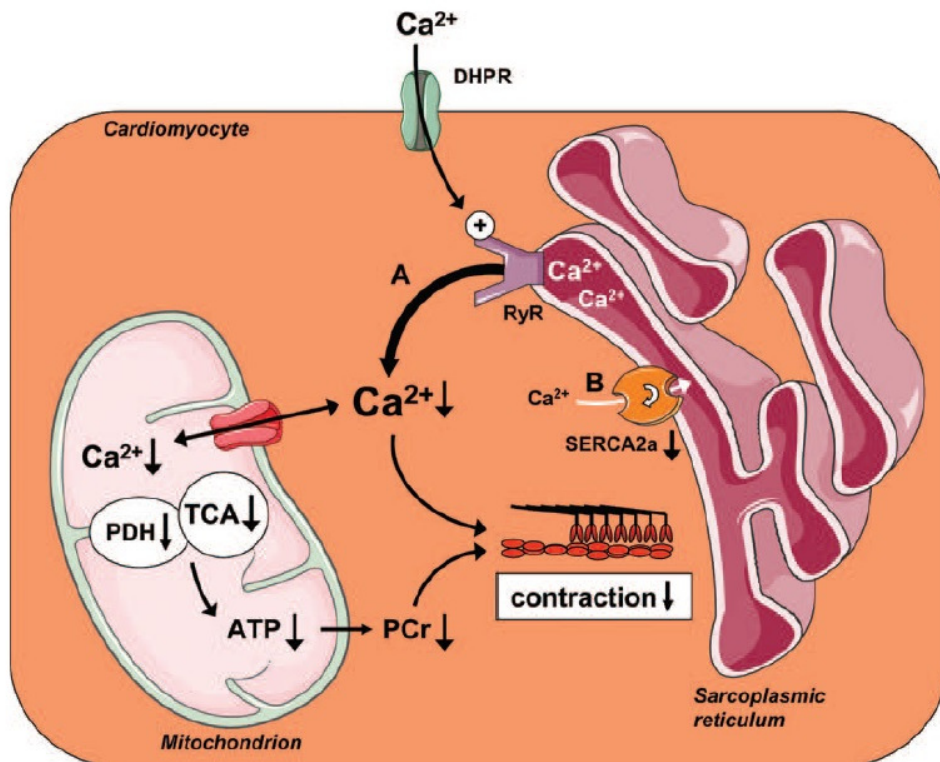
A mesura que la diabetis progressa i s'incrementa la mort cel·lular (i més concretament la necrosi), s'ha vist que la fibrosi augmenta per ocupar el lloc en substitució de les cèl·lules que desapareixen en els cors diabètics, ja que la necrosi comporta un augment en l'espai extracel·lular que hi ha entre els cardiomiòcits, i es produeix un increment en el dipòsit de col·lagen en aquestes zones. La desaparició dels cardiomiòcits juntament amb la fibrosi contribueixen de manera significativa a la disfunció contràctil del cor.



## Introducció

### 1.2.4.6. Alteracions en la homeòstasi del calci

El gradient de protons generat a la cadena respiratòria juga un paper clau en l'acumulació de  $\text{Ca}^{2+}$  en el mitocondri, i aquest esdevé important en el metabolisme energètic i la contracció cardíaca. En els cardiomiòcits, els ions  $\text{Ca}^{2+}$  s'alliberen al citosol, on s'uneixen a la proteïna contràctil troponina donant lloc a la interacció actina-miosina provocant el moviment dels filaments. Els ions  $\text{Ca}^{2+}$  es tornen a transportar al reticle sarcoplàsmic mitjançant la bomba SERCA2a (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2*), l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sarcoplàsmic o l'ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplàsmica. Com a resultat es produeix la contracció i l'estirament del múscul cardíac.



**Figura 1.7. Alteració en l'homeòstasi del calci en la CMD.** Una alteració tant en l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplàsmic al citosol (A), com en la recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  (B) pot alterar els nivells de calci al mitocondri durant la contracció, reduint la síntesi d'ATP. Tant els nivells reduïts de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol com la reducció en els nivells d'ATP contribueixen a la disfunció contràctil del cor (Bugger and Abel, 2010).

Alguns estudis suggereixen que la disminució en la contractilitat del cor que es dona en CMD és, en part, el resultat d'una alteració en el transport de  $\text{Ca}^{2+}$  als cardiomiòcits. Per exemple, en ratolins db/db amb DMII s'ha observat una disminució dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  i una reducció de les tasses de decaïment de  $\text{Ca}^{2+}$  així com de la càrrega de  $\text{Ca}^{2+}$  (Belke et al., 2004; Pereira et al., 2006). En ratolins ob/ob, obesos i amb una marcada resistència a la insulina, també s'ha observat una elevada concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  en repòs, així com uns decaïments de  $\text{Ca}^{2+}$  més prolongats, tot plegat associat a una disminució en l'activitat i expressió de SERCA2a o d'altres intercanviadors d'ions  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (Fauconnier et al., 2005; Li et al., 2006). Unes alteracions semblants s'ha observat també en models animals de DMI (Choi et al., 2002). En aquest sentit, s'ha observat que la sobreexpressió de SERCA2a en ratolins protegeix de la disfunció cardíaca en un model de DMI induïda per STZ, el que recolza la hipòtesi del paper important que l'homeòstasi del calci juga en la fallada cardíaca que caracteritza la CMD (Trost et al., 2002).

L'alteració en l'homeòstasi del calci no només afecta al procés de contracció cel·lular, sinó també al metabolisme mitocondrial, concretament al cicle TCA i a la síntesi d'ATP, ja que el  $\text{Ca}^{2+}$  regula el metabolisme energètic activant l'oxidació de substrats i la producció d'ATP (Figura 1.7). Això és degut a que el  $\text{Ca}^{2+}$  activa diversos enzims del cicle TCA, com ara la piruvat deshidrogenasa, la isocitrat deshidrogenasa o la  $\alpha$ -cetoglutarat deshidrogenasa, i també activa la  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP sintasa, última responsable de la producció d'ATP (Denton et al., 1972; Territo et al., 2000). Aquest ATP és necessari per regular la interacció actina-miosina que dona lloc a la contracció i per a que el  $\text{Ca}^{2+}$  torni al reticle sarcoplàsmic.

#### 1.2.4.7. Alteracions en la microvasculatura

Alteracions estructurals i funcionals en la microvasculatura cardíaca s'han observat en pacients diabètics i models animals de diabetis, i s'han relacionat amb l'etiopatogènia de la CMD (Rubler et al., 1972; Warley et al., 1995). S'ha descrit que els pacients diabètics presenten microangiopatia, en la que les parets dels vasos es tornen més gruixudes, la densitat i superfície dels capil·lars es redueix, i la fibrosi perivascular i intersticial hi és present (Rubler et al., 1972). A conseqüència d'això, la reserva vascular coronària es troba reduïda i la vasodilatació coronària dependent de l'endoteli està alterada (Nitenberg et al., 2000). Aquestes alteracions poden contribuir als canvis estructurals i funcionals, mort cel·lular i fibrosi, observats en la CMD (Yu et al., 2002b). Aquesta disfunció endotelial és conseqüència, en part, de la hiperglucèmia i la hiperlipidèmia característiques de la diabetis. Diferents mecanismes, com l'alteració en l'activitat de l'òxid nítric, l'increment dels nivells de prostaglandines vasoconstrictores o l'augment en l'activitat de la PKC donen lloc a un increment en la permeabilitat vascular i la vasoconstricció, que promouen l'apoptosi i la fibrosi, i acaben contribuint en la hipertròfia i la disfunció cardíaca.



### 1.2.4.8. Inflamació

Està àmpliament acceptat que la inflamació té un paper important en la patogènesi de la resistència a la insulina. La diabetis, principalment la DMII associada a obesitat, es caracteritza per la presència d'elevats nivells de citocines proinflamatòries circulants i en els diversos teixits. Alguns estudis en models animals de diabetis suggereixen que la inflamació juga també un paper rellevant en el desenvolupament de la CMD. Aquests estudis han demostrat l'existència de processos inflamatoris en el miocardi d'individus diabètics, que es manifesten en nivells elevats de citocines inflamatòries com IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  o IL-18 (*interleukin 18*), així com elevats nivells de molècules d'adhesió cel·lular i un increment en la infiltració de macròfags i leucòcits (Westermann et al., 2007a).

Que la inflamació és un procés important en la patogènesi de la CMD ho recolzen evidències experimentals en models animals en els que la disminució dels processos inflamatoris associats a diabetis millora la funció cardíaca. Per exemple, la reducció dels nivells de citocines inflamatòries en ratolins amb DMI mitjançant la inhibició farmacològica de p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) millora la disfunció ventricular (Westermann et al., 2006). El tractament de rates amb DMI amb un inhibidor d'ICE (*interleukin converting enzyme*), un enzim que actua sobre els precursors inactius de IL-1 $\beta$  i IL-18 i els transforma en les seves formes amb activitat proinflamatòria, millora significativament la funció ventricular (Westermann et al., 2007b). De manera similar, el tractament de rates amb DMI amb un anticòs monoclonal contra TNF $\alpha$  que antagonitza l'acció d'aquesta citocina millora la funció contràctil del cor i redueix els nivells de fibrosi (Westermann et al., 2007c). Malgrat les evidències experimentals en models animals de DMI i DMII, no existeixen dades que demostrin l'existència d'inflamació del miocardi en pacients amb diabetis.

### 1.2.4.9. Inflexibilitat metabòlica

Un dels factors patogènics de la CMD sobre els que existeix més consens entre la comunitat científica és l'existència en els cor dels individus diabètics d'un metabolisme anòmal, principalment en aquells aspectes referents a la utilització de substrats per a produir l'energia necessària per a la contracció cardíaca. Tot i això, les causes i els mecanismes responsables d'aquesta inflexibilitat metabòlica són encara poc coneguts.

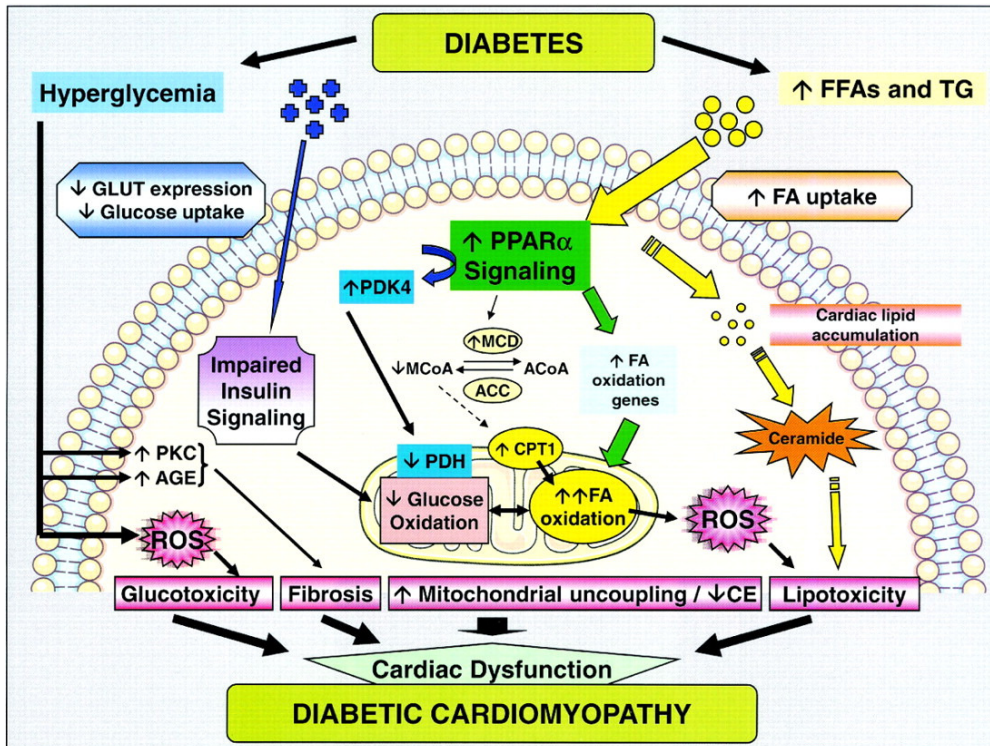
El cor és l'òrgan que més energia necessita de tot el cos, i requereix una continua producció d'ATP per a mantenir la seva funció. Per aquest motiu, els cardiomiòcits tenen un elevat contingut de mitocondris en comparació amb altres tipus cel·lulars. En cors sans, la taxa de fosforilació oxidativa va associada a la hidròlisi d'ATP, per tal de produir l'energia necessària. D'aquesta manera, el cor ha de ser capaç de canviar entre carbohidrats i àcids grassos com

a font d'energia segons la disponibilitat dels diferents tipus de substrat, i ha de produir suficient ATP per a la contracció (Stanley et al., 2005). Per això, les cèl·lules cardíaques han de regular una sèrie de processos biològics que inclouen: la captació i el processament de substrats, la producció d'ATP a partir de l'oxidació de glucosa i àcids grassos, el cicle TCA i la fosforilació oxidativa, el transport d'ATP a través de les membranes mitocondrials, i el transport de  $\text{Ca}^{2+}$  per la funció contràctil.

Nombrosos estudis apunten a que el desenvolupament de la CMD està associat a una alteració en el metabolisme cardíac que es caracteritza per un increment en el metabolisme dels àcids grassos, acompanyat d'una disminució en el metabolisme de la glucosa i el lactat. En individus sans, l'energia requerida pel cor s'obté aproximadament en un 70% de l'oxidació dels àcids grassos, mentre que un 30% prové de la glucosa i en menor grau del lactat. Tot i la presència d'hiperglucèmia, el cor diabètic utilitza exclusivament els àcids grassos com a font d'energia en detriment de la glucosa. Per tant, l'habilitat del cor per canviar de substrat està permanentment bloquejada, un fenomen que es coneix com a **inflexibilitat metabòlica** (Rodrigues et al., 1998). Les causes d'aquesta inflexibilitat metabòlica són, però, poc conegudes.

Els estudis duts a terme fins al moment sobre els mecanismes implicats en la CMD, principalment en models animals de diabetis, han identificat diversos factors que podrien contribuir a aquesta inflexibilitat metabòlica. Aquests inclouen la inhibició de la glucòlisi, l'increment de la captació d'àcids grassos o l'activació de vies metabòliques controlades pel regulador transcripcional PPAR $\alpha$  (Figura 1.8).

En els individus diabètics, probablement com a conseqüència directa de l'alteració en la via de senyalització d'insulina, el primer canvi que es produeix és la reducció del transportador de glucosa GLUT4 a miocardi, i un defecte en la seva translocació en resposta a la insulina. Això provoca una reducció en la captació de glucosa en resposta a la insulina obligant al cor a utilitzar substrats alternatius com a font d'energia per a dur a terme la seva funció contràctil (Garvey et al., 1993; Ohtake et al., 1995). L'atenuació en la senyal d'insulina associada a la diabetis provoca també una inhibició de la glucòlisi deguda a l'activació de PDK4 (*pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4*), un enzim que inhibeix la glucòlisi al fosforilar una de les subunitats de l'enzim piruvat deshidrogenasa (PDH). La PDH catalitza la conversió del piruvat a acetil-CoA, actuant de connexió entre la glucòlisi i el cicle TCA. La inhibició de PDH per part de PDK4 dona com a resultat una inhibició de la via glucolítica, el que finalment es tradueix en un increment de la glucosa intracel·lular que, com hem esmentat en apartats anteriors, provoca glucotoxicitat (Figura 1.8) (Buchanan et al., 2005; Chambers et al., 2011).



**Figura 1.8. Mecanismes lligats a alteracions del metabolisme cardíac que contribueixen al desenvolupament de la CMD.** L'increment en la captació d'àcids grassos activa la via de senyalització de PPAR $\alpha$ , que dona lloc a un increment en la transcripció de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos. Es produeix un augment en la producció de ROS, el qual juga un paper important en el desenvolupament de la CMD ja que està implicat en la lipotoxicitat, la mort cel·lular, el desacoblament mitocondrial i la reducció en l'eficiència cardíaca (Boudina and Abel, 2007).

Per altra banda, els elevats nivells d'àcids grassos circulants en pacients diabètics com a conseqüència principalment de l'elevada lipòlisi al teixit adipós, juntament amb la impossibilitat d'utilitzar eficientment la glucosa per a la obtenció d'energia, fa que el cor basi el seu metabolisme oxidatiu en l'ús dels lípids com a substrat energètic. Efectivament, tant en cors de pacients amb DMI o DMII, com en els de diferents models animals de diabetis, s'ha observat un increment en la captació i l'oxidació d'àcids grassos (Buchanan et al., 2005; Bugger et al., 2008; Herrero et al., 2006; Peterson et al., 2004).

La dependència en l'oxidació de lípids per a l'obtenció d'energia està associada a un increment en l'expressió de gens implicats en la captació d'àcids grassos, com ara CD36 (*fatty acid translocase*), i en l'oxidació d'àcids grassos, com ACADL (*acyl-CoA dehydrogenase, long*

*chain*) o ACADM (*acyl-CoA dehydrogenase, C-4 To C-12 straight chain*) entre d'altres (Finck et al., 2002). No està clar, però, si aquest increment en l'expressió de gens implicats en el catabolisme lipídic constitueix una resposta adaptativa del cor a la gran disponibilitat de lípids i a la impossibilitat d'utilitzar glucosa, o és en si mateix una de les causes que afavoreixen el desenvolupament de la CMD i la seva progressió.

L'increment de l'oxidació d'àcids grassos en els cors diabètics s'ha vist que està associada a un major consum d'oxigen, però que aquest no es correspon amb un augment equivalent de l'activitat contràctil del cor, el que es tradueix en una disminució de l'eficiència cardíaca (Buchanan et al., 2005; Mazumder et al., 2004; Peterson et al., 2004). Aquesta ineficiència cardíaca és, en part, el resultat del desacoblament mitocondrial entre el consum d'oxigen i la producció d'ATP induït pels àcids grassos (Boudina et al., 2007). A més, l'increment en l'oxidació d'àcids grassos als cardiomiòcits, acoblat a aquesta ineficiència energètica, provoca l'augment en la producció de ROS, els quals accentua el desacoblament de la funció mitocondrial, disminueix la producció d'ATP i provoca danys cel·lulars que afecten negativament la contracció cel·lular i la seva viabilitat (Bugger and Abel, 2010).

Des d'un punt de vista mecanístic, els estudis duts a terme pel laboratori del Dr. D.P. Kelly apunten al receptor nuclear d'hormones PPAR $\alpha$  com a un dels principals mediadors dels canvis metabòlics observats en el cor diabètic. El paper de PPAR $\alpha$  en la regulació del catabolisme lipídic cel·lular és ben conegut. Està ben documentat que PPAR $\alpha$  controla l'expressió de gens implicats en la captació d'àcids grassos (CD36, FATP1), el seu transport al mitocondri (CPT1 $\beta$ , *carnitine palmitoyltransferase 1B*) i la seva oxidació als mitocondris (ACADM, ACADL) i els peroxisomes (ACOX, *peroxisomal Acyl-CoA oxidase*) (Barger and Kelly, 2000). El paper de PPAR $\alpha$  en el control del catabolisme lipídic fa que aquest receptor nuclear tingui una funció especialment rellevant en el control l'homeòstasi metabòlica del cor, essent essencial per a l'adaptació del metabolisme i la funció cardíaca en resposta a determinats estímuls nutricionals i fisiològics. Per exemple, durant els períodes de dejuni, PPAR $\alpha$  regula l'increment en l'expressió a cor de gens involucrats en l'oxidació d'àcids grassos, coincidint amb l'augment en la producció d'energia a partir d'aquests substrats experimentada pel miocardi i la seva major disponibilitat. En aquest sentit, ratolins deficients en PPAR $\alpha$  no poden adaptar-se amb normalitat al dejuni i mostren una alteració en l'oxidació cardíaca de lípids, els quals s'acumulen al miocardi produint esteatosi cardíaca (Leone et al., 1999). Si bé PPAR $\alpha$  és clau per a la flexibilitat metabòlica del cor i juga un paper crucial en l'adaptació fisiològica a determinades situacions, els estudis de Kelly i col·laboradors suggereixen que PPAR $\alpha$  pot ser també el responsable, almenys en part, dels canvis metabòlics que causen o contribueixen al desenvolupament de la CMD (Figura 1.8). Així, s'ha vist que l'expressió de PPAR $\alpha$  està anòmalament augmentada en cor de models animals amb DMII, como ara rates Zucker diabètiques (Buchanan et al., 2005) o ratolins db/db de 8-10 setmanes d'edat (Boudina et al., 2007), així com en ratolins amb DMI (Finck

## Introducció

et al., 2002). Aquest increment en l'expressió de PPAR $\alpha$  correlaciona en aquests models experimentals amb un increment en l'expressió de gens implicats en el transport i oxidació d'àcids grassos, així com amb la presència d'alteracions en la funció contràctil del cor. El potencial paper de PPAR $\alpha$  en la patogènesi de la CMD s'ha vist recolzat per la generació de models animals modificats genèticament en els que es sobreexpressa PPAR $\alpha$  de manera específica a cor. Aquests animals reproduïen acuradament algunes de les alteracions característiques de la CMD, com ara l'increment en l'expressió de gens implicats en el catabolisme lipídic, l'increment de l'esteatosi cardíaca, l'augment de l'oxidació d'àcids grassos en paral·lel a una reducció de la utilització de glucosa, i finalment una disfunció contràctil del cor caracteritzada per hipertròfia ventricular (Burkart et al., 2007; Finck et al., 2003; Finck et al., 2002).

Malgrat les evidències exposades en el paràgraf anterior, el paper de PPAR $\alpha$  en la CMD no està del tot clar, i altres estudis han aportat dades que indiquen el contrari. Per exemple, en els ratolins Akita, que presenten DMI acompanyada de disfunció cardíaca, no s'ha observat un augment en l'expressió de PPAR $\alpha$  a cor (Bugger et al., 2009). De manera similar, en ratolins db/db amb DMII de 4 setmanes d'edat tampoc no s'ha detectat un increment en l'expressió de PPAR $\alpha$  (Buchanan et al., 2005), el que suggereix que altres factors poden contribuir a les alteracions metabòliques i funcionals presents en la CMD.

### 1.2.5. Tractament de la CMD

Tal i com s'ha comentat en apartats anteriors, les alteracions metabòliques, la fibrosi o la resistència a la insulina contribueixen a la patogènesi de la CMD i, per tant, podrien ser diana de diversos tractaments i teràpies dirigides a prevenir o mitigar les complicacions de la malaltia. Tot i això, el pobre coneixement que es té sobre els mecanismes que regulen cadascú d'aquests processos fa que les opcions terapèutiques siguin molt escasses i es limitin principalment al control glucèmic. A part del control de la diabetis mitjançant fàrmacs insulino-sensibilitzadors, altres opcions terapèutiques inclouen l'ús de bloquejants del calci o compostos amb propietats antioxidants (Fang et al., 2004). A continuació es detallen les principals teràpies utilitzades actualment en pacients diabètics per al tractament de la CMD.

#### 1.2.5.1. Insulina i agents insulino-sensibilitzadors

Com s'ha comentat anteriorment, l'alteració en la via de senyalització de la insulina s'ha apuntat com a un dels possibles agents causals de les alteracions metabòliques i funcionals de la CMD. Per tant, millorar l'acció de la insulina a nivell cardíac constitueix una bona opció

terapèutica per al tractament de la CMD. Les injeccions d'insulina per mantenir els nivells normals de glucosa són un dels mètodes principals a l'hora de tractar la diabetis, principalment la DMI. Evidentment, la normalització de la via de senyalització de la insulina repercuteix positivament en altres aspectes o factors que també s'han associat a la CMD, com ara la hiperglicèmia i la hiperlipidèmia, al facilitar, per una banda, la captació de glucosa i l'activació de la glucòlisi, i per altra costat, al promoure la inhibició de la lipòlisi i, per tant, la disminució dels nivells circulants d'àcids grassos i la seva oxidació.

En els cas dels diabètics de tipus 2 o en pacients amb prediabetis, l'estratègia terapèutica està encaminada a la millora de la sensibilitat a la insulina, mitjançant el tractament amb fàrmacs insulino-sensibilitzadors com la metformina o les tiazolidinediones (TZD). Ambdós fàrmacs milloren el control glucèmic i redueixen els nivells d'àcids grassos circulants, dos dels factors coneguts que afecten negativament la funció cardíaca en pacients diabètics. Tot i això, en el que refereix a les TZD, l'ús d'aquests fàrmacs en pacients diabètics amb CMD pot estar contraindicat donat que alguns dels membres d'aquesta família de compostos, com ara la rosiglitazona, tenen efectes adversos en la funció cardíaca (He et al., 2014).

### 1.2.5.2. Exercici i dieta

La obesitat està directament associada amb la resistència a la insulina, la qual contribueix al desenvolupament de la diabetis i de la CMD. Per tant la pèrdua de pes ajuda a millorar la sensibilitat a la insulina en els pacients diabètics. L'exercici físic també pot ser beneficiós, ja que millora l'homeòstasi de la glucosa, disminueix els nivells de lípids i millora la funció cardíaca. La majoria dels estudis que s'han dut a terme han demostrat que l'activitat física té un efecte cardioprotector durant el desenvolupament de la CMD (Johnson et al., 2015), però també s'ha vist que pot protegir el cor en estadis avançats de la malaltia (Wang et al., 2015).

### 1.2.5.3. Bloquejants del calci

L'acumulació de calci intracel·lular s'ha associat amb la disfunció cardíaca en el context de la CDM. Els tractaments amb bloquejants dels canals de calci poden prevenir els canvis al miocardi provocats per la diabetis, tal i com s'ha vist en estudis realitzats en models experimentals de DMI induïda per estreptozotocina (STZ), on la funció cardíaca pot millorar amb el tractament amb verapamil, un antagonista del canal de  $Ca^{2+}$  del tipus L (Afzal et al., 1988).

## Introducció

### 1.2.5.4. Antioxidants

Tal i com es demostra en diferents estudis, l'ús d'antioxidants redueix els nivells de ROS i la mort cel·lular, disminuint l'estrès oxidatiu i la fibrosi, i millorant la funció cardíaca. La inhibició de la producció de ROS per part de l'antioxidant flavonol millora la funció diastòlica, disminueix la hipertròfia dels cardiomiòcits i redueix la deposició del col·lagen en models de DMI induïts per STZ (Khong et al., 2011). Altres estudis també demostren que es produeix una millora en la funció cardíaca amb antioxidants com la diosmina o l'àcid ascòrbic que, a més de reduir l'estrès oxidatiu, també redueixen la inflamació i la mort cel·lular (Kumar et al., 2013; Senthamizhselvan et al., 2014; Saran et al., 2014).

### 1.2.6. Models animals per a l'estudi de la CMD

Els models animals en rosegadors són una eina molt potent a l'hora de estudiar els efectes de la diabetis, la resistència a la insulina o la obesitat en la funció cardíaca, i ha permès una millor comprensió dels potencials mecanismes implicats en la CMD. A part de ser molt fàcils i poc costosos de mantenir en un laboratori, i de tenir un cicle de reproducció molt curt, els ratolins són genèticament bastant semblants als humans en comparació amb altres espècies animals. A més, els models murins presenten un clar avantatge respecte a altres models de mamífers, i és que els rosegadors no desenvolupen aterosclerosi (Wu and Huan, 2007). Un altre clar avantatge de treballar amb ratolins és la facilitat de generar mutants, ja que disposem de la seqüència completa del genoma, cosa que ens permet sobreexpressar o eliminar determinats gens amb relativa facilitat i disposar així de diferents estratègies per estudiar la CMD

	STZ	OVE26	Akita	ob/ob	db/db	ZDF	Pacients diabètics
Massa ventricular	=		=	↑	↑	↑	↑
Funció cardíaca	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Disfunció mitocondrial	↑	↑	↑	↑	↑		↑
Eficiència cardíaca	↓		=	↓	↓	=	↓
Oxidació de la glucosa	↓		↓	↓	↓	↓	
Oxidació d'àcids grassos	↑		↑	↑	↑	↑	↑
Acumulació de lípids	↑			↑	↑	↑	↑
Estrès oxidatiu	↑	↑		↑	↑		
Homeòstasi del calci	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓

Taula 1.2. Comparació de les anomalies cardíques en models animals de diabetis i en humans amb CMD (Bugger and Abel, 2009).



Els diferents models de rosegadors utilitzats per a l'estudi de la CMD presenten un fenotip cardíac que comparteix molts trets en comú amb la patogènesi de la CMD en humans, com la hipertròfia ventricular, la disfunció diastòlica, l'increment en la captació i utilització d'àcids grassos, l'esteatosi, la disfunció mitocondrial o l'alteració en l'homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  (Bugger and Abel, 2009) Tot i això, els estudis realitzats fins al moment han posat de manifest l'existència d'algunes diferències entre ells (Taula 1.2).

A continuació es descriuen els models de rosegadors més utilitzats per a l'estudi de la CMD.

### 1.2.6.1 Models de DMI

#### - DMI induïda per tractament amb STZ:

En la majoria d'estudis realitzats en un context de DMI s'utilitza el model STZ, en el que la diabetis de tipus I s'indueix mitjançant un tractament amb STZ. La STZ és un compost d'origen fúngic que té una estructura similar a la de la glucosa i que pot ser captada mitjançant el transportador de glucosa GLUT2 (*glucose transporter type 2*) per les cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques. Aquest antibiòtic és tòxic per les cèl·lules i com a resultat és produeix la necrosi de les cèl·lules beta del pàncrees, amb la consegüent deficiència en la secreció d'insulina (Bonnie-Nielsen et al., 1981). El principal problema d'aquest model es troba, precisament, en l'efecte tòxic de la STZ, sobretot quan s'utilitza a dosis elevades, ja que altera el DNA i pot afectar la funcionalitat d'altres òrgans, la qual cosa afecta a la supervivència dels animals (Kolbye et al., 1968).

Els animals tractats amb STZ presenten hiperglucèmia als pocs dies d'haver iniciat el tractament i tenen uns nivells elevats d'àcids grassos lliures, triglicèrids i colesterol en sèrum, el que reproduïx fidelment les característiques de la DMI en humans. En aquest model de DMI s'ha observat també la presència de disfunció diastòlica i sistòlica, així com una reducció en la fracció d'escurçament. En el model STZ també s'ha vist un augment en el metabolisme cardíac d'àcids grassos, acompanyat per una disminució en el metabolisme de la glucosa (Finck et al., 2002; How et al., 2006). En altres estudis amb aquest model s'ha vist que hi ha un augment de l'hipertrofia i una disminució de la eficiència cardíaca (Bugger et al., 2012). Per últim, aquest model també presenta una disminució en l'expressió de SERCA2a i del intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que resulta en una alteració de la homeòstasi del  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhao et al., 2006). A més, també s'ha observat un augment en el contingut de teixit connectiu (fibrosi) al cor, com a conseqüència de l'increment en l'expressió del receptor per l'angiotensina II.



## Introducció

### - DMI induïda per calmodulina (Ratolins OVE26):

El model de ratolí OVE26 és el resultat de la sobreexpressió en les cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques de la proteïna calmodulina, que uneix el  $Ca^{2+}$ , i que dóna lloc a una diabetis amb deficiència en insulina degut a un efecte tòxic de la calmodulina en les cèl·lules beta del pàncrees (Epstein et al., 1989). Això es degut a que els nivells alts de calmodulina activen la sintasa d'òxid nítric, el que dóna lloc a processos apoptòtics en les cèl·lules beta.

Els ratolins OVE26 tenen incrementats els nivells de triglicèrids en sèrum i presenten una forta disminució en els nivells d'insulina (Epstein et al., 1989; Liang et al., 2002). Alguns estudis han demostrat la presència de disfunció cardíaca i alteracions en l'homeòstasi del calci en aquest model animal (Ye et al., 2003). En ratolins OVE26 també s'ha observat danys en la membrana dels mitocondris que dóna lloc a disfunció mitocondrial i un augment del estrès oxidatiu. Paradoxalment, aquestes alteracions en la funció dels mitocondris estan associades a un increment en la biogènesi mitocondrial (Shen et al., 2004; Ye et al., 2004). Aquest augment en la biogènesi mitocondrial s'entén com un intent, si bé ineficient, de compensar la disfunció mitocondrial present als cardiomiòcits dels ratolins OVE26 tot generant nous orgànuls per a mantenir la síntesi d'ATP que permeti mantenir la contracció cardíaca.

A diferència del model STZ, on l'STZ té un efecte sobre la supervivència dels animals, el model de ratolins OVE26 permet un estudi de la diabetis en etapes més avançades de la malaltia i per tant són més adients per estudiar l'evolució de la CMD en el temps.

### - Model de DMI induïda per mutacions en el gen de la insulina (ratolins Akita):

En aquest model, els ratolins desenvolupen diabetis com a conseqüència d'una substitució en una base del gen *Ins2* que codifica per la insulina, i que dóna lloc a un canvi de l'aminoàcid cisteïna per una tirosina, el que fa que les dues cadenes de la proteïna no es puguin unir correctament (Yoshioka et al., 1997). Aquesta mutació provoca que la proteïna proinsulina no es pugui plegar correctament i, com a resultat, es produeix la disfunció de les cèl·lules beta pancreàtiques degut als agregats que es formen en el reticle endoplasmàtic (Wang et al., 1999).

El fenotip d'aquests ratolins és semblant al dels altres models de DMI i es caracteritza per uns nivells alts de triglicèrids i àcids grassos lliures en sèrum, així com per un increment en l'oxidació d'àcids grassos i una disminució en l'oxidació de la glucosa (Bugger and Abel, 2008). Pocs treballs s'han centrat en l'estudi de la funció cardíaca en aquest model, en el que també s'observa una alteració en la funció cardíaca caracteritzada per una disfunció diastòlica i una

reducció de la fracció d'escurçament (Basu et al., 2009). A més, la disfunció cardíaca en aquests animals està associada a la lipotoxicitat, però en canvi no presenten disfunció sistòlica, fibrosi intersticial o hipertròfia.

### 1.2.6.2 Models de DMII

Els models animals de DMII més utilitzats per estudiar la funció cardíaca en el context de l'obesitat i la resistència a la insulina es basen en defectes en la senyalització de la leptina, que és una hormona crítica en el control de la ingesta i en la regulació de la despesa energètica. Aquests models inclouen els ratolins db/db i rates ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*) que tenen el receptor de leptina mutat, i ratolins ob/ob que són deficientes en leptina. Tots aquests models tenen un fenotip comú: obesitat, hiperglucèmia i resistència a la insulina. En aquest sentit cal remarcar que la DMII en humans representa més del 90% dels casos de diabetis i està freqüentment associada a obesitat, pel que aquests models animals són útils per estudiar la CMD en un context metabòlic molt semblant (obesitat i diabetis) al que es dona en una proporció important de la població amb risc de CMD.

#### - Ratolins deficientes en leptina (ob/ob):

Els ratolins ob/ob desenvolupen diabetis com a conseqüència d'una mutació recessiva en el gen de la leptina que dona lloc a una deficiència d'aquesta adipocina amb funcions anorexigèniques (Zhang et al., 1994). Com a resultat, els animals esdevenen hiperfàgics i ràpidament desenvolupen obesitat i una severa resistència a la insulina. A partir de les 15 setmanes d'edat, els ratolins ob/ob són extremadament obesos i ja presenten una DMII ben establerta.

El fenotip cardíac en els ratolins ob/ob es relativament subtil, i existeix certa disparitat entre els resultats obtinguts en diferents estudis realitzats en aquest model, una variabilitat que cal atribuir a l'ús de diferents tècniques per a la mesura de la funció cardíaca. En alguns estudis, mitjançant l'ús de tècniques ecocardiogràfiques, s'ha observat la presència d'hipertròfia cardíaca associada a una lleugera disfunció sistòlica, al menys a partir de les 16 setmanes d'edat (Barouch et al., 2003). En preparacions de Langendorff de cors aïllats, no s'ha observat disfunció contràctil, o aquesta és molt lleu (Barouch et al., 2003; Buchanan et al., 2005; Mazumder et al., 2004). Aquesta lleugera disfunció contràctil està associada a un increment en el consum d'oxigen que resulta d'una menor eficiència cardíaca degut a la disminució de la capacitat respiratòria mitocondrial (Boudina et al., 2005; Buchanan et al., 2005; Mazumder et al., 2004). D'acord amb el descrit en altres models de CMD, els ratolins ob/ob presenten una elevada taxa d'oxidació d'àcids grassos i d'acumulació de triglicèrids al

## Introducció

miocardi (Buchanan et al., 2005; Mazumder et al., 2004). Per l'altra banda, també es caracteritzen per una disminució en l'activitat de SERCA2a, i el cor presenta apoptosi dels cardiomiòcits (Barouch et al., 2006; Boudina et al., 2005).

### *- Ratolins deficients en el receptor de leptina (db/db):*

La soca de ratolins db/db constitueix un altre model d'obesitat i DMII que també esdevé per una deficiència en la senyalització de la leptina. En aquest cas, la funció de la leptina està alterada degut a un defecte en el seu receptor, la forma llarga del qual és substituïda per una forma curta a causa de la inserció d'un codó stop en el transcrit i que s'expressa de forma elevada a d'hipotàlem, el que desencadena la deficiència en la transducció del senyal (Lee et al., 1996). Aquests ratolins presenten, ja en etapes molt primerenques, resistència a la insulina, hiperglucèmia, hiperinsulinèmia i nivells alts d'àcids grassos, triglicèrids i leptina, però a diferència dels ratolins ob/ob, a les 8 setmanes d'edat ja presenten una DMII ben establerta.

El metabolisme cardíac en ratolins db/db es caracteritza per un increment en l'oxidació d'àcids grassos i una acumulació intracel·lular de lípids, mentre que el consum de glucosa està disminuït (Belke et al., 2000), el que, tal i com hem esmentat anteriorment, és un tret característic i diferencial de la CMD. En quant a la funció contràctil, les alteracions observades en ratolins db/db són més acusades que en els ratolins ob/ob, segurament degut a l'aparició primerenca i major severitat de la hiperglicèmica. No obstant, no tots els estudis troben indicis de disfunció cardíaca. L'ús de tècniques d'imatge per ressonància magnètica ha permès detectar la presència d'hipertrofia cardíaca, evidenciada per un augment en la massa i el gruix de la paret del ventricle esquerre (Yue et al., 2007). Alguns estudis ecocardiogràfics han demostrat una reducció en la fracció d'escurçament, així com una alteració de les dimensions de les parets i cavitats cardíques (Carley et al., 2004; Semeniuk et al., 2002), mentre que altres estudis que han utilitzat tècniques similars no han trobat alteracions morfològiques evidents en aquest model (Daniels et al., 2010; Li et al., 2014). Per altra banda, els estudis funcionals en cors aïllats han descrit una disminució en la potència cardíaca, la pressió desenvolupada pel ventricle esquerre o el pic de pressió sistòlica (Belke et al., 2004; Boudina et al., 2007; Carley et al., 2004).

En el model db/db també s'ha observat a cor una disminució de l'eficiència cardíaca i de la respiració mitocondrial, acompanyada per un augment del consum d'oxigen ( $MVO_2$ ), i s'ha descrit un increment en la biogènesi mitocondrial i en la producció de ROS (Boudina et al., 2007; How et al., 2006).

- *Rates Zucker Diabetic Fatty (ZDF)*:

En el model de diabetis ZDF, les rates tenen una mutació en el gen que codifica pel receptor de la leptina. En aquest sentit, és un model equivalent al de ratolins db/db. Com a conseqüència de la mutació en el receptor de la leptina, es genera un receptor no funcional i els animals desenvolupen obesitat i diabetis (Phillips et al., 1996). Les rates ZDF es caracteritzen per tenir resistència a la insulina, hiperinsulinèmia, hiperglucèmia, hiperleptinèmia i nivells elevats de triglicèrids i d'àcids grassos lliures.

Aquests animals també desenvolupen hipertròfia i disfunció cardíaca. També presenten fibrosi intersticial, així com una elevada acumulació de lípids al miocardi i un alteració en la funció contràctil (Sharma et al., 2004; Wang et al., 2005; Zhou et al., 2000). A més, també presenten un increment en la oxidació d'àcids grassos, mentre que la oxidació de carbohidrats i l'expressió de Glut4 estan disminuïdes (Chatham and Seymour, 2002; Sharma et al., 2004; Wang et al., 2005).

### 1.3. Estrogen-Related Receptors

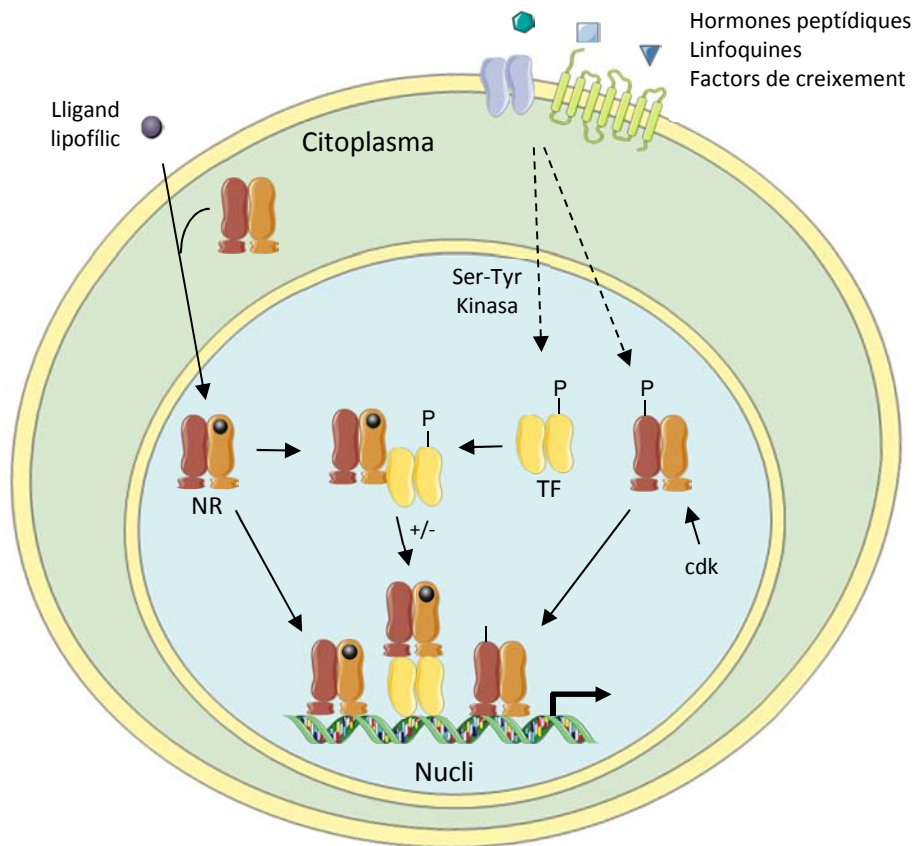
#### 1.3.1. Receptors Nuclears

Els receptors nuclears formen una superfamília de factors de transcripció que regulen nombroses funcions biològiques, com ara el metabolisme, el desenvolupament, la reproducció o les respostes immunes. Els receptors nuclears, dels quals en humans se'n coneixen 48, actuen com a factors de transcripció activats per lligand i regulen així la transcripció dels seus gens diana. Aquest és el cas dels receptors nuclears per a diferents hormones esteroides, com el receptor d'hormones tiroïdals, els receptors d'andrògens o el receptor de glucocorticoides. Tot i això, per a un nombre considerable de receptors nuclears, com per exemple els *estrogen-related receptors* (ERR), se'n desconeix el seu lligand natural, motiu pel qual se'ls coneix com a receptors nuclears orfes.

En el model d'acció d'alguns dels receptors nuclears, el receptor es troba inactiu formant complexos amb les HSP (*heat shock proteins*) al citoplasma. Un cop que s'hi uneix el lligand, el receptor deixa d'interaccionar amb les HSP i es transloca al nucli on actua tot activant l'expressió dels seus gens diana. Tot i que aquest model d'acció és vàlid per alguns dels receptor d'hormones esteroides com per exemple el receptor d'estrògens (ER), el receptor d'andrògens i el receptor de glucocorticoides, la majoria de receptors nuclears es troben constitutivament localitzats al nucli, sovint inclús units al DNA en absència de lligand. Per tal de modular la transcripció dels seus gens diana, els receptors nuclears interaccionen amb proteïnes correguladores, tant coactivadors com corepressors, tot i que també poden fer-

## Introducció

ho mitjançant interaccions directes amb altres factors de transcripció en un procés que no depèn del la unió directa del receptor nuclear al DNA (Lonard and O'Malley B, 2007).



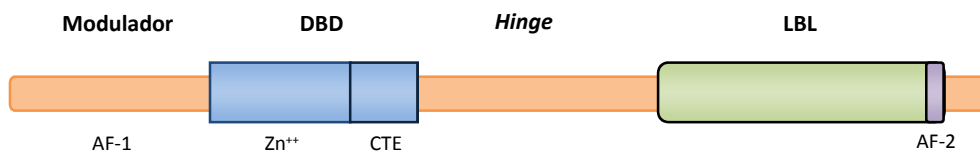
**Figura 1.9 – Models d'acció dels receptors nuclears.** L'activitat dels receptors nuclears pot ser modulada directament per la unió del lligand, la interacció directa amb altres factors de transcripció o mitjançant modificacions covalents com la fosforilació, metilació, acetilació, sumoilació, etc. NR, receptor nuclear; TF, factor de transcripció.

L'activitat dels receptors nuclears es pot controlar mitjançant diferents mecanismes que es detallen a continuació (Figura 1.9):

- La unió directa de lligands lipofílics al receptor o al seu receptor acompanyant, en el cas dels complexos heterodimèrics.

- La modificació covalent, com la fosforilació, regulada per cinases o receptors de membrana, així com altres tipus de modificació postraduccional, com ara la metilació, l'acetilació o la sumoilació.
- La interacció proteïna-proteïna amb altres reguladors transcripcionals, incloent factors de transcripció, altres receptors nuclears o correuladors transcripcionals (coactivadors o corepressors).

Els receptors nuclears comparteixen una estructura comú, consistent en els següents dominis: un domini modulador en l'extrem N-terminal, un domini d'unió al DNA (DBD, *DNA Binding Domain*), una regió frontissa (*hinge*), i un domini d'unió al lligand (LBD, *Ligand Binding Domain*) (Figura 1.10).



**Figura 1.10. Estructura dels receptors nuclears.** Els receptors nuclears estan formats per dominis funcionals independents que inclou un domini activador de la transcripció (AF-1), un domini d'unió al DNA (DBD) i un domini d'unió al lligand (LBD).

El **domini modulador**, també conegut com a domini A/B, és molt variable i conté una regió de transactivació constitutivament activa anomenada regió AF-1. El domini A/B té una longitud molt variable entre els diferents receptors nuclears. Aquesta regió permet la interacció del receptor nuclear amb altres cofactors que modulen la seva activitat .

Els receptors nuclears es caracteritzen per un **domini central d'unió al DNA** o DBD que reconeix regions específiques del DNA conegudes com elements de resposta (*Response Elements*, REs). Aquest domini consta d'un nucli de 66-70 residus que formen dos dits de zinc, molt conservats en tots els membres de la família de receptors nuclears, seguit per una extensió carboxi-terminal d'aproximadament 25 residus anomenada CTE (*carboxy-terminal extension*) i que juga un paper important en les interaccions proteïna-DNA i proteïna-proteïna. Els REs contenen una o dues seqüències consens de sis bases que poden ser repeticions directes o invertides. Si la seqüència esta formada per una parella de repeticions, significa que el receptor s'uneix com a dímer, bé sigui com a homodímer o heterodímer (Glass, 1994).

## Introducció

La **regió frontissa** també és molt variable i, com el seu nom indica, la seva funció és la de servir de pont entre el domini DBD i el domini LBD. És una regió molt flexible que permet que el domini DBD pugui rotar de manera que els receptors es puguin unir com a dímers tant als RE directes com als invertits. A més, també s'ha vist que aquesta regió pot servir d'unió a proteïnes corepressores.

La regió C-terminal del receptor conté el **domini d'unió al lligand (LBD)**, d'uns 225 aminoàcids aproximadament, que reconeix el lligand i assegura una resposta específica i selectiva (Evans 1988). La unió al lligand provoca un canvi conformacional en el LBD que transforma el receptor a un estat transcripcionalment actiu i permet el reclutament i unió de coactivadors (Mangelsdorf et al., 1995). El domini d'unió al lligand (LBD) és un domini multifuncional que permet no només la unió al lligand sinó també la dimerització, la interacció amb HSP, la localització nuclear, la interacció amb coactivadors i la activació transcripcional (transactivació dependent de lligand). Aquesta última depèn de la presència d'un motiu molt conservat, anomenat AF-2, que es localitza en l'extrem C-terminal del LBD.

### 1.3.2. La família dels ERR

Els ERR són una família de receptors nuclears d'hormones composta de tres membres, **ERR $\alpha$**  (NR3B1), **ERR $\beta$**  (NR3B2) i **ERR $\gamma$**  (NR3B3), els quals presenten una elevada similitud a la dels receptors ER. Tot i aquesta similitud amb els ER, els ERR no són activats per estrògens naturals. Tampoc no reconeixen els llocs d'unió dels ER a la cromatina o participen en el control dels processos regulats pels estrògens (Giguere, 2002). De fet, no es coneix cap lligand endogen per als ERR i per això són considerats receptors nuclears orfes (Deblois and Giguere, 2011). Si que existeixen, però, alguns compostos sintètics que modulen l'activitat transcripcional dels ERR. Aquests lligands sintètics han estat molt útils per a l'estudi, principalment en sistemes *in vitro*, de les funcions dels ERR, però presenten diversos problemes a l'hora de ser utilitzats en models *in vivo* o per al tractament de patologies en humanes. Molts d'aquests compostos presenten una pobre biodisponibilitat, la majoria no són específics per a les diferents isoformes dels ERR i alguns d'ells són capaços d'activar altres receptors nuclears. A més, la majoria dels compostos existents que uneixen els ERR actuen com a agonistes inversos, inhibint l'activitat transcripcional dels ERR. Per exemple, el 4-hidroxitamoxifè, un conegut antagonista dels ER, és un dels primers agonistes inversos identificats per a ERR $\gamma$  i ERR $\beta$  (Coward et al., 2001; Greschik et al., 2004). També el dietilestilbestrol, un agonista dels ER, actua inhibint tots tres membres de la família dels ERR (Greschik et al., 2004). Altres compostos com el clordà o el toxafè, dos pesticides organoclorats, també són capaços d'antagonitzar l'activitat d'ERR $\alpha$  (Yang and Chen, 1999). El compost XCT790, una tiadiazoloacrilamida, actua específicament sobre ERR $\alpha$ , però com la majoria de fàrmacs descrits anteriorment ho fa inhibint la seva activitat transcripcional

(Busch et al., 2004; Mootha et al., 2004). Els compostos GSK4716 i GSK9089, de la família de les acil hidrazones fenòliques, van ser els primers compostos descrits amb activitat agonista sobre els membres de la família dels ERR, però actuen de manera inespecífica sobre ERR $\beta$  i ERR $\gamma$  (Zuercher et al., 2005). Més recentment, els esforços per trobar molècules amb activitat agonística específica sobre els diferents membres de la família dels ERR han donat lloc a la descoberta de les pirido[1,2 $\alpha$ ]-pirimidin-4-ones com a agonistes específics d'ERR $\alpha$  (Peng et al., 2011). Tot i això, l'ús terapèutic d'aquests compostos està encara per demostrar.

Una altra particularitat dels receptors ERR és que es troben en una conformació constitutivament activa en absència de lligand (Greschik et al., 2002). Malgrat això, l'activitat transcripcional dels ERR pot ser modulada a través de la seva interacció amb coactivadors transcripcionals com PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*) i PGC-1 $\beta$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta*) (Gaillard et al., 2007; Kamei et al., 2003; Schreiber et al., 2004), o el corepressor RIP140 (*receptor interacting protein 140*) (Castet et al., 2006), tots ells importants reguladors del metabolisme oxidatiu i la funció mitocondrial (Hock and Kralli, 2009). Aquests coreguladors no s'uneixen al DNA per sí mateixos i la seva habilitat per regular l'expressió de gens diana resideix en la capacitat de ser reclutats per altres factors de transcripció, incloent-hi els ERR, als llocs d'unió. El llocs d'unió per als ERR, o elements de resposta dels ERR, reben el nom de ERRE i presenten la seqüència consens N(G/C)AAGGTCA (Dufour et al., 2007). Els ERR s'uneixen als ERRE com a monòmers o com a dímers, i tant ERR $\alpha$  com ERR $\gamma$  poden actuar com a homodímers o com a heterodímers (Dufour et al., 2007). Tot i això, no està clara la rellevància dels monòmers o dels dímers en l'activitat transcripcional dels ERR.

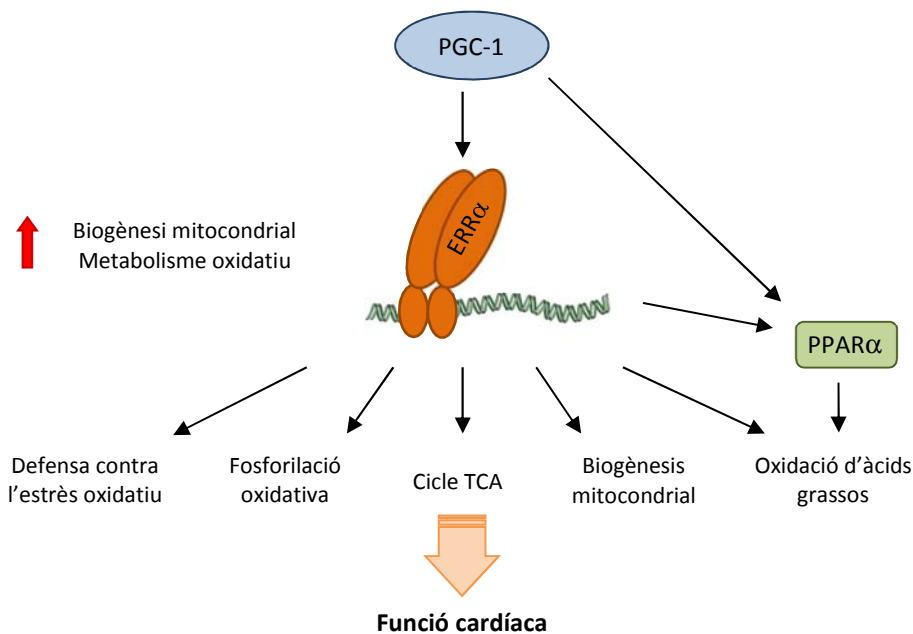
### 1.3.2.1 Funció cel·lular dels ERR

Tant ERR $\alpha$  com ERR $\gamma$  s'expressen en teixits amb una elevada demanda d'energia, com el cor, el múscul esquelètic, el teixit adipós marró i els ronyons, d'acord amb el seu rellevant paper en el control del metabolisme oxidatiu (Alaynick et al., 2007; Alaynick et al., 2010; Giguere et al., 1988). En canvi, ERR $\beta$  té un patró d'expressió més restringit, i s'expressa de manera molt elevada a la retina, encara que també es pot trobar en altres teixits com el cor, els ronyons, la línia trofoblàstica de la placenta o en cèl·lules mare embrionàries de ratolí (Luo et al., 1997; Xie et al., 2009). Els estudis duts a terme fins al moment han posat de manifest que tots tres membres de la família tenen un paper rellevant en la regulació del metabolisme, en particular en la biogènesi mitocondrial i el metabolisme oxidatiu.



## Introducció

Els treballs pioners del laboratori de la Dra. A. Kralli van demostrar que  $ERR\alpha$  era un regulador clau del procés de biogènesi mitocondrial (Schreiber et al., 2004; Villena et al., 2007). Aquests i altres estudis posteriors han identificat els diferents gens diana d' $ERR\alpha$ , entre els que es troben gens implicats en el metabolisme lipídic com  $ACADM$  i  $CPT1\beta$ , el metabolisme de la glucosa com  $PDK4$ , el cicle dels àcids tricarboxílics com  $ACO2$  (*aconitase 2*),  $IDH3\alpha$  (*isocitrate dehydrogenase 3 (NAD(+)) alpha*) i  $SDHA$  (*succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A*), la fosforilació oxidativa com  $CYCS$  (*cytochrome C, somatic*),  $ATP5B$  (*ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta*),  $COX8a$  (*cytochrome C oxidase subunit 8A*) i  $NDUFS7$  (*NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S7*), la dinàmica mitocondrial com  $MFN2$  (*mitofusin 2*) i la defensa contra l'estrès oxidatiu com  $SOD2$  (*superoxide dismutase 2*) (Araki and Motojima, 2006; Charest-Marcotte et al., 2010; Dufour et al., 2007; Schreiber et al., 2004; Schreiber et al., 2003; Sladek et al., 1997; Soriano et al., 2006; Wende et al., 2005) (Figura 1.11). A més, també s'ha vist que  $ERR\alpha$  té un paper repressor en la gluconeogènesi, tot inhibint l'expressió del gen que codifica per a  $PEPCK$  (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 2*), considerat l'enzim limitant del procés de síntesi de glucosa a partir de substrats gluconeogènics (Herzog et al., 2006).



**Figura 1.11. Principals gens i processos mitocondrials regulats per  $ERR\alpha$ .** L'expressió de gens implicats en la majoria de funcions mitocondrials està regulada per  $ERR\alpha$ . Aquest regula, juntament amb els correguladors  $PGC-1\alpha/\beta$ , l'expressió de gens implicats en oxidació d'àcids grassos, fosforilació oxidativa, estrès oxidatiu, cicle TCA i dinàmica mitocondrial.  $ERR\alpha$  juga un paper important en el metabolisme oxidatiu i la biogènesi mitocondrial, i controla també l'expressió d'altres factors de transcripció, com  $PPAR\alpha$ ,  $NRF1$  i  $NRF2$  ( $GABPA$ ), implicats en la regulació de processos mitocondrials específics com ara l'oxidació d'àcids grassos o la fosforilació oxidativa, respectivament (Villena and Kralli, 2008).

S'ha vist que  $ERR\alpha$  controla el metabolisme oxidatiu no només unint-se directament a la regió promotora dels seus gens diana i regulant la seva expressió, sinó que  $ERR\alpha$  també pot controlar l'activitat de gens mitocondrials de manera indirecta mitjançant la regulació d'altres factors transcripcionals implicats en la biogènesi mitocondrial. Estudis demostren que  $ERR\alpha$  regula els receptors nuclears implicats en el metabolisme de lípids i de la glucosa com  $PPAR\alpha$  i  $PPAR\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) (Huss et al., 2007; Huss et al., 2004), i que també s'uneix a la regió promotora del regulador TFB2M (*transcription factor B2, mitochondrial*), associat a la biogènesi mitocondrial (Charest-Marcotte et al., 2010).  $NRF2$  (*nuclear respiratory factor 2 subunit alpha*), un important controlador de la biogènesi i la funció mitocondrial que està implicat en vies com la fosforilació oxidativa, i que també està regulat directament per  $ERR\alpha$  i  $ERR\gamma$  (Huss et al., 2007; Mootha et al., 2004), mentre que  $ERR\beta$  s'uneix al factor transcripcional TFAM (*transcription factor A, mitochondrial*), factor clau en diferents vies mitocondrials relacionades amb la funció i la biogènesi dels mitocondris com la cadena de transport d'electrons (Figura 1.11) (Chen et al., 2008).

La generació de ratolins deficientes en  $ERR\alpha$  ( $ERR\alpha$  KO) ha permès identificar els processos fisiològics més rellevants regulats per  $ERR\alpha$ . En condicions normals, els ratolins  $ERR\alpha$  KO no presenten cap fenotip destacable, amb l'excepció d'una lleugera disminució del pes corporal, com a conseqüència d'una menor acumulació de teixit adipós blanc (Luo et al., 2003). En canvi, s'ha observat que ratolins  $ERR\alpha$  KO són incapaços de regular la temperatura corporal quan són exposats al fred degut a la disminució de la capacitat termogènica del teixit adipós marró (Villena et al., 2007). La termogènesi adaptativa consisteix en la producció de calor per part del teixit adipós marró, un procés que rau en el desacoblament per part d'UCP1 del gradient de protons generat als mitocondris per la cadena respiratòria i la síntesi d'ATP. Els adipòcits marrons d'aquests ratolins presenten una disminució en l'expressió de gens del metabolisme oxidatiu (FAO, *fatty acid oxidation*; OxPhos, *oxidative phosphorylation*; TCA) i una notable disminució de la massamitocondrial, per la qual cosa tenen una menor capacitat respiratòria i no poden generar l'energia necessària per a la termogènesi (Villena et al., 2007).

Els ratolins  $ERR\alpha$  KO també presenten un fenotip cardíac alterat quan aquests animals són sotmesos a un estrès contràctil (Huss et al., 2007). En condicions normals, el cor d'aquests ratolins es desenvolupa de manera normal i no presenta alteracions destacables en la seva estructura i funció, si bé té una mida lleugerament inferior al dels animals control (Huss et al., 2007). Tot i això, els cor dels ratolins  $ERR\alpha$  KO presenten una modesta disminució de l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme energètic, encara que la massa i la morfologia mitocondrials són normals (Dufour et al., 2007; Huss et al., 2007). Els cors d'aquests animals presenten una disminució en els nivells d'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic com CPT2 (*carnitine palmitoyltransferase 2*) i HADHA (*hydroxyacyl-*

## Introducció

CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA), la fosforilació oxidativa com NDUFS4 (NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S4), la contracció muscular com ACTA1 (*actin, alpha 1, skeletal muscle*) i MYL7 (*myosin light chain 7*) i el desenvolupament del cor com MYL3 (*myosin light chain 3*) (Huss et al., 2007). A més, els nivells de PGC-1 $\alpha$  es troben incrementats, en el que sembla un mecanisme per a compensar l'absència de ERR $\alpha$ . ERR $\gamma$  i PPAR $\gamma$  també estan incrementats en el cor d'aquests animals (Dufour et al., 2007). En situacions de sobrecàrrega de pressió cardíaca, els ratolins ERR $\alpha$  KO desenvolupen disfunció contràctil i fallada cardíaca com a conseqüència de la seva incapacitat per a produir l'ATP necessari per a mantenir una correcta funció contràctil. Aquesta disfunció contràctil es caracteritza per una dilatació de la cavitat ventricular i una reducció de la fracció d'escurçament, que contrasta amb la hipertrofia cardíaca sense dilatació del ventricle esquerre o disfunció sistòlica que es dona en els animals control salvatges. A més, en els cors dels ratolins ERR $\alpha$  KO sotmesos a sobrecàrrega de pressió també es va observar la presència de fibrosi i mort cel·lular per apoptosi (Huss et al., 2007).

La manca d'ERR $\alpha$  en macròfags dels ratolins ERR $\alpha$  KO fa que aquests presentin una resposta immune innata defectuosa. Degut a la disfunció mitocondrial associada a la manca d'ERR $\alpha$ , els macròfags dels ratolins ERR $\alpha$  presenten una producció deficient de ROS en resposta a l'interferó  $\gamma$ , el que es tradueix en la incapacitat d'eliminar de manera eficient patògens infecciosos com *Listeria monocytogenes* (Sonoda et al., 2007). Com a conseqüència els ratolins ERR $\alpha$  KO presenten una menor supervivència en resposta a infeccions per patògens.

Més recentment s'ha descrit que ERR $\alpha$  té un paper rellevant en la diferenciació dels miòcits en el múscul esquelètic. Efectivament, in vitro s'ha observat que els miotubs diferenciats derivats de mioblasts procedents de ratolins ERR $\alpha$  KO són més petits i presenten una reducció en l'expressió de gens mitocondrials, el que deriva en una menor capacitat oxidativa i una major producció de ROS (Murray and Huss, 2011). D'acord amb aquest paper en la diferenciació de les cèl·lules musculars, els ratolins ERR $\alpha$  KO presenten una disminució en la massa muscular i intolerància a l'exercici (Perry et al., 2014). A més, també en relació amb la funció d'ERR $\alpha$  en la diferenciació de les cèl·lules musculars, els ratolins ERR $\alpha$  KO presenten una capacitat de regeneració del múscul esquelètic disminuïda (LaBarge et al., 2014).

La funció d'ERR $\gamma$  està menys estudiada, però els treballs duts a terme fins al moment indiquen que, a l'igual que passa amb ERR $\alpha$ , ERR $\gamma$  també juga un paper important en el metabolisme energètic. De fet, ERR $\gamma$  s'uneix als mateixos ERRE que ERR $\alpha$ , i sembla que els gens diana d'ERR $\gamma$  són essencialment els mateixos que els d'ERR $\alpha$  (Dufour et al., 2007). Estudis en múscul esquelètic demostren que ERR $\gamma$  regula l'expressió de gens mitocondrials i promou el metabolisme oxidatiu (Rangwala et al., 2010). Ratolins transgènics que sobreexpressen ERR $\gamma$  a múscul presenten un increment de l'expressió de gens mitocondrials

involucrats en l'oxidació lipídica i la fosforilació oxidativa, així com un increment de la capacitat oxidativa mitocondrial (Rangwala et al., 2010). Per altra banda, els heterozigots dels ratolins ERR $\gamma$  KO presenten una reducció en la capacitat oxidativa mitocondrial del múscul esquelètic i, com a conseqüència d'això, una menor tolerància a l'exercici (Rangwala et al., 2010).

Precisament, el teixit on millor s'ha caracteritzat la funció d'ERR $\gamma$  és el cor. Estudis en teixit cardíac de ratolins en els que s'han utilitzat de manera combinada les tècniques d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) i microarrays de DNA genòmic (*ChIP on ChIP*) ha permès identificar els gens diana d'ERR $\gamma$  a cor (Dufour et al., 2007). Tal i com ja s'ha comentat en el paràgraf anterior, els gens diana d'ERR $\gamma$  coincideixen de manera important amb els d'ERR $\alpha$ , i inclouen gens involucrats en el cicle TCA com SDHA, SDHB (*succinate dehydrogenase complex subunit B*) i SDHD (*succinate dehydrogenase complex subunit D*), la cadena respiratòria i el sistema de fosforilació oxidativa com ATP5G3 (*ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex subunit C3 subunit 9*), ATP5B, COQ7 (*coenzyme Q7, hydroxylase*), COX6C (*cytochrome C oxidase subunit 6C*), COX8B (*cytochrome C oxidase subunit 8B*), CYCS, NDUFA4 (*NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit A4*), NDUFA8 (*NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit A8*) i NDUFS1 (*NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1*), o el transport i oxidació de lípids com FABP3 (*fatty acid binding protein 3*), PLA2G12A (*phospholipase A2 group XIA*) i ACADM. Aquests mateixos estudis demostren que ERR $\gamma$  no només s'uneix a les mateixes regions promotores dianes que ERR $\alpha$ , sinó que ho pot fer com a homodímer o com a heterodímer juntament amb ERR $\alpha$  (Dufour et al., 2007).

Des d'un punt de vista fisiològic, ERR $\gamma$  resulta essencial per al correcte desenvolupament i funció del cor. El cor és un òrgan que es desenvolupa aviat en l'etapa fetal, i utilitza la glucosa provinent de la mare com a principal nutrient per realitzar la seva funció. La transició necessària cap a un metabolisme aeròbic després del naixement desencadena una sèrie de canvis associats al metabolisme d'àcids grassos que permet obtenir la major part de l'energia requerida per a la contracció a partir de lípids (Lehman and Kelly, 2002). En aquest sentit, l'absència de ERR $\gamma$  bloqueja aquesta transició, el que es tradueix en un increment en els nivells de lactat, que és un signe d'una alteració metabòlica que indica que el cor no pot metabolitzar el piruvat via el cicle TCA. Com a conseqüència d'aquestes alteracions metabòliques, els ratolins ERR $\gamma$  KO presenten una funció mitocondrial alterada i moren poc després d'haver nascut degut a una severa disfunció cardíaca (Alaynick et al., 2007). Des d'un punt de vista morfològic els cors dels ratolins ERR $\gamma$  KO presenten una menor mida en comparació amb els controls, però sense alteracions ultraestructurals destacables. En canvi, els electrocardiogrames detecten importants defectes en la despolarització i repolarització del ventricle esquerre degut a una conducció deficient del corrent de sodi que resulta de la disminució en l'expressió del principal canal de sodi SCN5A (*sodium voltage-gated channel*

## Introducció

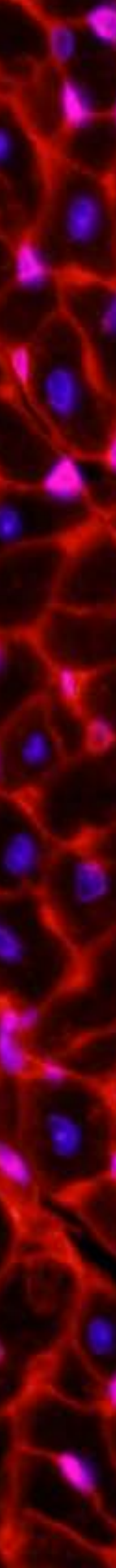
*alpha subunit 5*). Això cal afegir-hi un metabolisme oxidatiu mitocondrial deficient que fa que el cor no pugui fer front a la demanda d'energia necessària per a la contracció (Alaynick et al., 2007; Alaynick et al., 2010). Curiosament, alguns reguladors transcripcionals de la biogènesi mitocondrial, com PGC-1 $\alpha$ , ERR $\alpha$  i NRF2, es troben incrementats en els cors dels ratolins ERR $\gamma$  KO, així com un augment en la massa mitocondrial, en un intent de compensar la desregulació metabòlica provocada per la absència d'ERR $\gamma$ .

La funció d'ERR $\beta$  és potser la menys estudiada, però els estudis duts a terme fins al moment suggereixen que regula de manera semblant moltes de les vies controlades per ERR $\alpha$  i ERR $\gamma$ , i comparteixen gran part dels gens diana (Xie et al., 2009). Tot i això, l'elevada expressió d'ERR $\beta$  a teixits com la placenta, la retina, l'oïda interna o les cèl·lules mare embrionàries fa que, a nivell fisiològic i cel·lular, la funció d'ERR $\beta$  sigui diferent a la dels altres membres de la família.

Estudis previs han demostrat la importància d'ERR $\beta$  per al correcte desenvolupament de la placenta. Així s'ha vist que ratolins ERR $\beta$  KO presenten una elevada letalitat en l'etapa embrionària degut a defectes en la proliferació i diferenciació trofoblàstica (Luo et al., 1997). També s'ha observat que ERR $\beta$  s'expressa de forma específica en les cèl·lules germinals primordials embrionàries i que està implicat en la proliferació de les cèl·lules germinals gonadals (Mitsunaga et al., 2004). A més, ERR $\beta$  s'expressa i controla el desenvolupament de les cèl·lules epitelials encarregades de produir l'endolimfa de l'oïda interna, ja que com s'ha pogut comprovar en alguns models, la deficiència d'ERR $\beta$  provoca anomalies en l'expressió de gens transportadors i de canals iònics (Chen and Nathans, 2007). Altres estudis també han demostrat la importància d'ERR $\beta$  regulant la correcta funció dels fotoreceptors de tipus bastó, tal i com s'observa en alguns models on la mutació del receptor ERR $\beta$  o la utilització d'agonistes inversos per ERR $\beta$  provoquen una degeneració dels fotoreceptors (Onishi et al., 2010).

## Hipòtesi i Objectius

---





## 2. Hipòtesi i objectius

La CMD és una patologia comú entre els pacients diabètics. La malaltia es caracteritza per una disminució de la funció contràctil del cor que es desenvolupa de manera independent a la hipertensió o l'aterosclerosi. Des del punt de vista metabòlic, la CMD es caracteritza per una inflexibilitat metabòlica que fa que el cor depengui exclusivament d'àcids grassos per a l'obtenció d'energia, en detriment de la glucosa. Malauradament, els mecanismes implicats en el desenvolupament de la CMD són desconeguts.

L'objectiu general d'aquesta tesi fou identificar els possibles mecanismes moleculars implicats en les alteracions metabòliques i cel·lulars que caracteritzen la CMD per tal de trobar potencials dianes terapèutiques que permetin el desenvolupament de fàrmacs per al tractament de la malaltia. Amb aquesta finalitat es van proposar els següents objectius:

- 1- Definir els perfils d'expressió gènica en cors de ratolins db/db amb CMD i identificar les principals xarxes gèniques i processos cel·lulars alterats en la patologia.
- 2- Identificar possibles factors reguladors de la transcripció responsables de les alteracions de l'expressió gènica observades en cor de ratolins db/db.

En base als resultats obtinguts fruit dels objectius 1 i 2 es va associar el factor nuclear Estrogen-Related Receptors  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) amb les alteracions en l'expressió gènica observades en els cors de ratolins amb CMD. En base a aquestes dades, la nostra hipòtesi es que d'ERR $\gamma$  podria ser un mediador important en el desenvolupament de la cardiomiopatia diabètica. Per tal de provar aquesta hipòtesi es van proposar els objectius següents:

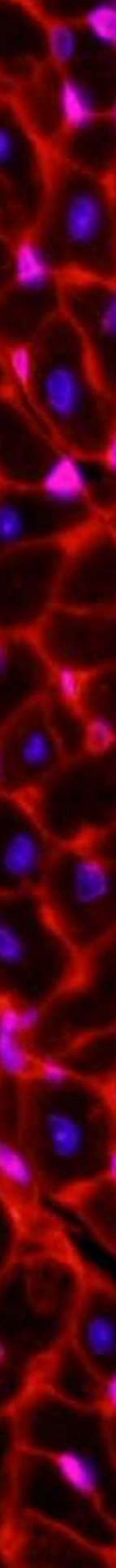
- 3- Determinar la capacitat d'ERR $\gamma$  de reproduir in vitro el perfil d'expressió gènica observat en individus amb CMD.
- 4- Generar un model de ratolí transgènic que sobre-expressi ERR $\gamma$  de manera específica a cor per verificar si un increment en els nivells d'ERR $\gamma$  és suficient per reproduir el fenotip cardíac característic de la CMD.





# Materials i Mètodes

---





## 3. Materials i Mètodes

### 3.1. Estudis *in vivo*

Tots els experiments amb models animals de DMI i DMII es van dur a terme amb ratolins proveïts per Harlan Laboratories, mentre que el model animal de sobreexpressió d'ERRγ a cor va ser generat pel Servei de Transgènesi de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRBB). Tots els animals van ser estabulats a una temperatura constant de 22°C en un règim de llum/fosc de 12 hores i alimentats amb dieta estàndard (2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, Harlan Laboratories) i aigua *ad libitum*.

El manteniment dels animals, així com els procediments experimentals, es van fer d'acord amb la normativa vigent i aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) del Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR).

#### 3.1.1. Model de DMI

Com s'ha comentat en la introducció, un dels models més utilitzats per estudiar la CDM és aquell en que la DMI és induïda per STZ, degut a la relativa facilitat d'obtenir-ne els animals diabètics, tot i la toxicitat del antibiòtic.

Per realitzar els nostres estudis es van fer servir ratolins mascles de la soca C57Bl/6J de 8 setmanes d'edat, als quals se'ls hi va induir la diabetis mitjançant l'administració intraperitoneal de STZ. Per fer això, els ratolins es van dejunar durant 5 hores previ a la injecció intraperitoneal d'una dosi diària de 60 mg/kg de STZ durant 5 dies consecutius. La STZ es va administrar dissolta en tampó Na-Citrat (1,47 g de Na-Citrat en 50mL d'H<sub>2</sub>O destil·lada a pH=4,5) i es va preparar al moment ja que el compost es degrada ràpidament. Als animals control se'ls va administrar únicament tampó Na-Citrat.

L'aigua dels animals es va suplementar amb un 10% de glucosa per evitar problemes d'hipoglucèmia postinjecció. Els nivells de glucosa es van mesurar, tal i com s'indica a l'apartat 3.1.10.1, després del tractament amb STZ per comprovar la inducció de diabetis. Els animals que van assolir uns nivells de glucosa en sang en dejú superiors a 200 mg/dL van ser considerats com a diabètics i van ser utilitzats en els experiments descrits més endavant.

### 3.1.2. Model de DMII

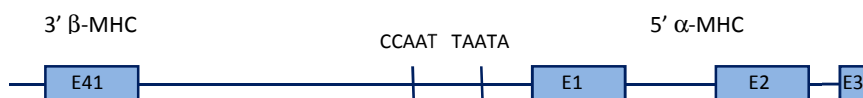
Per aquests estudis es va fer servir com a model de DMII els animals db/db, que com s'ha descrit en la introducció, són deficients en la via de senyalització de la leptina degut a una mutació puntual en el receptor d'aquesta hormona. Com a conseqüència, els ratolins db/db desenvolupen DMII associada a obesitat a edats molt primerenques.

En aquest cas es van utilitzar ratolins mascles BKS.Cg- + *Lepr<sup>db</sup>*/+*Lepr<sup>db</sup>*/OlaHsd (db/db) amb els respectius controls db/+. Inicialment es va decidir fer els nostres estudis a les setmanes 8, 12 i 24 d'edat per tal de determinar a quina edat es presentaven els primers símptomes evidents de CMD, ja que un dels nostres principals objectius era el de determinar els mecanismes implicats en l'origen d'aquesta patologia.

### 3.1.3. Generació dels ratolins transgènics que sobreexpressen hERRY a cor

La sobreexpressió específica de teixit d'un determinat gen es pot dur a terme si aquesta es dirigeix per un promotor que s'expressi exclusivament en el teixit d'interès. Per tal de sobreexpressar hERRY específicament a cor, es va utilitzar el promotor de la cadena pesada de l' $\alpha$ -miosina cardíaca ( $\alpha$ -MHC).

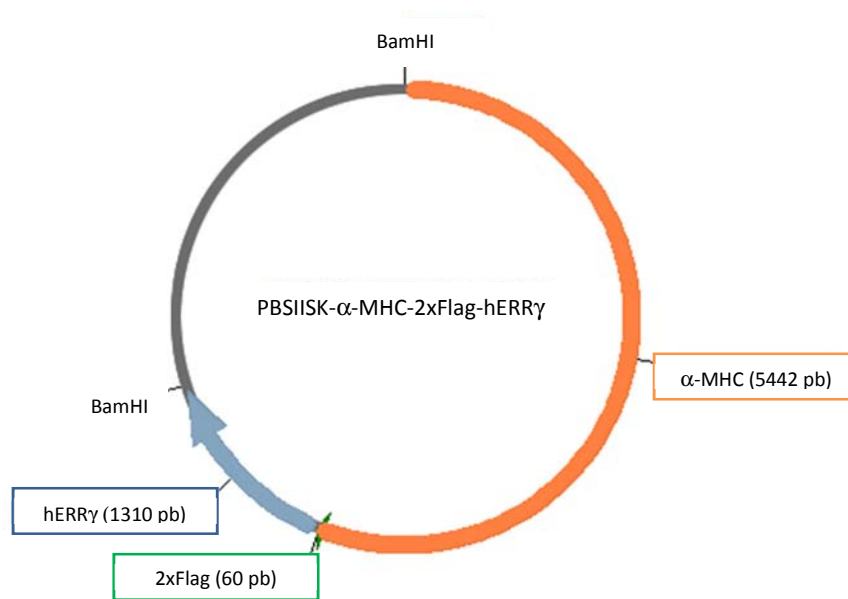
Les miosines són una família de proteïnes motores implicades en la contracció muscular. En múscul cardíac, existeixen dues isoformes de la miosina: l'alfa i la beta. S'ha vist que la regió intergènica que compren l'extrem 3' del gen de la cadena pesada de la  $\beta$ -miosina i l'extrem 5' del gen de la cadena pesada de l' $\alpha$ -miosina és suficient per controlar-ne l'expressió de manera específica al teixit cardíac (Gulick et al., 1991). Aquesta regió consta d'un fragment de 5,7 kb de DNA genòmic que conté part del gen de la  $\beta$ -MHC cardíaca (~100 bp de l'últim intró i tot l'últim exó), la regió intergènica d'aproximadament 4 kb i l'extrem 5' del gen de l' $\alpha$ -MHC cardíaca (les seqüències CCAAT i TAATA, els dos primers introns i els dos primers exons i part del tercer) (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Esquema del fragment de DNA genòmic corresponent a l'extrem 3' de la  $\beta$ -miosina i l'extrem 5' de l' $\alpha$ -miosina. La regió consta de l'últim exó de la  $\beta$ -MHC, i l'extrem 5' de l' $\alpha$ -MHC que conté els elements CCAAT i TAATA i els tres primers exons del gen.

El DNA complementari (cDNA) codificant per ERR $\gamma$  humà (hERR $\gamma$ ) es va clonar en el vector d'expressió PBS II SK que contenia el promotor per la cadena pesada de l' $\alpha$ -miosina ( $\alpha$ -MHC) descrit en l'apartat anterior, el qual va ser cedit amablement pel Dr. Gulick (Genbank u71441) (Gulick et al., 1991). A més, al cDNA d'hERR $\gamma$  se li va afegir en posició 5' una seqüència que dóna lloc a una etiqueta 2xFlag (que conté 2 còpies de l'epítip Flag, DYKDDDDK), amb la finalitat de poder detectar fàcilment la proteïna amb anticossos específics contra aquest epítip donada la manca d'anticossos comercials que detectin la proteïna ERR $\gamma$  amb suficient sensibilitat i especificitat. El procés de clonació del transgen  $\alpha$ -MHC-2xFlag-hERR $\gamma$  es troba detallat en l'apartat 3.2.3.1.

El transgen, que conté el promotor  $\alpha$ -MHC i el gen hERR $\gamma$  amb l'etiqueta 2xFlag, es va alliberar del vector PBSIISK- $\alpha$ -MHC-2xFlag-ERR $\gamma$  digerint amb l'enzim de restricció BamHI i es va utilitzar per generar els ratolins transgènics Tg hERR $\gamma$  que sobreexpressen 2xFlag-hERR $\gamma$  específicament a cor (Figura 3.2).



**Figura 3.2. Mapa del vector PBSIISK- $\alpha$ -MHC-2xFlag-hERR $\gamma$ .** El promotor  $\alpha$ -MHC i el gen que codifica per hERR $\gamma$  amb l'epítip 2xFlag estan representats. També estan representades les dianes de restricció BamHI amb les quals es pot alliberar el transgen 2xFlag-hERR $\gamma$  del vector.

El transgen  $\alpha$ -MHC-2xFlag-hERR $\gamma$  va ser enviat al Servei de Transgènesi de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRBB) per a la generació dels ratolins transgènics. Aquests

## Materials i Mètodes

es van generar mitjançant la microinjecció pronuclear del transgen en zigots de ratolí, tal i com van descriure (Gordon et al., 1980). Bàsicament, aquesta tècnica consisteix en introduir el DNA en el pronucli d'un blastòmer, per després transferir l'embrió a una femella receptora. Aquest DNA s'insereix a l'atzar en el genoma de l'embrió, generalment amb varies còpies, i podrà ser transmès a la descendència si està present a la línia germinal. Cadascun dels embrions injectats amb el DNA donarà lloc a un fundador i a una línia transgènica (Figura 3.3).

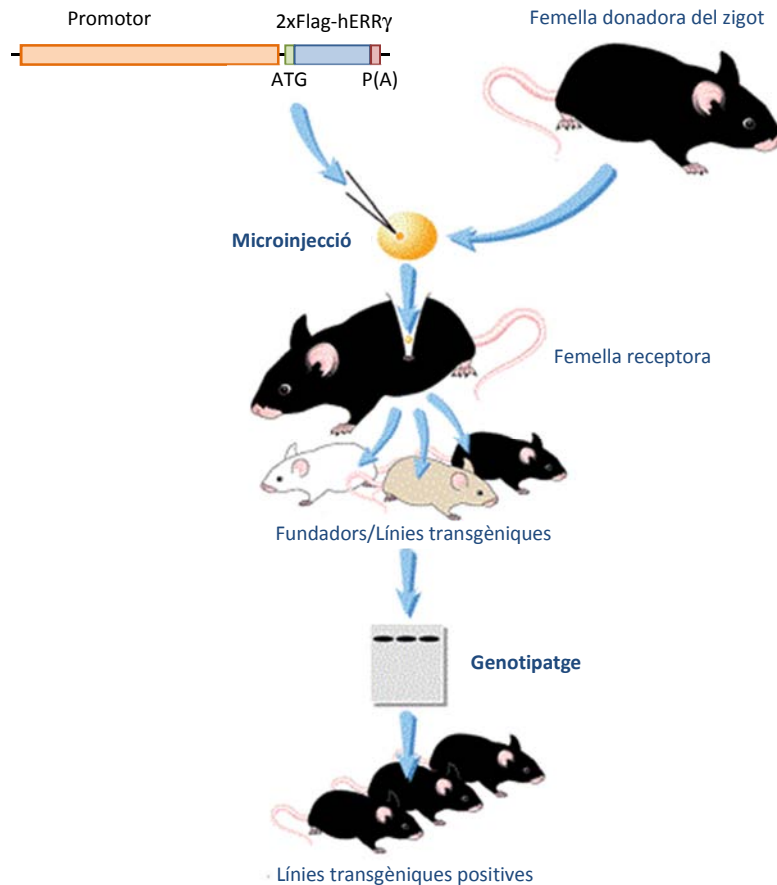


Figura 3.3. Esquema de la generació dels ratolins transgènics mitjançant la microinjecció pronuclear del transgen en zigots de ratolí. Adaptat de [healthsciences.ucsd.edu](http://healthsciences.ucsd.edu).

Les diferents línies transgèniques obtingudes seran diferents unes de les altres, ja que no es pot controlar el lloc d'inserció del transgen ni el número de còpies. Això dóna lloc a diferents nivells d'expressió entre les diferents línies, cosa que no passa amb els descendents del mateix fundador, que comparteixen el mateix número de còpies del transgen inserides en el mateix locus del genoma.

### 3.1.4. Genotipatge dels ratolins

Per tal d'identificar els ratolins que presenten el transgen, aquests han de ser genotipats. El genotipatge dels ratolins es va realitzar a partir de DNA total aïllat d'una petita porció de la cua de l'animal i amplificant un fragment corresponent al transgen mitjançant PCR (Reacció en cadena de la polimerasa) i primers específics. El producte resultant de la PCR, present en els animals transgènics (Tg hERR $\gamma$ ) i absent en animals *wild type* (WT), es va detectar per electroforesi en gel d'agarosa.

Tot el procés de genotipatge es realitza de la següent manera.

#### 3.1.4.1. Extracció del DNA

La purificació del DNA total es va dur a terme digerint la porció de cua amb Proteïnasa K per disgregar els teixits i les cèl·lules, i aïllant el DNA mitjançant una extracció amb clorofom seguit d'una precipitació amb etanol.

##### Procediment:

1. Anestesiari els animals amb 1% de Isofluorà.
2. Tallar aproximadament 1mm de cua i digerir-la en un tub amb 500  $\mu$ l de tampó de digestió (0,5% SDS, 0,1M NaCl, 0,05M Tris-HCl pH=8,0, 3 mM EDTA, 0,1 mg/mL Proteïnasa K) a 55°C durant tota la nit.
3. Seguidament, afegir 75  $\mu$ l d'acetat potàssic 8M i 500 $\mu$ L de cloroform i barrejar.
4. Congelar la mostra a -80°C durant 1 hora i després centrifugar 5 minuts a 14.000 rpm i a T<sup>a</sup> ambient.
5. Transferir la fase aquosa (sobrenedant) que conté el DNA a un tub nou i afegir 1mL d'etanol absolut per precipitar el DNA.
6. A continuació barrejar i centrifugar 5 minuts a 14.000 rpm i a 4°C.



## Materials i Mètodes

7. Tot seguit, descartar el sobrenedant i rentar el *pellet* de DNA amb etanol al 75%.
8. Tornar a centrifugar 5 minuts a 14.000 rpm a T<sup>a</sup> ambient i aspirar el sobrenedant. Deixar assecar el *pellet* a T<sup>a</sup> ambient.
9. Per acabar, resuspendre el *pellet* de DNA en 100µL d'H<sub>2</sub>O milliQ i determinar la concentració per espectrofotometria mitjançant un NanoDrop ND-2000 ( $\lambda=260\text{nm}$ ).
10. Finalment, ajustar la mostra a una concentració final de 50 ng/µL.

### 3.1.4.2. Identificació del transgen mitjançant PCR

Per tal d'identificar la presència del transgen en el genoma dels ratolins, es van utilitzar primers dissenyats específicament a tal efecte que amplifiquen una regió del transgen  $\alpha$ -MHC-2xFlag-hERRY de 537 pb que compren part del promotor de l' $\alpha$ -MHC, la seqüència que codifica per 2xFlag i part del gen hERRY). Les seqüències dels primers que es van fer servir van ser 5'-GCAGGGAAGTGGTGGTGTAGG-3' per al primer *forward* i 5'-ACCCAGAAGCGATGTCACCAC-3' per al primer *reverse*. Les condicions de la PCR es detallen en el següent procediment:

1. Preparar una barreja amb els diferents components de la reacció de PCR (per a un volum final de 25 µL /mostra) amb l'excepció del DNA:

Components	Volum	Concentració final
Buffer 10x + MgCl <sub>2</sub>	2,5µL	2 mM
dNTP's (10mM)	1 µL	400 µM
Primer <i>Forward</i> (10µM)	1,3µL	0.52 µM
Primer <i>Reverse</i> (10µM)	1,3µL	0.52 µM
Taq Polimerasa (5U/µL)	0,25µL	0,05 U/µL
H <sub>2</sub> O milliQ	16,65µL	

2. Posar 23 µL de la barreja en cada tub de PCR i afegir 2 µL (100 ng) de la mostra de DNA.
3. Barrejar i centrifugar per recollir les gotes.

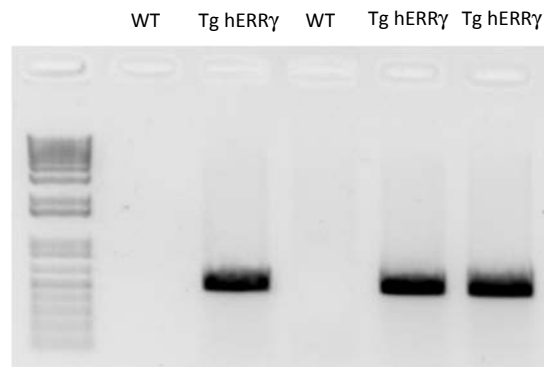
4. Col·locar els tubs amb les mostres en un termociclador (GenAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) i realitzar la PCR en les següents condicions:

Procés	Temperatura	Temps	Nº de cicles
Desnaturalització inicial	95°C	2 minuts	1
Desnaturalització	95°C	30 segons	35
Anellament	56°C	30 segons	
Extensió	72°C	45 segons	
Extensió final	72°C	2 minuts	1
Refredament/Conservació	4°C	∞	1

### 3.1.4.3. Electroforesi en gel d'agarosa

El producte de la PCR resultant de l'amplificació del DNA es va separar en un gel d'agarosa al 1% en tampó TAE (40 mM Tris, 20 mM àcid acètic, 1 mM EDTA). Per visualitzar la banda del amplicó, el DNA es va tenyir amb bromur d'etidi que s'afegeix al moment de preparar el gel.

Els transgènics Tg hERR $\gamma$  presenten una banda de 537 bp, mentre que els WT no presenten cap banda (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Exemple d'una reacció de PCR per detectar la presència del transgen mitjançant l'amplificació de DNA obtinguts de cues de ratolins.** Els productes d'amplificació de la PCR es van separar per electroforesi en un gel d'agarosa al 1%.

### 3.1.5. Estudis ecocardiogràfics

Les dimensions i la funció cardíaca en ratolins es van mesurar mitjançant ecocardiografia en 2D i transtoràcica en mode M, en col·laboració amb La Unitat de Cardiologia del VHIR. Els animals es van anestesiar amb isofluorà al 1% i les anàlisis es van dur a terme amb el sistema ecocardiogràfic Vivid Q (GE Healthcare). Les imatges en mode M de quatre cicles cardíacs diferents de cada ratolí es van analitzar per determinar la funció cardíaca en 13-14 animals per grup experimental.

Els paràmetres cardíacs que es van mesurar van ser la freqüència cardíaca, el gruix del septe interventricular a diàstole (SIVd), el gruix de la paret del ventricle esquerre a diàstole (PVEd), el diàmetre del ventricle esquerre a diàstole (DVEd) i a sístole (DVEs), la fracció d'ejecció (FE) i la fracció d'escurçament (FS).

La mesura de la funció del cor es va obtenir, en part, mitjançant la determinació de la fracció d'escurçament, un índex que representa la variació del diàmetre entre sístole i diàstole. Per calcular aquest valor, que s'expressa en %, es va utilitzar la següent fórmula:

$$FS = (DVEd - DVEs) / (DVEd \times 100)$$

Es van considerar normals els valors de FS d'entre 25 i 45%.

### 3.1.6. Obtenció de teixits i de sang

Els animals van ser sacrificats per dislocació cervical per tal d'obtenir-ne els diferents òrgans i teixits necessaris per als experiments. Tant el cor com la resta de teixits i òrgans es van pesar i es van congelar ràpidament en nitrogen líquid, en el cas de que la seva finalitat fos l'obtenció de DNA, RNA o proteïnes. En el cas de que les mostres es volguessin utilitzar per fer anàlisis histològiques, el teixit, o una part d'aquest, es va fixar amb 4% formaldehid per ser processat posteriorment (veure apartat 3.1.8).

La sang, obtinguda de la vena safena de l'animal després d'un dejú de 5 hores, es va recollir en un tub i es va utilitzar per mesurar els diferents paràmetres serològics. La glucosa es va mesurar directament de la sang, mentre que la resta de paràmetres es van mesurar a partir del sèrum, que es va obtenir centrifugant la sang a 3.000 rpm durant 5 minuts i a 4°C. Un cop obtingut, el sèrum es va conservar a -20°C.

### 3.1.7. Anàlisi de l'expressió del transgen $\alpha$ -MHC-2xFlag-ERR $\gamma$ en ratolins transgènics

Per tal de comprovar que el transgen  $\alpha$ -MHC-2xFlag-ERR $\gamma$  s'expressa de manera específica en el teixit cardíac, es va analitzar la seva expressió en diferents teixits mitjançant RT-PCR a partir de RNA total. Els diferents teixits dels quals es va extreure RNA per analitzar van ser cor, múscul esquelètic, teixit adipós blanc, teixit adipós marró, fetge, ronyó, pulmó i cervell.

En primer lloc es va aïllar RNA dels teixits segons es descriu en l'apartat 3.3.1.1. 400 ng de RNA es van utilitzar per a sintetitzar cDNA mitjançant transcripció reversa (RT), tal i com s'explica detalladament a l'apartat 3.3.4.1. Posteriorment es va realitzar la PCR amb els primers 5'-AAGCGGCCGCTTATGTCAAAC-3' (*forward*) i 5'-CTATATTGCCTTGAATTGTCC-3' (*reverse*), per tal d'amplificar una regió de 424 pb que compren part de 2xFlag i part de la regió codificant d'hERR $\gamma$ .

#### Procediment:

1. Preparar una barreja amb els diferents components de la reacció de PCR (per a un volum final de 20  $\mu$ L /mostra) amb l'excepció del cDNA, segons s'indica en la taula següent:

Components	Volum	Concentració final
<b>Buffer 10x + MgCl<sub>2</sub></b>	2 $\mu$ L	2 mM
<b>dNTP's (10 mM)</b>	1 $\mu$ L	400 $\mu$ M
<b>Primer <i>Forward</i> (10 <math>\mu</math>M)</b>	0,5 $\mu$ L	0,25 $\mu$ M
<b>Primer <i>Reverse</i> (10<math>\mu</math>M)</b>	0,5 $\mu$ L	0,25 $\mu$ M
<b>Taq Polimerasa (5 U/<math>\mu</math>L)</b>	0,2 $\mu$ L	0,05 U/ $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O miliQ</b>	11,8 $\mu$ L	

2. Posar 16  $\mu$ L de la barreja en cada tub de PCR i afegir 4  $\mu$ L de la mostra de cDNA.
3. Barrejar i centrifugar per recollir les gotes.
4. Col·locar els tubs amb les mostres en un termociclador (GenAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) i realitzar la PCR amb les següents condicions:

## Materials i Mètodes

Procés	Temperatura	Temps	Nº de cicles
<b>Desnaturalització inicial</b>	95°C	2 minuts	1
<b>Desnaturalització</b>	95°C	30 segons	35
<b>Anellament</b>	56°C	30 segons	
<b>Extensió</b>	72°C	45 segons	
<b>Extensió final</b>	72°C	2 minuts	1
<b>Refredament/Conservació</b>	4°C	∞	1

5- Analitzar l'amplificació del cDNA corresponent al transgen mitjançant un gel d'agarosa al 1 %.

### 3.1.8. Anàlisi histològics

Per analitzar histològicament les mostres de teixit cardíac, els cors es van fixar amb formaldehid 4% durant tota la nit. Un cop fixats, els cors es van deshidratar, parafinar i seccionar al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de la Vall d'Hebron.

Alguns cors també es van submergir en una solució de sucrosa al 30% per després ser inclosos en una matriu de TFM<sup>TM</sup> (Tissue Freezing Media), en comptes de parafina. La inclusió en TFM ens permet congelar els teixits, conservar-los a -80°C i obtenir-ne talls amb un criòstat sense alterar la seva estructura. Posteriorment, es van obtenir crioseccions (d'entre 5 i 9 µm de gruix) mitjançant un criòstat (Leica CM3050 S).

#### 3.1.8.1. Tinció amb Hematoxilina-Eosina

Les crioseccions de teixit cardíac es van tenyir amb Hematoxilina/Eosina, que permet diferenciar el nucli (de color lila) i el citoplasma (de color rosat). Un cop tenyides i muntades, les mostres es van observar amb un microscopi de camp clar i es van obtenir imatges de diferents camps representatius del miocardi per analitzar.

Procediment:

1. Fixar els talls obtinguts amb el criostat amb una solució de Metanol 95% - Àcid Acètic 5% durant 2 minuts a -20°C.
2. Rentar amb aigua destil·lada durant 5 minuts i tenyir amb Hematoxilina de Harris, prèviament filtrada, durant 5 minuts. L'Hematoxilina es prepara diluint l'estoc d'Hematoxilina de Harris (7 g/L, Sigma-Aldrich) en H<sub>2</sub>O en una proporció 1/3.
3. Rentar amb aigua corrent durant 10 minuts i tenyir amb Eosina 1% durant un temps de entre 30 segons i 2 minuts.
4. Finalment, rentar amb aigua durant 10-15 minuts i muntar les mostres amb la solució de muntatge Vectamount Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories).

3.1.8.2. Tinció amb Oil Red O

Per tal de determinar la presència esteatosi cardíaca, les crioseccions de cor obtingudes van ser tenyides amb Oil Red O (Sigma-Aldrich), un colorant que tenyeix de color vermell específicament els lípids neutres. A més, les mostres es tenyeixen també amb hematoxilina per identificar els nuclis.

Procediment:

1. Fixar les crioseccions amb 4% formaldehid durant 10 minuts i rentar amb isopropanol al 60%.
2. Tenyir les crioseccions amb una solució d'Oil Red O 0,3% durant 15 minuts i rentar amb isopropanol al 60%.
3. Tenyir els nuclis amb hematoxilina durant 30 segons i rentar les mostres amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
4. Finalment, muntar les mostres amb solució de muntatge aquosa Vectamount AQ Aqueous Mounting Medium (Vector Laboratories).

## Materials i Mètodes

### 3.1.8.3. Tinció amb Lectina

Per determinar l'àrea dels cardiomiòcits, les seccions de parafina dels cors es van tenyir amb lectina conjugada amb TRITC (5/6-tetrametil-rodamina isotiocianat), el que permet marcar les glicoproteïnes de la membrana extracel·lular i poder analitzar amb més detall els contorn dels cardiomiòcits gràcies al fluorocrom incorporat. Un cop tenyides i muntades, les mostres es van observar amb un microscopi de fluorescència i es van obtenir imatges de diferents camps escollits a l'atzar per a la seva anàlisi. Es van analitzar un mínim de 4 camps de cada cor d'un total de 5 animals/grup i es va mesurar l'àrea d'aproximadament 900 cèl·lules de cada cor amb el programa ImageJ (*National Institutes of Health*).

#### Procediment:

1. Fixar les mostres amb una solució de Metanol 95% - Àcid Acètic 5% durant 2 minuts a -20°C.
2. Rentar i incubar les mostres amb Lectina conjugada amb TRITC (Sigma-Aldrich, ref. L5266) a una dilució 1/50 en PBS 1X i a T<sup>a</sup> ambient durant 15 minuts, protegint la mostra de la llum.
3. Tornar a rentar amb PBS 1X durant 5 minuts i incubar amb DAPI (7 µl/1 mL de PBS) per marcar els nuclis durant 10 minuts, protegint la mostra de la llum.
4. Per acabar, muntar les mostres i observar-les al microscopi de fluorescència amb un filtre per TRITC.

### 3.1.8.4. Mesura de l'apoptosi: detecció de caspasa 3 activa per immunohistoquímica

L'apoptosi es va determinar mitjançant immunohistoquímica fent servir anticossos policlonals de conill contra la forma activa de la caspasa 3 (Abcam, ref. Ab2302), un dels principals responsables de la condensació de la cromatina i de la fragmentació del DNA. Com a anticòs secundari es va fer servir un anticòs (anti-rabbit) de cabra conjugat amb Alexa Fluor 594 (Abcam) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Un mínim de 10 camps de cada cor, de 3-4 animals de cada grup, es van analitzar per mesurar el percentatge de cèl·lules apoptòtiques.

Procediment:

1. Fixar les crioseccions amb Metanol 95% - Àcid Acètic 5% (2 min. a -20°C) i rentar amb PBS 1X durant 5 minuts (3 vegades).
2. Permeabilitzar la mostra amb una solució de TBS (*Tris buffered saline*) 1X – Triton X-100 0,1% + Citrat de Sodi 0,1% durant 5-10 minuts i bloquejar amb Sèrum fetal boví (10%) + BSA 4% en TBS 1X durant 90 minuts a T<sup>a</sup> ambient en una cambra humida.
3. Incubar amb l'anticòs primari anti-Caspasa Activa-3(dilució 1/200)en TBS 1X + BSA 4% a 4°C en una cambra humida durant tota la nit.
4. Incubar la mostra amb TBS 1X – Triton X-100 0,1% + Citrat de Sodi 0,1% durant 5-10 minuts i després incubar amb l'anticòs secundari (Alexa 594) (dilució 1/200) en TBS 1X + BSA 4% durant 60 minuts a T<sup>a</sup> ambient i protegint la mostra de la llum.
5. RentaR amb TBS 1X 5 minuts (2 vegades) i muntar la mostra amb solució de muntatge Vectamount Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories)..
6. Les mostres s'observen amb un microscopi de fluorescència i se'n obtenen imatges de diferents camps representatius per la seva anàlisi posterior.

### **3.1.9. Anàlisi dels paràmetres serològics**

A partir de la sang obtinguda dels ratolins (veure apartat 3.1.6), es van mesurar a part dels nivells de glucosa, els nivells d'insulina, d'àcids grassos lliures, de triglicèrids i de colesterol en sèrum. La metodologia per mesurar els diferents paràmetres serològics es detalla a continuació.

#### **3.1.9.1. Anàlisi dels nivells de glucosa**

La mesura de la glucosa es va fer directament a partir d'una gota de sang fresca obtinguda de l'animal amb un glucòmetre Elite (Bayer) i tires reactives de glucosa (Bayer).



## Materials i Mètodes

### 3.1.9.2. Anàlisi dels nivells d'insulina

Els nivells d'insulina en sèrum es van determinar a partir de les mostres de sèrum mitjançant un kit d'ELISA (ALPCO Diagnostics) seguint les instruccions del fabricant.

L'índex HOMA-IR (*Homeostatic model assessment for insulin resistance*), que ens permet determinar el grau de resistència a la insulina, es va calcular amb els valors de les concentracions d'insulina i glucosa en dejú, segons la següent fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{glucosa}](\text{mg/dL}) \times [\text{insulina}](\mu\text{U/mL}) / 405$$

### 3.1.9.3. Anàlisi dels nivells d'àcids grassos lliures

Els àcids grassos lliures en sèrum es van mesurar amb el kit comercial NEFA-C (Wako Chemicals). En aquest mètode enzimàtic, l'Acil-CoA produït pels àcids grassos s'oxida generant peròxid d'hidrogen, que en presència de peroxidasa permet la condensació oxidativa de 3-metil-N-etil-N( $\beta$ -hidroxietil)-anilina (MEFA) amb 4-aminoantipirina per formar un compost de color violat que es pot mesurar colorimètricament a 546nm. L'increment en l'absorbància és directament proporcional a la concentració d'àcids grassos de la mostra. El procediment es realitza seguint les instruccions del fabricant, utilitzant àcids grassos no esterificats a 1 mmol/L com a estàndard i mesurant l'absorbància amb un espectrofotòmetre Spectra Max 340 (Molecular Devices).

### 3.1.9.4. Anàlisi dels nivells de triglicèrids

Per mesurar els triglicèrids es va fer servir el kit comercial de Far Diagnostics basat en el mètode colorimètric Trinder. En aquest mètode els triglicèrids presents en la mostra s'hidrolitzen amb lipoproteïna lipasa (LPL) per alliberar-ne el glicerol, que es transforma i s'oxida generant peròxid d'hidrogen. Aquest, en presència de peroxidasa reacciona amb etil-sulfopropil-toluidina (ESPT) i 4-aminofenazona donant lloc a un producte de color violat que pot ser mesurat colorimètricament a 550 nm. L'augment en l'absorbància és directament proporcional a la concentració de triglicèrids de la mostra. El procediment es realitza seguint les instruccions del fabricant, utilitzant triglicèrids a una concentració de 200 mg/dL com a estàndard i mesurant l'absorbància amb un espectrofotòmetre Spectra Max 340 (Molecular Devices).

### 3.1.9.5. Anàlisi dels nivells de colesterol total

Per mesurar el colesterol total es va fer servir el kit comercial de Far Diagnostics basat en el mètode colorimètric Trinder. En aquest mètode el colesterol esterificat de la mostra s'hidrolitza amb colesterol esterasa en colesterol lliure, el qual s'oxida generant peròxid d'hidrogen. Aquest, en presència de peroxidasa, reacciona amb etil-sulfopropil-toluidina (ESPT) i 4-aminofenazona donant lloc a un producte de color violat que pot ser mesurat colorimètricament a 510 nm. L'augment en l'absorbància és directament proporcional a la concentració de colesterol de la mostra. El procediment es realitza seguint les instruccions del fabricant, utilitzant colesterol a una concentració de 200 mg/dL com a estàndard i mesurant l'absorbància amb un espectrofotòmetre Spectra Max 340 (Molecular Devices).

## 3.2. Estudis *in vitro*

### 3.2.1. Línies cel·lulars

Les diferents línies cel·lulars que es van fer servir en aquest estudi es detallen a continuació:

- HEK 293T

Aquesta és una línia cel·lular derivada de ronyó embrionari humà transformat amb DNA adenoviral de tipus 5. Són cèl·lules fàcils de cultivar i transfectar, i produeixen quantitats elevades de proteïna. Van ser utilitzades per a la producció a gran escala dels vectors adenovirals utilitzats en aquest treball.

- Cre8 (293)

La línia cel·lular Cre-8 és una línia derivada de les cèl·lules HEK 293 que expressa de manera estable la recombinasa Cre, un enzim que catalitza la recombinació entre dos seqüències *loxP*. Aquesta línia es va fer servir per generar vectors adenovirals mitjançant el sistema descrit per Hardy (Hardy et al. 1997) que es basa en la recombinació homòloga entre un vector llançadora que conté el gen d'interès i el genoma modificat de l'adenovirus de serotip 5 (Psi5 o  $\psi$ 5) tal i com es descriu en a l'apartat 3.2.3.

- Cos-7

Les cèl·lules Cos-7 són una línia cel·lular derivada de ronyó de mico i obtinguda per transformació de la línia CV-1 amb el virus SV40 (Gluzman et al., 1981). En aquest treball, les cèl·lules Cos-8 van ser utilitzades per comprovar la correcta funcionalitat dels vectors d'expressió generats al nostre laboratori.

## Materials i Mètodes

- HL-1

Les cèl·lules HL-1 són una línia cel·lular que deriva de cor de ratolí, concretament de cardiomiòcits AT-1 que provenen de cèl·lules auriculars, i que van ser obtingudes d'un tumor atrial crescut en ratolins transgènics en els que es va induir l'expressió de l'antigen T llarg del SV40 de manera específica en cèl·lules cardíques mitjançant el promotor del ANF (Field 1988). És una línia cel·lular de cardiomiòcits que es poden dividir indefinidament, però tot i això mantenen el seu fenotip de cèl·lula cardíaca diferenciada i la seva activitat contràctil. Les cèl·lules HL-1 presenten un fenotip similar al dels cardiomiòcits atrials adults, amb sarcòmers necessaris per a la contracció molt organitzats i grànuls d'ANF intracel·lulars. Tot i això, mantenen un estat mitòtic característic de cardiomiòcits immadurs. Al ser cèl·lules que s'estan dividint, tenen un fenotip menys diferenciat que els cardiomiòcits madurs, amb una morfologia més similar a la dels miòcits embrionaris. En canvi, expressen la isoforma adulta de la cadena pesada de l' $\alpha$ -miosina ( $\alpha$ MHC), l' $\alpha$ -actina cardíaca, l'ANF i la conexina 43, que és la proteïna més abundant de les unions comunicants. Aquest patró d'expressió és més semblant al dels cardiomiòcits adults, al contrari dels cardiomiòcits fetals i neonatals que expressen de manera més abundant les isoformes  $\beta$ -MHC i  $\alpha$ -actina esquelètica (Claycomb et al., 1988).

Aquestes cèl·lules van ser amablement donades pel Dr. William C. Claycomb (Louisiana State University School of Medicine, New Orleans, USA).

### 3.2.2. Cultius cel·lulars

Les diferents línies cel·lulars que s'han fet servir han estat cultivades a 37°C en un incubador amb atmosfera humida al 5% de CO<sub>2</sub> segons els procediments estàndards de treball en cultiu en condicions estèrils.

El manteniment de les línies 293A, Cre-8 i Cos-7 segueix el protocol estàndard de cultius cel·lulars amb medi DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) al 10% de FBS i subcultivant les cèl·lules al 70% de confluència aproximadament. Per subcultivar aquestes cèl·lules, s'aspira el medi de la placa de cultiu de 10 cm de  $\varnothing$  (diàmetre) i es renten les cèl·lules amb 5mL de PBS 1x (*Phosphate buffered saline*). Seguidament s'afegeix 1mL de tripsina Tryple Express (Invitrogen) i es deixa incubant durant 1 minut. Finalment es resuspenen les cèl·lules de la placa i es sembren en una nova placa de cultiu a la densitat desitjada.

## 3.2.2.1. Cultiu de les cèl·lules HL-1

Les cèl·lules HL-1 es poden subcultivar contínuament i recuperar de reserves congelades sense que perdin les seves característiques de cèl·lules diferenciades ni la seva capacitat de contracció espontània. Aquestes propietats fan d'aquesta línia cel·lular una eina molt útil per estudiar la funció cardíaca, sobretot tenint en compte la dificultat d'obtenir cultius primaris de cardiomiòcits de ratolí adult.

Per tal de mantenir les seves característiques i conservar la funció contràctil, les cèl·lules HL-1 s'han de cultivar en unes condicions i un medi específics que permeti el creixement d'aquestes cèl·lules i el manteniment del seu fenotip. La formulació d'aquest medi específic, anomenat medi Claycomb, es troba definida en la Taula 3.1. Per poder mantenir aquest fenotip diferenciat, les cèl·lules HL-1 necessiten un substrat de gelatina/fibronectina, i la presència d'àcid retinoic, norepinefrina, insulina i lípids essencials en el medi (White et al., 2004).

Component	Concentració
Albúmina bovina	48,85 mg/L
Àcid retinòic	300 µg/L
Transferrina	31,8 mg/L
Fetuïna	165 mg/L
Insulina (Humana recombinant)	15 µg/L
Long R <sup>3</sup> IGF-1 (Recombinant)	0,1 µg/L
Long EGF (Recombinant)	0,1 µg/L
Amino àcids no essencials	0,1 mM
Colesterol	1,96 mg/L
Àcid linoleic	0,78 mg/L
γ-Oleil-β-pal-α-fosfatidilcolina	1,96 mg/L
Àcid ascòrbic	0,3 mM
Norepinefrina	100 µM
L-Glutamina	2 mM
Penicil·lina	100 U/mL
Estreptomicina	100 µg/mL
Sèrum Fetal Boví	10 %

Taula 3.1. Formulació del Medi Claycomb.

## Materials i Mètodes

Per al cultiu de les cèl·lules HL-1, el medi Claycomb (Sigma-Aldrich, Ref. 51800C) va ser suplementat amb 10 % de Sèrum fetal boví (Sigma-Aldrich, Ref. F2442), 100 U/mL:100 µg/mL de Penicil·lina:Estreptomicina (Sigma-Aldrich, Ref. P4333), Norepinefrina 100 µM (Sigma-Aldrich, Ref. A0937) i L-Glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, Ref. G7513).

### - Subcultiu de cèl·lules HL-1

El subcultiu de les cèl·lules HL-1 es va realitzar segons el següent procediment:

1. Primer de tot, preparar un flascó de cultiu que es deixa O/N a l'incubador amb una solució de gelatina/fibronectina.

Per preparar la solució de gelatina/fibronectina, pesar 100 mg (0,02 %) de gelatina (Sigma-Aldrich, Ref. G9391) i afegir 500 mL d' H<sub>2</sub>O estèril. Després, autoclavar la solució per dissoldre la gelatina i diluir 1 mL de fibronectina (Sigma-Aldrich, Ref. F1141) en 199 mL de gelatina al 0,02 % en condicions d'esterilitat.

Abans de cultivar les cèl·lules, cobrir la superfície de la placa de cultiu o flascó amb la solució de gelatina/fibronectina. A continuació, deixar incubant a 37°C O/N i després aspirar el contingut just abans de sembrar les cèl·lules. Aquest procés ajuda a que les cèl·lules s'adhereixin millor i mantinguin el seu fenotip diferenciat.

2. Per subcultivar les cèl·lules HL-1, afegir 1,2 mL de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, Ref. T3924) al 0,05% al flascó amb les cèl·lules en cultiu, repartint-la homogèniament, i seguidament aspirar la tripsina.
3. Tornar a afegir 1,4 mL més de tripsina-EDTA i deixar incubant 2 minuts en l'incubador a 37°C. (Observar les cèl·lules al microscopi per comprovar si s'han desenganxat. Si no, es poden ajudar a desenganxar mecànicament).
4. Per inactivar la tripsina, afegir 1,5 mL d'inhibidor de tripsina. Aquest es prepara dissolvent 25 mg d'inhibidor de tripsina (Sigma-Aldrich, Ref. T6522) en 100 mL de PBS sense Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> (Sigma-Aldrich, Ref. D8537) i a continuació es filtra amb un filtre de 0,2 µm per a mantenir-lo condicions d'esterilitat.
5. Passar les cèl·lules a un tub de centrífuga de 15 mL i rentar el flascó buit amb 5 mL de medi de rentat (Medi Claycomb amb un 5% de FBS i 1% de penicil·lina/streptomicina).

6. Seguidament, centrifugar-les cèl·lules a 1.500 rpm durant 5 minuts. Mentrestant, aspirar la solució de gelatina-fibronectina dels flascons nous i afegir-hi 4 mL de medi Claycomb suplementat.
7. Aspirar el sobrenedant del tub centrifugat i resuspendre les cèl·lules en 3 mL de medi Claycomb suplementat.
8. Finalment, afegir 1 mL de la suspensió de cèl·lules en el flascó (dilució  $\frac{1}{3}$ ).

### 3.2.2.2. Transfecció de cèl·lules Cos-7 amb Polietilenimina (PEI)

Les cèl·lules Cos-7 va ser transfectades amb el vector d'expressió pcDNA-2xFlag-hERR $\gamma$  per tal de comprovar la correcta expressió de la proteïna recombinant 2xFlag-hERR $\gamma$ , així com testar l'especificitat dels anticossos adquirits per a la detecció d'ERR $\gamma$ . La transfecció de les cèl·lules Cos-7 es va dur a terme mitjançant la PEI (Amevisa, Ref. 23966). Aquest polímer condensa el DNA en partícules carregades positivament que poden ser captades amb facilitat per les cèl·lules via endocitosi. El procés de transfecció es va fer de la següent manera:

#### *Dia 1*

1. Sembrar les cèl·lules al 80-90% de confluència i deixar que s'adhereixin a la placa durant 12 hores (O/N).

#### *Dia 2*

1. Preparar la barreja de transfecció:
  - Filtrar el NaCl 150 mM amb un filtre de 0,22 $\mu$ m en condicions d'esterilitat.
  - Afegir en un tub Eppendorf el NaCl i el DNA plasmídic segons les proporcions indicades en següent taula, i barrejar.

## Materials i Mètodes

Placa	12 pous (3,5 cm <sup>2</sup> )	10 cm Ø (56,7 cm <sup>2</sup> )
NaCl 150 mM	76 µl	1,134 mL
DNA	500 ng	5 µg
PEI 1mg/mL	3,8 µl	56,7 µl
Nº de cels.	100.000	1.500.000
Medi de cultiu	600 µl	9 mL

- Per últim, afegir el PEI sense tocar les parets del tub i barrejar.

2. Incubar la barreja de transfecció durant 15 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
3. Canviar el medi de les cèl·lules i afegir medi de cultiu fresc sense antibiòtic.
4. Afegir la barreja de transfecció al cultiu lentament i de forma homogènia.
5. Incubar durant 12-16hores (O/N) a 37°C.

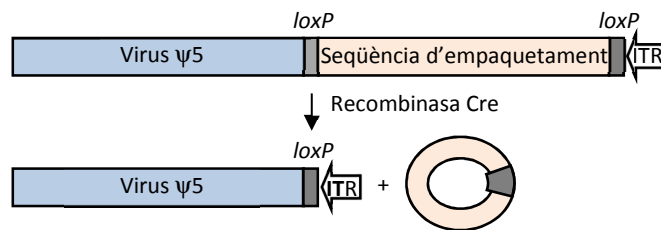
### *Dia 3*

1. Canviar el medi per medi de cultiu complet.
2. Incubar a 37°C durant 48 hores.
3. Recollir les cèl·lules desenganxant-les de la placa amb un rascador, passar-les a un tub Eppendorf i processar-les segons l'ús que se'n vulgui fer.

### **3.2.3. Generació d'un adenovirus per sobreexpressar 2xFlag-hERRY**

Els adenovirus són fàcils de produir i constitueixen una eina molt útil quan es vol introduir material genètic a dins de les cèl·lules. Tot i això, un dels principals problemes a l'hora de fer servir adenovirus és la resposta immune que desencadenen les proteïnes víriques. Aquest problema s'ha resolt eliminant gens virals del vector, el que fa que les cèl·lules transduïdes amb aquests vectors adenovirals siguin eliminades quan comencen a sintetitzar proteïnes a partir d'aquests gens virals. (Hardy et al., 1997).

A partir del bacteriòfag P1 i fent servir recombinasa Cre es va desenvolupar un mètode per crear adenovirus recombinants mitjançant la selecció negativa contra un adenovirus especial anomenat  $\psi 5$ . La recombinasa Cre és un enzim que produeix l'escissió d'un fragment de DNA flanquejat per dos llocs de reconeixement específics, els *loxP*, que són una seqüència de nucleòtids de 34 pb (ATAACTTCGTATANNNTANNNTATACGAAGTTAT). La recombinasa Cre catalitza el procés de recombinació entre els *loxP*, que es troben flanquejant la seqüència d'empaquetament de  $\psi 5$ . Al produir-se la recombinació entre aquests *loxP*, la seqüència es delecta (Figura 3.4). La construcció del virus recombinant es dona per selecció contra  $\psi 5$  mitjançant una línia cel·lular derivada de les cèl·lules empaquetadores 293T que expressa de manera estable la recombinasa Cre, anomenada Cre8. Gràcies a que la delectió de la seqüència d'empaquetament fa que el cromosoma de  $\psi 5$  no es pugui encapsidar i aquest es perdi.

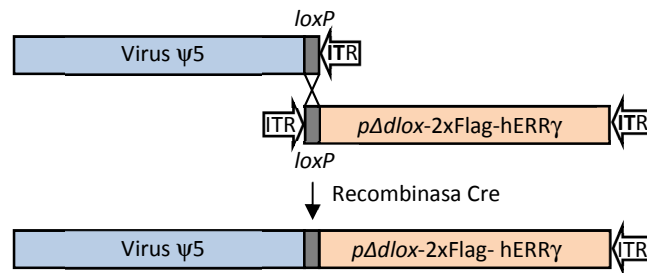


**Figura 3.4. Selecció negativa contra el virus  $\psi 5$ .** En una primera recombinació s'elimina la seqüència d'empaquetament (adaptat de Hardy et al, 1997).

Es pot fer una versió condicional d'aquesta delectió utilitzant la línia cel·lular Cre8. Mitjançant la cotransfecció en cèl·lules Cre8 de  $\psi 5$ , que s'utilitza com a virus donant, i un vector plasmídic *pΔdlox* que conté el DNA recombinant 2xFlag-hERRγ i un *loxP*, es pot generar un virus recombinant que conté 2xFlag-hERRγ en lloc dels gens vírics. En un primer pas, es produeix una recombinació entre els dos *loxP* de  $\psi 5$ , eliminant la seqüència d'empaquetament. Posteriorment, la recombinació es dona entre  $\psi 5$  i el vector *pΔdlox*, transferint els gens recombinants a  $\psi 5$  (Figura 3.5).

La producció del virus recombinant s'assegura introduint una seqüència d'empaquetament en el vector plasmídic *pΔdlox*. Aquest procediment produeix adenovirus recombinants en aproximadament 10 dies i sense, pràcticament, virus donador  $\psi 5$ , ja que aquest es redueix amb successius passos de les cèl·lules Cre8.





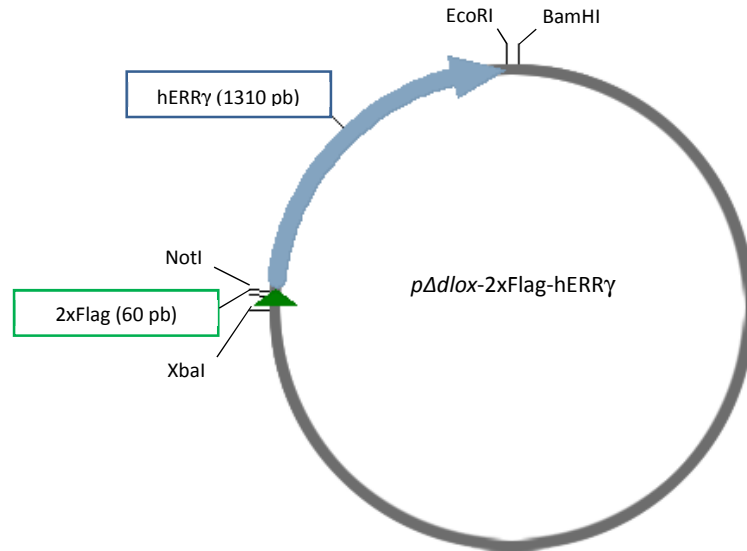
**Figura 3.5. Construcció de l'adenovirus Ad-2xFlag-hERRγ.** L'adenovirus Ad-2xFlag-hERRγ es genera mitjançant la recombinaació entre el vector llançadora *pAdlox-2xFlag-hERRγ* i el virus  $\psi$ 5 gràcies als *loxP* (adaptat de Hardy et al. 1997).

El procés de clonatge del cDNA codificant per a 2xFlag-ERRγ en *pΔdlox* es va realitzar tal i com es descriu en l'apartat següent.

### 3.2.3.1. Clonatge del gen recombinant 2xFlag-hERRγ

Per generar adenovirus que sobreexpressin un determinat gen mitjançant el sistema descrit per Hardy, aquest ha de ser clonat primer en un vector llançadora (*shuttle plasmid*) anomenat *pΔdlox* que conté dos *loxP*. Aquestes seqüències *loxP* faciliten la recombinaació amb el genoma de  $\psi$ 5 mitjançant la recombinaasa Cre.

La generació d'aquest constructe va començar per la clonació del gen que codifica per hERRγ en un vector pcDNA3.1(-) en el qual s'havia clonat prèviament el cDNA codificant per a una etiqueta 2xFlag. L'etiqueta 2xFlag es va generar al laboratori mitjançant l'anellament dels oligonucleòtids 5'-CTAGAGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGG ATTACAAGGATG ACGACGATAAGC-3' (*forward*) i 5'- CGGCCGCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTTATCGTCGTC ATCCTTGTAATCCATGGTGGCT-3' (*reverse*), amb dianes de restricció XbaI i NotI als extrems 5' i 3' respectivament. Gràcies a aquestes dianes, l'etiqueta 2xFlag van ser clonada en el lloc de clonació de pcDNA3.1(-), després de digerir l'insert i el vector amb els enzims de restricció XbaI i NotI (Figura 3.6).



**Figura 3.6. Mapa del vector *pΔdlox-2xFlag-hERRY*.** El gen que codifica per hERRY amb l'epítip 2xFlag i les dianes de restricció XbaI, NotI, EcoRI i BamHI amb les quals s'ha clonat 2xFlag-hERRY en el vector estan representades.

Seguidament, el cDNA que codifica per hERRY es va amplificar mitjançant PCR amb els primers 5'-ACTGCGGCCGCTTATGTCAAACAAAGATCGACACATTGAT-3' (*forward*) i 5'-ACTGAATTCTTAGCAGACCTTGGCCTCCAACATT-3' (*reverse*) a partir d'un plasmidi pcDNA3.1-hERRY, cedit amablement per la Dra. Kralli (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA). El fragment resultant conté les dianes de restricció NotI i EcoRI, el que va permetre clonar hERRY al plasmidi pcDNA3.1(-)-2xFlag, prèviament digerit amb NotI/EcoRI. El clonatge de hERRY al vector pcDNA3.1(-)-2xFlag es va fer de manera que el pèptid 2xFlag es traduís mantenint la pauta de lectura amb el cDNA de hERRY, i estigués situat en l'extrem amino terminal de hERRY.

Posteriorment, el plasmidi pcDNA3.1(-)-2xFlag-hERRY es va digerir amb els enzims de restricció XbaI i BamHI per obtenir-ne el DNA recombinant 2xFlag-hERRY, que seguidament es va clonar en el vector *pΔdlox* per obtenir el vector llançadora *pΔdlox-2xFlag-hERRY* amb el que generar els virus Ad-2xFlag-hERRY.

Paral·lelament, el cDNA que codifica per 2xFlag-hERRY es va amplificar mitjançant una PCR amb els primers 5'-ACTGTCGACGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGAT-3' (*forward*) i 5'-ACTGTCGACTTAGCAGACCTTGGCCTCAAACATTTTC-3' (*reverse*). El fragment resultant és un 2xFlag-hERRY que conté les dianes de restricció Sall als extrems que ens va permetre clonar-

## Materials i Mètodes

lo en el vector pBS II SK i generar el transgen per produir els animals transgènics (veure apartat 3.1.3).

### 3.2.3.2. Purificació dels fragments de DNA en gel d'agarosa

El DNA resultant de la digestió amb els enzims de restricció es va purificar mitjançant un gel d'agarosa fent servir el kit comercial Qiaex II Gel Extraction Kit de Qiagen i seguint les instruccions del fabricant.

### 3.2.3.3. Transformació de bacteris competents amb DNA plasmídic

L'objectiu de la transformació és introduir DNA a dins de bacteris competents per amplificar-lo. Generalment, els bacteris no poden incorporar material genètic exogen de forma natural, pel que necessiten d'un estímul per a que el DNA pugui ser absorbit. En el nostre laboratori, la manera d'introduir els plasmidis va ser per xoc tèrmic, el que permet que la membrana esdevingui permeable al DNA plasmídic i que els plasmidis puguin entrar en els bacteris.

#### Procediment:

1. Descongelar els bacteris competents *E. coli* de la soca DH5 $\alpha$  (Invitrogen™) en gel.
2. Afegir els bacteris competents als plasmidis en un tub Eppendorf d'1,5 mL i barrejar-los donant cops amb els dits, sense pipetejar.
3. Refredar la barreja en gel durant 30 minuts.
4. Incubar durant 1-2 minuts a 42°C.
5. Refredar en gel durant 2 minuts.
6. Afegir 950 $\mu$ L de medi LB (*Luriabroth*) sense ampicil·lina.
7. Incubar a 37°C durant 1 hora.
8. Plaquejar tot el contingut, en un ambient estèril, en una placa amb medi LB/agar + ampicil·lina (75  $\mu$ g/ml).
9. Incubar en una estufa a 37°C fins el dia següent.

### 3.2.3.4. Amplificació i purificació del plasmidi

Per amplificar el plasmidi, es va recollir una de les colònies de bacteris que van créixer en la placa de medi LB + ampicil·lina i es va fer créixer en un volum adient de medi LB + ampicil·lina segons es vulgui fer una preparació de plasmid a petita escala (Miniprep) o a gran escala (Maxiprep) i incubant en agitació a 37°C durant tota la nit. La lisi dels bacteris en condicions alcalines, ens permet recuperar els plasmidis ja que el DNA cromosòmic es desnatura mentre que el DNA plasmídic es manté estable. La purificació del plasmidi es va realitzar amb els kits comercials Plasmid Mini Kit o Plasmid Maxi Kit de Qiagen seguint les instruccions del fabricant.

### 3.2.3.5. Preparació de DNA víric $\psi$ 5 per a la preparació d'adenovirus recombinants

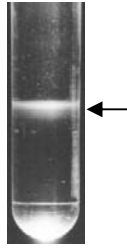
L'objectiu d'aquest procediment es purificar el DNA víric  $\psi$ 5 que es farà servir per preparar els adenovirus que sobreexpressin 2xFlag-hERRYtal i com s'ha descrit en l'apartat 3.2.3. Per això, primer es van purificar les partícules víriques per ultracentrifugació en gradient de clorur de cesi (CsCl), i a continuació es purifica el DNA mitjançant fenol/cloroform.

#### Procediment:

1. Infectar 8 o 10 plaques de 15 cm amb cèl·lules 293A al 90% de confluència amb una MOI (*multiplicity of infection*) de 2 d'adenovirus  $\psi$ 5.
2. Incubar a 37°C i recollir les cèl·lules al cap de 48h quan les cèl·lules presenten clars indicis d'infecció (les cèl·lules es tornen rodones, refringents i es desenganxen amb facilitat).
3. Centrifugar 10 minuts a 1.500 rpm (4°C) i resuspendre el *pellet* cel·lular en 10mL de medi DMEM + 10% FBS fresc.
4. Lisar les cèl·lules per alliberar les partícules víriques fent 3 cicles de congelació/descongelació amb neu carbònica i un bany a 37°C.
5. Centrifugar 10 minuts a 5.000g (4°C) i recuperar el sobrenedant que conté les partícules víriques.
6. Afegir 0,5g de CsCl per cada mL de lisat, barrejar i centrifugar O/N a 35.000 rpm (4°C) en una ultracentrífuga.

## Materials i Mètodes

7. Aturar el rotor sense frenar i recollir la banda vírica punxant el tub de centrifugació amb una xeringa. El virus es veu com una banda difuminada com la de la imatge:



8. Dialitzar el virus O/N amb una membrana de diàlisi d'un diàmetre de porus de 10 nm en tampó Tris-EDTA (TE) (4°C) per tal d'eliminar l'excés de CsCl.
9. Recuperar el virus dialitzat i digerir 1 hora a 37°C amb proteïnasa K (5mg/mL) per tal d'alliberar el DNA.
10. Extreure el DNA amb Fenol/Cloroform:
  - 1) Afegir un volum de fenol saturat en tampó TE i centrifugar 10 minuts a 12.000 rpm. Recuperar la fase aquosa que conté el DNA.
  - 2) Afegir un volum de fenol/cloroform (1:1) i centrifugar 10 minuts a 12.000 rpm. Recuperar la fase aquosa.
  - 3) Afegir un volum de cloroform i centrifugar 10 minuts a 12.000 rpm. Recuperar la fase aquosa.
11. Precipitar el DNA amb 2 volums d'etanol 100% + 0,1 volum d'acetat de sodi 3M (pH=5,5). Incubar 1 hora a -80°C per facilitar la precipitació del DNA.
12. Centrifugar 15 minuts a 12.000 rpm i rentar dos cops el *pellet* de DNA amb etanol al 70%.
13. Deixar assecar el *pellet* i resuspendre el DNA en tampó TE.

### 3.2.3.6. Transfecció de cèl·lules Cre8 amb fosfat càlcic.

Les cèl·lules Cre-8 es van utilitzar per a generar un vector adenoviral que permeti la sobreexpressió de la proteïna 2xFlag-hERRY en el nostre model cel·lular desitjat. En aquest

procediment, es cotransfecten simultàniament el DNA víric  $\psi 5$  amb el vector llançadora *p $\Delta$ dlox-2xFlag-hERR $\gamma$*  en cèl·lules Cre8. En aquetes cèl·lules, que expressen de forma estable la recombinasa Cre, es produirà la recombinació entre el genoma viral i el vector llançadora, generant els adenovirus recombinants que incorporen el gen 2xFlag-hERR $\gamma$ . El mètode que hem fet servir per introduir el material genètic a l'interior de les cèl·lules per generar els adenovirus ha estat la transfecció amb fosfat de calci. La raó per fer servir aquest mètode, basat en la precipitació del fosfat de calci amb el DNA que serà captat per la cèl·lula, és que és un mètode molt senzill i poc costós que amb una eficiència de transfecció bastant bona en aquest tipus cel·lular.

### Procediment:

1. Preparar una barreja amb 5  $\mu$ g del plasmidi *p $\Delta$ dlox-2xFlag-hERR $\gamma$* , 1,5  $\mu$ g de DNA víric  $\psi 5$ , 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 2,5M i H<sub>2</sub>O fins a un volum final de 450  $\mu$ L.
2. Afegir 500  $\mu$ L de HBS 2x (HEPES Buffered Saline: HEPES 42 mM; NaCl 274mM; KCl 10 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,4 mM; D-glucosa 15 mM; pH 7,05) i deixar reposar a T<sup>a</sup> ambient durant 5-15 minuts per facilitar la formació de complexos DNA-fosfat càlcic. Observar al microscopi si la formació de precipitats és correcte.
3. Afegir lentament la barreja al cultiu cel·lular en una placa de 6 cm amb 2,8x10<sup>6</sup> cèl·lules i deixar incubant durant 4 hores a 37°C.
4. Rentar suauament dues vegades amb PBS i afegir 10 mL de medi complert (DMEM + 10%FBS + antibiòtics/antimicòtics)
5. Canviar el medi cada 2 dies fins a que apareguin els primers signes de la presència de partícules víriques.
6. Al cap de, com a molt, 10 dies (normalment 4-6) apareixen petites regions en algunes zones de la placa on les cèl·lules mostren clars signes citopàtics (les cèl·lules es tornen rodones i es desenganxen, i podem veure "calbes" de lisi al cultiu). Aquestes "calbes" s'originen com a conseqüència de la replicació del virus recombinant que acaba lisant les cèl·lules.
7. Recol·lectar les cèl·lules pipetejant suauament i recollir el medi en un tub.
8. Centrifugar durant 10 minuts a 1.100 rpm i a 4°C.
9. Aspirar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* cel·lular en un petit volum de medi (50-100  $\mu$ L) per després congelar a -80°C.

## Materials i Mètodes

10. Per lisar les cèl·lules i alliberar els virus fem 3 cicles de congelació/descongelació ràpida fent servir neu carbònica i un bany a 37°C. Centrifuguem 10 minuts a 13.000 rpm per eliminar les restes cel·lulars i recuperem el sobrenedant on es troben els virus. Aquest estoc víric es farà servir per a fer preparacions d'adenovirus a gran escala.

### 3.2.3.7. Amplificació i preparació d'adenovirus per als experiments d'infecció

#### Procediment:

1. Infectar 10 plaques de 15 cm Ø de cèl·lules HEK 293T o CRE8 que contenen  $3 \times 10^6$  cèl·lules/placa amb una MOI de 2 del virus Ad-2xFlag-hERRY.
2. Quan les cèl·lules portin dos dies infectades i la gran majoria mostrin clarament característiques citopàtiques, recol·lectar-les i centrifugar durant 10 minuts a 1.200 rpm.
3. Resuspendre el *pellet* en 5mL de medi fresc (DMEM + 10%FBS) i realitzar tres cicles de congelació/descongelació per alliberar les partícules víriques.
4. Centrifugar el lisat durant 10 minuts a 4.000 g a 4°C i recuperar el sobrenedant, que conté els virus.
5. Aliquotar els virus i congelar a -80°C.

### 3.2.3.8. Titulació dels adenovirus

Per tal de valorar els virus obtinguts i conèixer la quantitat d'unitats formadores de plaques (pfu) vam fer servir el kit comercial de determinació de la càrrega viral Stratagene AdEasy Viral Titer Kit (Agilent Technologies). Aquest mètode es basa en la detecció immunocitoquímica d'una proteïna vírica de la càpsida anomenada hexon, necessària per la replicació adenoviral, en cèl·lules que han estat infectades amb dilucions seriades de la nostra preparació de virus. L'expressió de la proteïna hexon es detectada mitjançant un anticòs anti-hexon. Seguidament, s'utilitza un anticòs secundari conjugat amb HRP (*horseradish peroxidase*) per amplificar la senyal. L'enzim HRP catalitza la reacció colorimètrica amb el substrat DAB (diaminobencidina), que dóna lloc a precipitats de color fosc en les cèl·lules que expressen la proteïna hexon, és a dir, les cèl·lules infectades. Aquest

kit ens permet quantificar la concentració de virus viables, és a dir amb capacitat infectiva. La titulació de les preparacions víriques es fa realitzar seguint les indicacions del fabricant.

### 3.2.4. Transducció de cèl·lules amb vectors adenovirals.

Per tal d'estudiar els efectes que té la sobreexpressió d'hERR $\gamma$  en cardiomiòcits, es van transduir cèl·lules HL-1 amb adenovirus Ad-2xFlag-hERR $\gamma$  que sobreexpressen la proteïna 2xFlag-hERR $\gamma$ . Els adenovirus Ad- $\beta$ Gal, que sobreexpressen la proteïna  $\beta$ -galactosidasa, es van fer servir com a control. Les cèl·lules es van infectar en postconfluència amb una MOI de 100 i després es van incubar a 37°C per, al cap de 48 hores, recollir les cèl·lules i obtenir-ne les proteïnes i el RNA. Per calcular el volum de virus a utilitzar es va fer servir la següent fórmula:

$$\text{Volum} = n^{\circ} \text{ cèl·lules} \times (\text{MOI/cèl·lula}) \times (1000 \mu\text{l/pfu})$$

#### 3.2.4.1. Tinció amb X-Gal

Per tal de determinar l'eficiència de la infecció de les cèl·lules HL-1, aquestes es van infectar amb l'adenovirus Ad- $\beta$ Gal que permet la sobreexpressió de la proteïna  $\beta$ -galactosidasa. La  $\beta$ -galactosidasa és un enzim que catalitza la hidròlisi de galactòsids a monosacàrids. En el nostre cas es va utilitzar X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosid) com a substrat, el qual es descomposa per l'enzim  $\beta$ -galactosidasa a galactosa i 5-bromo-4-cloro-3-hydroxyindol. Aquest últim dimeritza i s'oxida per formar 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, un producte insoluble de color blau.

L'adenovirus Ad- $\beta$ Gal va ser cedit gentilmente per la Dr. Kralli (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA). Les cèl·lules es van infectar amb una MOI de 10, 100 i 200 tal i com s'ha descrit en apartats anteriors. El procediment de tinció de les cèl·lules amb X-Gal és el següent:

1. Infectar les cèl·lules HL-1. Incubar a 37°C durant 48 hores.
2. Descartar el medi de cultiu i fixar les cèl·lules amb 0,05% glutaraldehid en PBS.
3. Incubar 10 minuts a T<sup>a</sup> ambient.
4. Preparar i afegir la solució de tinció (protegir de la llum):



## Materials i Mètodes

Solució Stock	Per 1 mL	Per 10 mL	Per 12 mL	Concentració Final
PBS 1x	820 µL	8,2 mL	9,84 mL	
MgSO <sub>4</sub> 100mM	20 µL	200 µL	240 µL	2mM
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 500mM	70 µL	700 µL	840 µL	35mM
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 500mM	70 µL	700 µL	840 µL	35mM
X-Gal 50mg/mL*	20 µL	200 µL	240 µL	1mg/mL

5. Descartar la solució de fixació i rentar tres cops amb PBS 1x (un rentat ràpid, seguit d'un rentat de 10 minuts, i un altre rentat ràpid per acabar).
6. Afegir la solució de tinció i incubar durant al menys 1 hora a 37°C o O/N a T<sup>a</sup> ambient. La reacció produeix uns precipitats de color blau característics en les cèl·lules que expressen la  $\beta$ -galactosidasa.

### 3.3. Anàlisi de l'expressió gènica

#### 3.3.1. Extracció de RNA

Un aspecte important a tenir en compte quan es treballa amb RNA és mantenir la seva integritat. Per aquest motiu, tots aquells procediments que s'han fet servir per treballar amb RNA utilitzen reactius i materials lliures de RNases.

Un dels mètodes més freqüentment utilitzat per inhibir les RNases de l'aigua, els tampons i altres solucions és el tractament amb dietilpirocarbonat (DEPC), que actua com un inhibidor irreversible de l'activitat enzimàtica de les RNases modificant els seus grups -NH, -SH i -OH. Un cop realitzat el tractament, s'ha de destruir el DEPC per calor, ja que és altament tòxic i a més pot reaccionar amb el RNA.

Per fer les extraccions de RNA es va fer servir el reactiu TRIzol® (Invitrogen™), que és una solució monofàsica de fenol i isocianat de guanidina que manté íntegre el RNA inhibint l'activitat de les RNases, i que alhora ajuda a disgregar les cèl·lules.

### 3.3.1.1. Extracció de RNA de teixits

Procediment:

1. Homogeneïtzar el teixit en 1 mL de TRIzol® per cada 50-100 mg de teixit fent servir un homogeneïtzador (Ultra-Turrax IKA T25).
2. Passar l'homogeneïtzat a un tub Eppendorf i afegir 200µL de cloroform per cada 1 mL de TRIzol® utilitzat.
3. Barrejar amb el vòrtex durant uns 10 segons fins que la barreja aconseguixi un aspecte homogeni.
4. Incubar 2 minuts a Tª ambient i centrifugar 20 minuts a 12.000 rpm a 4°C.
5. Transferir la fase superior aquosa que conté el RNA a un tub nou i afegir 500µL d'alcohol isopropílic per cada 1 mL de TRIzol®.
6. Barrejar amb el vòrtex i centrifugar 10 minuts a 12.000 rpm i 4°C.
7. Descartar el sobrenedant i rentar el *pellet* de RNA amb 1 mL d'etanol al 75% per cada 1 mL de TRIzol®.
8. Barrejar amb el vòrtex i centrifugar 5 minuts a 9.500 rpm i 4°C.
9. Descartar el sobrenedant i assecar el *pellet* de RNA.
10. Resuspendre el *pellet* de RNA amb H<sub>2</sub>O DEPC.
11. Incubar durant 10 minuts a 55-60°C barrejant amb el vòrtex freqüentment per a permetre la completa dissolució del RNA.

### 3.3.1.2. Extracció de RNA de cèl·lules en cultiu

Les cèl·lules es van recollir afegint 500 µL de TRIzol® i desenganxant-les de la placa pipetejant o amb l'ajut d'un rascador. Seguidament, es va passar el lisat a un tub Eppendorf de 1,5 mL per continuar amb el procediment d'extracció. En el nostre cas vam fer servir el kit comercial Rneasy® Mini Kit de Qiagen©, seguint les instruccions del fabricant.

Procediment:

1. Afegir 100 µL de cloroform per cada 500 µL de TRIzol i barrejar amb el vòrtex durant uns 10 segons fins que la barreja aconseguixi un aspecte homogeni.

## Materials i Mètodes

2. Incubar 2 minuts a T<sup>a</sup> ambient i centrifugar 20 minuts a 12.000 rpm i 4°C.
3. Transferir la fase superior aquosa que conté el RNA a un tub nou i afegir 1 volum d'etanol al 70%. Barrejar amb el vòrtex.
4. Transferir la mostra a una columna del kit disposada en un tub de 2 mL.
5. Centrifugar durant 15 segons a 9.000 rpm i descartar el sobrenedant.
6. Afegir 700 µL de Buffer RW1 a la columna.
7. Centrifugar durant 15 segons a 9.000 rpm i descartar el sobrenedant.
8. Afegir 500 µL de Buffer RPE a la columna.
9. Centrifugar durant 15 segons a 9.000 rpm i descartar el sobrenedant.
10. Afegir 500 µL de Buffer RPE a la columna.
11. Centrifugar durant 2 minuts a 9.000 rpm.
12. Posar la columna en un tub nou de 2 mL i centrifugar a 13.000 rpm durant 1 minut.
13. Col·locar la columna en un tub Eppendorf nou de 1,5 mL.
14. Afegir 30 µL de H<sub>2</sub>O DEPC a la columna i centrifugar a 10.000 rpm durant 1 minut.

### 3.3.2. Quantificació i determinació de la qualitat del RNA

Un cop s'ha aïllat el RNA, la seva concentració es va determinar mesurant l'absorbància amb un espectrofotòmetre NanoDrop ND-2000, que permet mesurar la quantitat de RNA present en una mostra amb una petita quantitat d'aquesta (2µL). La densitat òptica a 260 nm ens permet determinar la concentració de RNA, tenint en compte que una A<sub>260</sub> (Absorbància a 260 nm) de 1 equival a 40 µg/mL de RNA.

Per determinar la puresa del RNA s'utilitza el ràtio de les absorbàncies a 260 i 280 nm (260/280). EL RNA es considera "pur" quan el ràtio és d'aproximadament 2. Si el ràtio és inferior a 2, pot indicar la presència de proteïnes, fenols o altres contaminants que absorbeixen a 280 nm. Per als nostres experiments, vam considerar que les mostres de RNA eren òptimes quan el ràtio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> fou superior a 1,8.

A partir d'una alíquota de les mostres de RNA es va determinar la integritat del RNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. 400 ng de la mostra es van córrer en un gel d'agarosa al 1,2% tenyit amb bromur d'etidi en tampó TAE, suficients per observar el patró de migració del RNA. Si el RNA no està degradat, les bandes corresponents a el RNAt, el RNAr 28S i el RNAr 18S es poden identificar, tal i com s'indica a la Figura 3.7.

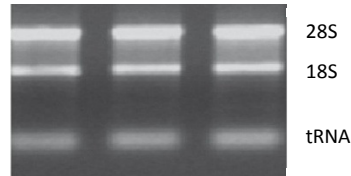


Figura 3.7. Electroforesi en gel d'agarosa de mostres de RNA.

### 3.3.3. Anàlisi dels perfils d'expressió gènica mitjançant microarrays de DNA de cors de ratolins diabètics

Per poder determinar els nivells d'expressió de milers de gens, es va realitzar una anàlisi d'expressió amb microarrays (o xip) de DNA. El funcionament dels microarrays es basa en la hibridació entre dos brins de DNA, i la intensitat del senyal dependrà de la quantitat de mostra que s'uneixi. És a dir, bàsicament el que es mesura és la quantitat d'hibridació que es produeix entre una sonda específica present al microarray i la seva diana present en la mostra, i quant més gran és l'expressió d'un determinat gen a la mostra, major és el senyal obtingut.

En el nostre estudi, les anàlisis amb microarrays es van fer servir per comparar els nivells d'expressió gènica a cor entre ratolins diabètics db/db (n=4) i ratolins control db/+ (n=4) de 12 setmanes d'edat. EL RNA dels cors es va aïllar tal i com s'indica a l'apartat 3.3.1.1. A partir d'aquest RNA es va sintetitzar DNA d'una sola cadena mitjançant el kit *Ambion WT Expression* (Life Technologies). Després, aquests brins de DNA es van fragmentar i es van marcar amb biotina, pel que es va utilitzar el kit *Terminal Labelling* (Affymetrix), per posteriorment ser hibridats amb els microarrays *Mouse Gene 1.0 ST* (Affymetrix). Aquests microarrays es basen en el marcatge d'un sol color, i l'ús d'oligonucleòtids de 25 bases com a sonda. La hibridació es va realitzar amb el kit *Hybridization Control* (Affymetrix) seguint les instruccions del fabricant. Finalment, el microarray es va tenyir amb un conjugat d'estreptavidina/ficoeritrina, es va escanejar i les imatges obtingudes es va analitzar amb el programa *Microarray Analysis Suite 5.0*.

## Materials i Mètodes

La síntesi, la fragmentació, el marcatge i la hibridació del DNA es va dur a terme a la Unitat d'Alta Tecnologia (UAT) de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron. L'anàlisi de les dades es va dur a terme per la Unitat d'Estadística i Bioinformàtica de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron amb el programa Bioconductor per generar la llista de gens alterats significativament al cor diabètic. L'anàlisi dels perfils genètics es va realitzar mitjançant l'eina bioinformàtica DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) que ens ajuda a interpretar els resultats dels microarrays (Huang et al., 2009). DAVID és un programa que consisteix en un base de dades i unes eines que ens permeten recopilar agrupar i extreure informació de gens de bases de dades públiques. D'aquesta manera el gens es poden classificar segons el compartiment cel·lular on pertanyen, el procés biològic en el que participen i la funció que tenen. Per identificar els potencials reguladors transcripcionals responsables dels perfils genètics observats als cors diabètics, es van analitzar els factors de transcripció amb el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems Inc.). El programa IPA es permet predir les interaccions que es donen entre els factors de transcripció i els gens que es troben diferencialment expressats en la mostra a partir de dades que han estat validades i contrastades prèviament d'informació obtinguda de publicacions i bases de dades.

### 3.3.4. Mesura de l'expressió gènica mitjançant PCR quantitativa en temps real

L'expressió gènica en els models diabètics, els ratolins transgènics TghERRγ, les cèl·lules infectades amb adenovirus Ad-2xFlag-hERRγ i els respectius controls es va mesurar mitjançant PCR quantitativa en temps real (RT-qPCR), tal i com s'indica a continuació:

#### 3.3.4.1. Transcripció inversa

Per poder ser amplificat per PCR, el RNA ha de ser transcrit inversament (retrotranscripció) a cDNA. EL cDNA és, com el seu nom indica, un DNA d'una sola cadena complementari al RNA que fa de patró, i que es sintetitza gràcies a un enzim anomenat transcriptasa reversa. En el nostre laboratori vam fer servir el kit comercial *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), que fa servir encebadors d'oligo(dT) per sintetitzar el cDNA a partir de RNA.

#### Procediment:

1. Preparar una barreja per a la reacció de desnaturalització:

Component	Quantitat
RNA (200 ng/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
OligodT (500 $\mu$ g/mL)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O DEPC	9,75 $\mu$ L

1. Afegir la barreja en tubs de PCR i incubar en un termociclador durant 10minuts a 65°C. D'aquesta manera s'elimina l'estructura secundària del RNA.
3. Preparar una altra barreja per a la reacció de retro-transcripció:

Component	Quantitat
Buffer 5x	4 $\mu$ l
DTT (Ditiotreitol) 0,1M	2 $\mu$ l
dNTPs mix 10mM	1 $\mu$ l
Super Script II RT	0,25 $\mu$ l

4. Afegir la barreja als tubs de PCR que conté el RNA desnaturalitzat i l'oligo-dT
5. Incubar en el termociclador:

Procés	Temperatura	Temps
Elongació	42°C	50 minuts
Inactivació	70°C	15 minuts

6. En acabar, es refreda a 4°C i s'afegeixen 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC per diluir la mostra, que es guardarà a -20°C.

#### 3.3.4.2. PCR quantitativa en temps real

La RT-qPCR és el mètode que es va fer servir per amplificar el cDNA resultant de la transcripció inversa del RNA missatger (mRNA) i poder mesurar els nivells d'expressió gènica. Per quantificar aquest DNA vam fer servir primers específics per a cada gen i una sonda fluorescent anomenada SYBR® Green que s'uneix a la doble cadena de DNA i ens permet mesurar l'augment en la fluorescència que es produeix amb els cicles de la reacció a mida que s'amplifica el DNA. La llista de primers que s'han fet servir es troba detallada a la Taula

## Materials i Mètodes

3.2. Tot el procés de la RT-qPCR, incloent la mesura de la fluorescència, es va dur a terme amb el Sistema de Detecció ABI PRISM 7500 de Applied Biosystems™. La quantificació es va realitzar de manera relativa mitjançant el mètode del 2-DDCt (Livak i Schmittgen 1969) utilitzant el gen de la peptidil-propil isomerasa A (Ciclofilina A) com a gen de referència.

### Procediment:

1. Preparar una barreja de reacció per a la determinació de cada gen:

Components	Volum	Concentració final
Mix SYBR Green 2x	10µL	1x
Primer <i>Forward</i> (10µM)	1 µL	0,5 µM
Primer <i>Reverse</i> (10µM)	1 µL	0,5 µM
H <sub>2</sub> O DEPC	6 µL	

2. Carregar les mostres en una placa de 96 pous afegint 18 µL de la barreja i 2 µL del cDNA obtingut, tal i com s'explica a l'apartat 3.4.4.1.
3. Cobrir la placa amb un *film* especial per a que quedi ben segellada i col·locar-la en un termociclador 7500 Real-time PCR (Applied Biosystems™), on la reacció de PCR es realitza amb les següents condicions:

Procés	Temperatura	Temps	Nº de cicles
Activació/Desnaturalització inicial	50°C	2 minuts	1
Activació de la polimerasa	95°C	10 minuts	1
Desnaturalització	95°C	20 segons	40
Anellament	60°C	20 segons	
Extensió	72°C	34 segons	
Corba de dissociació	95°C	15 segons	1
	60°C	1 minut	
	ΔT <sup>a</sup>	+0.2°C/segon	
	95°C	15 segons	
Refredament/Conservació	4°C	∞	1

- Oligonucleòtids per la RT-qPCR:

Els primers que es van fer servir per la RT-qPCR compleixen una sèrie de característiques per obtenir unes condicions d'amplificació òptimes i assegurar l'eficiència i especificitat de la RT-

qPCR. D'aquesta manera, es van tenir en compte una sèrie de paràmetres que es detallen a continuació:

- Longitud dels oligonucleòtids (nombre de bases): 18-24 pb.
- Temperatura de dissociació (Td) dels oligonucleòtids:  $67 \pm 2$  °C.
- L'extrem 3' del oligonucleòtids ha d'acabar amb C o G.
- Els oligonucleòtids *forward* i *reverse* pel mateix gen han d'estar en diferents exons, per detectar la possible amplificació de DNA genòmic.
- L'amplitud de l'amplicó ha de ser de 50-250 pb.

L'especificitat dels oligonucleòtids es va comprovar amb un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), per verificar que les seqüències són específiques del gen que es vol amplificar.

Alguns dels oligonucleòtids ja estaven dissenyats i estaven disponibles al nostre laboratori. D'altres es van haver de dissenyar fent servir diferents programes (Oligo 4.0 o Primer3Plus) en base a les característiques esmentades anteriorment. En altres casos, les seqüències es van obtenir de bases de dades Primer Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Els oligonucleòtids van ser sintetitzats per Invitrogen™ o Sigma-Aldrich®.

Gen	Nom del gen	Forward	Reverse
<i>ACAA2</i>	Acetyl-CoAAcyltransferase 2	TGTGTCAGAAATGTGCGCTT C	CAAGGCGTATCTGTCACAGT C
<i>ACADL</i>	Acyl-CoADehydrogenase, Long Chain	GTGGAAAACGGAATGAAAGG A	GAACTCACAGGCAGAAATCG C
<i>ACADM</i>	Acyl-CoADehydrogenase, MediumChain	AAGCCACGAAGTATGCCCTG	CCATAGCCTCCGAAAATCTG
<i>ACADS</i>	Acyl-CoADehydrogenase, Short Chain	TCACGCTGGGCAAGAAGGAA G	GCATTGCGGTTCTCGGCATA C
<i>ACADVL</i>	Acyl-CoADehydrogenase, Very Long Chain	CCAGATAGAAGCCGCCATCA G	ACTCAAACCACTGCCGATTC C
<i>ACO2</i>	Aconitase 2, Mitochondrial	TCTCTAACACCTGCTCATC GG	TCATCTCCAATCACCACCCA CC
<i>ACOT1</i>	Acyl-CoAThioesterase 1	GGCGATTGGTCAAGCGCGAC	GGAAAGGGTCCAGGTTCTGG GG
<i>ACSM5</i>	Acyl-CoASynthetaseMedium-ChainFamilyMember 5	GGGCCAAGTCTATCGTCACC	GACTGGGAATGTCCACCAT C
<i>ACTA1</i>	Actin, Alpha 1, Skeletal Muscle	TCACTGAGCGTGGCTATTCC	TGGCCATCTCATTCTCGAAG
<i>AGPAT3</i>	1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 3	TTTGTGGGTGGACGATGTGC	CCGTTTGAGAATACGATCT CT



## Materials i Mètodes

<i>AGT</i>	Angiotensinogen (Serpine Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 8)	ACCCCCGAGTGGGAGAGGTT C	GCGAACAGGAAGGGGCTGCT C
<i>ANGPTL4</i>	Angiopoietin-Like 4	CACGCACCTAGACAATGGA	AGAGGCTGGATCTGAAAA
<i>ATP5B</i>	ATP Synthase, H+ Transporting, Mitochondrial F1 Complex, Beta Polypeptide	GCAAGGCAGGGACAGCAGA	CCCAAGGTCTCAGACCAAC A
<i>CAT</i>	Catalase	TGGCACACTTTGACAGAGAG C	CCTTTGCCTTGGAGTATCTG G
<i>COX4I1</i>	Cytochrome C Oxidase Subunit IV Isoform 1	CCATGTCACGATGCTGTCTG	GATGCGGTACAACCTGAACTT TCT
<i>COX4I2</i>	Cytochrome C Oxidase Subunit IV Isoform 2 (Lung)	CTGCCCGGAGTCTGGTAATG	CGTAGCAGTCAACGTAGGGG
<i>COX6B2</i>	Cytochrome C Oxidase Subunit VIb Polypeptide 2 (Testis)	ACTTGGATGTTGGGTGTTCA A	ACCGGTGGTAGTCCAGAAAA T
<i>COX8B</i>	Cytochrome C Oxidase Subunit VIIIb, Pseudogene	CGAAGTTCACAGTGGTTCCC	TCTCCAAGTGGGCTAAGACC
<i>CPT1A</i>	CRN Aitine Palmitoyltransferase 1A (Liver)	TCGTGGTGGTGGGTGTGATA	ATGTTCTTCGTCTGGCTTGA CAT
<i>CPT1B</i>	CRN Aitine Palmitoyltransferase 1B (Muscle)	TCTAGGCAATGCCGTTTCCAC	GAGCACATGGGCACCATAC
<i>CYCS</i>	Cytochrome C, Somatic	CACGGCTCTCCCTTTCTCAA G	ACAGTTGCCTCTGGTGGTT A
<i>DAG1</i>	Dystroglycan 1 (Dystrophin-Associated Glycoprotein 1)	GAGTGAGCATTTCCAACGGAT T	AGTGTAGCCAAGACGGTAAG G
<i>ECH1</i>	Enoyl-CoA Hydratase 1, Peroxisomal	GCTACCGCGATGACAGTTTC	GCTCAGAGATCGAAGGCTGA TG
<i>EHHADH</i>	Enoyl-CoA, Hydratase/3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase	ATGGCTGAGTATCTGAGGCT G	ACCGTATGGTCCAAACTAGC TT
<i>ELOVL5</i>	ELOVL Fatty Acid Elongase 5	CAGATCACCGTGCTCCATGT C	CTGTTGAGTGTGCGACCAAAA C
<i>hESRRA</i>	Estrogen-Related Receptor Alpha (Human)	CCGTGGCTACCCTCTGTGAC C	ACACCCAGCACCAGCACCTC C
<i>mESRRA</i>	Estrogen-Related Receptor Alpha (Mouse)	GGAGGACGGCAGAAGTACAA A	GCGACACCAGAGCGTTTCCAC
<i>hESRRB</i>	Estrogen-Related Receptor Beta (Human)	AAGGCCCTGACCACTCTCTG T	GATGCCCAGGATGAGGATTT C
<i>mESRRB</i>	Estrogen-Related Receptor Beta (Mouse)	CCGGCCACCAATGAATGT	ATCCAGCCGTCGCTTGTACT
<i>hESRRG</i>	Estrogen-Related Receptor Gamma (Human)	GGTTCAGCCAGCCAAAAAGC C	CAGGGACAGCGTGGAGAAGC C
<i>mESRRG</i>	Estrogen-Related Receptor Gamma (Mouse)	TCCCCGACAGTGACATCAAA	GTGTGGAGAAGCCTGGAATA
<i>FABP3</i>	Fatty Acid Binding Protein 3, Muscle And Heart	GGAATAGAGTTCGACGAGGT GA	CTCCCTAGTTAGTGTGTCT CCT
<i>FBP2</i>	Fatty Acid Binding Protein 2, Intestinal	TTTCGGGGAGCGTGAATGTG	AGGCAGTCAATGTTGAAGA TCC
<i>GCK</i>	Glucokinase (Hexokinase 4)	AGGAGGCCAGTGTAAGATG T	CTCCAGGTCTAAGGAGAGA AA

<i>HADHA</i>	Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase/3-Ketoacyl-CoA Thiolase/Enoyl-CoA Hydratase (Trifunctional Protein), Alpha Subunit	GTGTTTGAGGACCTCGGTGT A	GTGTCCTTGAGGTTTTGT C
<i>HMGC2</i>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase (Mitochondrial)	GGCTGTCAAACAGTGCTCA	GCAATGTACCACAGACCAC
<i>LIPE</i>	Lipase, Hormone-Sensitive	AAGAGGCCAGGGAGGCCTC AG	TCCAGCCCAGTGCCTGTTC C
<i>MLYCD</i>	Malonyl-CoA Decarboxylase	GAAAACTGGATGGACATGA AGC	CTCTCCTCGGTTTCAGTCGG
<i>MYH7</i>	Myosin, Heavy Chain 7, Cardiac Muscle, Beta	GCTACGCTTCTGGATGATC T	CCTCTTAGTGTGACAGTCT TCC
<i>MYL7</i>	Myosin, Light Chain 7, Regulatory	GCAGGCACAACGTGGCTCTT C	CAGCATGGCGTCCAGCTCTT C
<i>MYOM2</i>	Myomesin 2	CGGTCTCAAGCGGCTTCTTA CG	CCACCGCAGCATTGGTAGAC AC
<i>NDUFA4</i>	NDUFA4, Mitochondrial Complex Associated	CTGGAGCAGCACTGTATGTG A	CTGGGCCTTCTTCTTCAGT T
<i>NPPA</i>	Natriuretic Peptide A	CTGGGCTTCTTCTCGTCTT G	CCCTGCTTCTCAGTCTGCT C
<i>NPPB</i>	Natriuretic Peptide B	GTCGTTTGGGCTGTAACGCA CT	TGGTCCCAGAGCTGGGAAAA GA
<i>PDK4</i>	Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isozyme 4	GTTCCTTACACCTTCACCAC	CCTCCTCGGTCAGAAATCTT G
<i>PECI</i>	Enoyl-CoA Delta Isomerase 2	CCCTTCTGGGACTATTTGAT GC	CTTCGGAAACGTGTAAGAGG AG
<i>PFKFB2</i>	6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 2	CTAGAGCGTCAAGGCAACAT C	CAACCATAGGCCACAGGAGT A
<i>PGC1A</i>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha	GGAGCCGTGACCACTGACA	TGGTTTGCTGCATGGTTCTG
<i>PGC1B</i>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha	AGTGGGTGCGGAGACACAGA TG	GTATGGAGGTGTTGGTGGGTG GC
<i>PPARA</i>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha	AAGGCTATCCCAGGCTTTGC	TTTAGAAGGCCAGGCCGATC TC
<i>SCD4</i>	Stearoyl-CoA Desaturase 4	CAGTGGGCTCTGGACTCAAC GC	ATCCTGTGTCTCCGGGAGT G
<i>SLC27A1</i>	Solute Carrier Family (Fatty Acid Transporter), Member 1	AGGGACCCACCAGCTAGGCC	CAGGAGCCCGCATCCTGTGC
<i>TPM3</i>	Tropomyosin 3	AGAGGATGAACTAGCAACCA TGC	CTTCCGAATACTGTCCAGC TC
<i>TPM4</i>	Tropomyosin 4	TGCAGCAGCAGGCAGACGAC	TCCAGCAGTTGGATGCGGCG
<i>TTN</i>	Titin	CCAGGCCCTCAAACAACC	CCATTACCAACTCACAT CAC

## Materials i Mètodes

UCP2	UncouplingProtein (Mitochondrial, ProtonCarrier)	2	GCATTGGCCTCTACGACTCT G	AGCGGACCTTTACCACATCT G
	UCP3 (Mitochondrial, ProtonCarrier)	3	ACAGAGGGACTATGGATGCC T	TGATGTCGTAGGTCACCATC T

Taula 3.2. Llistat de oligonucleòtids utilitzats en les RT-qPCR.

### 3.4. Anàlisi de proteïnes

#### 3.4.1. Extracció de proteïnes

L'extracció de proteïnes és un procés que requereix de la lisi cel·lular i, en el cas d'obtenir proteïnes de cor o altres teixits, una disgregació del teixit mitjançant mètodes mecànics i l'ús de detergents. Per mantenir la integritat i la fosforilació de les proteïnes és necessari fer servir, durant el procés d'extracció, inhibidors de proteases i fosfatases juntament amb el tampó de lisi. L'aïllament de proteïnes es va realitzar segons les condicions que es detallen a continuació.

#### Procediment:

- Preparació del tampó de lisi:

Components	Concentració final
<b>Tampó de lisi</b>	
Tris-HCl pH=7,5	25 mM
Clorur de sodi (NaCl)	150 mM
Nonidet P-40 (NP-40)	1%
Deoxicolat de sodi (DOC)	1%
Triton® X-100	0,1%
Dodecilsulfat de sodi (SDS)	0,1%
<b>Inhibidors de proteases i fosfatases*</b>	
Fluorur de sodi (NaF)	10 mM
Ortovanadat de sodi (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	1 mM
Còctel inhibidor de proteases (Sigma-Aldrich©)	5 µL/mL tampó

\* Els inhibidors s'afegeixen a la solució de treball just abans de fer servir el tampó.

1. Tractarem la mostra inicial dependent del seu origen.

Si estem aïllant proteïnes a partir d'un teixit o un òrgan, el disgregarem amb 1 mL de tampó de lisi per cada 100 mg de teixit que utilitzem, fent servir un homogeneïtzador (Ultra-Turrax IKA T25).

En el cas d'extreure proteïnes a partir de cultius cel·lulars, resuspendrem el *pellet* de cèl·lules amb 500 µL de tampó de lisi i lisarem les cèl·lules fent 3 cicles de congelació/descongelació amb neu carbònica i un bany a 37°C.

2. Centrifugar 30 minuts a 13.000 rpm i a 4°C.
3. Recuperar el sobrenedant que conté les proteïnes solubles totals.
4. Un cop aïllada la proteïna total, quantificar la seva concentració mitjançant el kit BCA (*BicinchoninicAcid*) *ProteinAssay de Pierce* (ThermoScientific®), seguint les instruccions del fabricant.

### 3.4.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS

L'electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS permet separar les proteïnes d'una mostra segons la seva mida. El sistema es basa en que el SDS, que és un detergent aniònic que desnaturalitza l'estructura secundària de les proteïnes, carrega negativament les proteïnes en funció de la seva massa. D'aquesta manera, en aplicar un camp elèctric, les proteïnes es desplacen a través del gel en funció de la seva mida.

#### Procediment:

1. Preparar els gels d'electroforesi amb el sistema Protean III de Bio-Rad®. En aquest sistema es preparen dos gels en sèrie. El primer, el gel concentrador, té un pH=6.8 i una concentració baixa d'acrilamida (5%), permetent que les proteïnes es concentrin en un front al inici del gel separador. En el segon gel, el gel separador, que té un pH=8.8 i més concentració d'acrilamida (entre 7% i 15% dependent del grau de separació que vulguem), és on les proteïnes es separen en funció de la seva mida.

Gel concentrador: 5% Acrilamida, Tris-HCl 125 mM pH=6,8, SDS 0.1%, Persulfat d'amoni 0.1%, TEMED 6.6 mM

Gel separador: 7-15% Acrilamida, Tris-Base 375 mM pH=8,8, SDS 0.1%, Persulfat d'amoni, TEMED 2.2 mM

## Materials i Mètodes

2. Barrejar 40 µg de proteïnes de cada mostra amb tampó de càrrega Laemmli 5x (Tris-HCl 312.5 mM pH=6.8, SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 25%, blau de bromofenol 0,04%) en una proporció 4:1.
3. Escalfar la barreja a 95°C durant 5 minuts per a facilitar la completa desnaturalització de les proteïnes i carregar-la en el gel. Carregar també el marcador de pes molecular que ens permetrà comprovar la migració de les proteïnes i la estimar la seva mida.

L'electroforesi es duu a terme a un voltatge constant de 120V en tampó d'electroforesi (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%), fins que les proteïnes es separin de manera òptima.

### 3.4.3. Western Blot

Un cop separades les proteïnes, aquestes es van transferir a una membrana de difluorur de polivinil (PVDF) per poder ser detectades immunològicament. Per a que les proteïnes es puguin adherir a la superfície de la membrana, aquesta ha de ser tractada amb metanol al 100% i rentada amb aigua per a hidratar-la. La transferència es va realitzar amb un amperatge constant de 400 mA durant 90 minuts en tampó de transferència (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %).

La immunodetecció de les proteïnes implica l'ús d'anticossos que s'uneixin de manera específica a les proteïnes que es volen detectar. Per evitar que els anticossos s'uneixin de manera no específica a la membrana, aquesta es va bloquejar incubant-la durant una hora a T<sup>a</sup> ambient en una solució de TTBS (Tris-Base 20 mM pH=7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) amb un 5% de llet desnatada. La incubació amb l'anticòs primari es va realitzar a 4°C durant tota la nit, en una solució de TTBS amb llet desnatada o BSA (albúmina sèrica bovina) al 5%. Les membranes es van rentar 3 cops amb solució TTBS durant 5 minuts per eliminar l'excés d'anticòs primari. L'anticòs secundari es va incubar durant una hora a T<sup>a</sup> ambient en TTBS amb llet desnatada al 5%. Les membranes es van rentar 3 cops durant 10 minuts amb TTBS després de la incubació per eliminar l'excés d'anticòs. Depenent de l'anticòs i les recomanacions del fabricant, les condicions d'incubació (dilució, solució de bloqueig, etc. ) poden variar lleugerament (Taula 3.3).

Per detectar les proteïnes es va fer servir el sistema de quimioluminescència ECL (en el nostre cas es va utilitzar el kit *ECL Western Blotting Reagents* de GE Healthcare), seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode es basa en la detecció de llum emesa com a conseqüència de l'oxidació del luminol per el HRP (*horseradish peroxidase*) conjugat a l'anticòs secundari en presència de peròxid d'hidrogen. La membrana es posa en contacte

amb els reactius i després són exposades a una pel·lícula fotogràfica per posteriorment ser revelades mitjançant un aparell *Curix-60* de AGFA.

Anticòs	Procedència	Típus	Solució d'incubació	Dilució de treball	Casa comercial	Referència
Flag	Ratolí	Monoclonal	Llet	1/2000	Sigma	F3165
$\alpha$ -Tubulina	Conill	Monoclonal	BSA	1/2500	Cell Signaling	2125
HRP anti-mouse	Cabra	Secundari	Llet	1/5000	BioRad	172-1011
HRPanti-rabbit	Cabra	Secundari	Llet	1/10000	BioRad	170-6515

Taula 3.3. Llistat d'anticossos que s'han fet servir en aquest estudi.

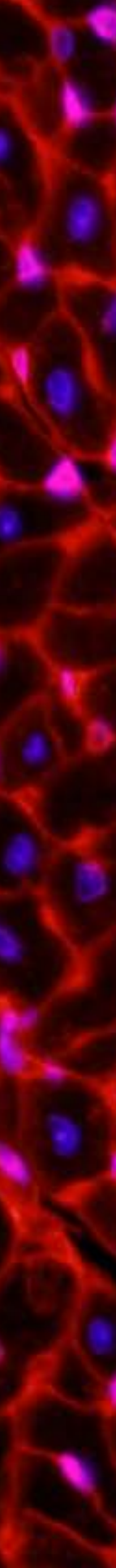
### 3.5. Anàlisi estadística

Tots els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  error estàndard (SEM). Per determinar la significació estadística de les diferències observades entre els grups experimentals, es va aplicar el test de la *t* de Student. Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el software GraphPad Prism 5. Les diferències es van considerar estadísticament significatives quan  $P \leq 0,05$ .



## Resultats

---







## 4.1. Models experimentals per l'estudi de la CMD

Inicialment es van caracteritzar dos models animals de diabetis: un model de DMI induïda per STZ i un model de DMII consistent en ratolins deficients en el receptor de la leptina (ratolins db/db), amb l'objectiu d'identificar el millor model que ens permetés estudiar els mecanismes implicats en el desenvolupament de la CMD.

### 4.1.1. Caracterització del model de DMI induït per STZ

#### 4.1.1.1 Estudi de la funció cardíaca en ratolins diabètics induïts per STZ

Per estudiar els mecanismes patogènics de la CMD en un model de DMI, es va induir la diabetis amb STZ a una dosi diària de 60 mg/kg durant cinc dies consecutius, el que evita les complicacions associades a la toxicitat de l'antibiòtic quan aquest s'utilitza a altes dosis.

El tractament de ratolins de la soca C57BL/6 amb STZ va induir diabetis ràpidament (Taula 4.1), i a una setmana després d'haver finalitzat el tractament els ratolins presentaven una hiperglucèmia severa (STZ=328,67 ± 19,93 mg/dL; Control=124,69 ± 6,25 mg/dL), la qual va augmentar encara més passades 6 setmanes del tractament (STZ=448,82 ± 20,11 mg/dL; Control=122,36 ± 4,43 mg/dL).

Tal i com s'observa en la taula 4.1, degut a l'efecte tòxic de la STZ sobre les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques, aquests animals tenen els nivells d'insulina severament disminuïts, tan a 1 setmana com a 6 setmanes, el que en última instància és el causant de la ràpida hiperglucèmica desenvolupada d'aquest model.

A més, els animals tractats amb STZ també presenten una disminució gradual en el pes, que es fa més evident a les 6 setmanes del tractament (Taula 4.1). Aquesta disminució del pes corporal correlaciona amb una important reducció en la massa del teixit adipós, que pot atribuir-se a unes elevades tasses de lipòlisi com a conseqüència de la manca d'insulina, una hormona amb accions antilipolítiques. D'acord amb aquestes observacions, l'anàlisi dels paràmetres serològics mostren com es produeix un increment en els animals diabètics dels nivells d'àcids grassos lliures. En els ratolins diabètics també es va observar un augment dels nivells de triglicèrids, si bé no es van observar canvis en els nivells de colesterol (Taula 4.1).

## Resultats

	1 setmana		6 setmanes	
	Control	STZ	Control	STZ
Nombre d'animals	16	15	11	11
Pes (g)	25,18 ± 0,59	24,05 ± 0,35	32,02 ± 0,90	24,59 ± 0,84**
Teixit adipós (mg)	312,69 ± 23,01	177,5 ± 20,47**	658,90 ± 59,22	180,49 ± 15,28**
Glucosa (mg/dL)	124,69 ± 6,25	328,67 ± 19,93**	122,36 ± 4,43	448,82 ± 20,11**
Insulina (ng/mL)	0,97 ± 0,07	0,45 ± 0,03**	1,12 ± 0,14	0,35 ± 0,01**
Triglicèrids (mg/dL)	52,1 ± 4,91	79,05 ± 8,72*	60,93 ± 7,52	115,23 ± 14,05**
Àcids grassos lliures (mmol/L)	0,45 ± 0,03	0,62 ± 0,06*	0,79 ± 0,06	1,01 ± 0,07*
Colesterol (mg/dL)	138,34 ± 4,42	139,85 ± 7,06	141,35 ± 7,60	133,12 ± 6,15

**Taula 4.1.** Pes i paràmetres serològics dels animals amb diabetis induïda per STZ i els seus respectius controls 1 i 6 setmanes després del tractament. Els resultats s'expressen com a la mitjana ± SEM (n=11-16 animals/grup). \*P<0,05; \*\*P<0,01.

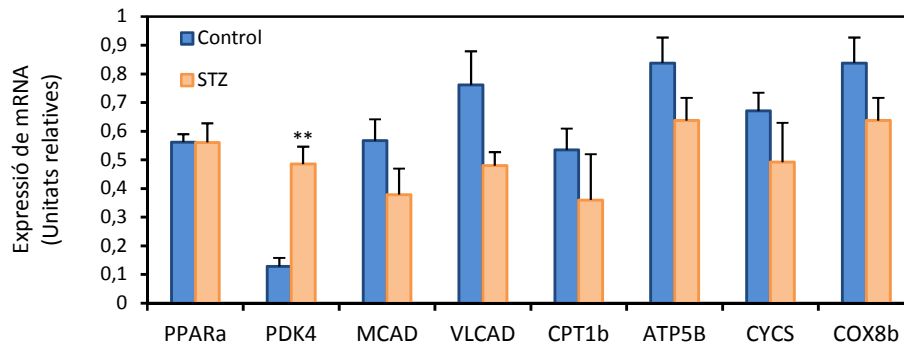
Un cop establerta la diabetis, es va analitzar el fenotip cardíac en aquests animals. En els ratolins diabètics es va observar una disminució en la massa del cor, molt més evident a les 6 setmanes després del tractament (Taula 4.2). Les anàlisis mitjançant ecocardiografia transtoràcica bidimensional mostren algunes alteracions estructurals en el cor dels animals diabètics. Aquests presenten una disminució en el diàmetre del ventricle esquerre a diàstole, tant a 1 setmana com a 6 setmanes (Taula 4.2). També s'observa una disminució en el diàmetre del ventricle esquerre a sístole, el gruix del septe interventricular a diàstole i el gruix de la paret del ventricle esquerre a diàstole, encara que les diferències no són estadísticament significatives. Tot i les diferències morfològiques existents en els cors dels animals diabètics, que semblen més aviat el resultat de la menor mida del cor, no s'observen diferències en la freqüència cardíaca, la fracció d'ejecció o la fracció d'escurçament (FS) entre els animals control i els STZ, el que indica que malgrat les diferències de mida, els cors dels animals diabètics no presenten alteracions funcionals destacables.

	1 setmana		6 setmanes	
	Control	STZ	Control	STZ
Nombre d'animals	6	7	6	7
Pes del cor (mg)	114,2 ± 0,007	110,1 ± 0,003	130 ± 0,001	96 ± 0,007**
Freqüència cardíaca (pulsacions/min.)	443 ± 20,3	416 ± 21,7	415 ± 10,2	428 ± 19,3
SIVd (mm)	0,858 ± 0,03	0,671 ± 0,03*	0,769 ± 0,05	0,766 ± 0,05
PVEd (mm)	0,706 ± 0,04	0,684 ± 0,24	0,99 ± 0,16	0,813 ± 0,17
DVEd (mm)	3,96 ± 0,19	3,25 ± 0,25*	4,08 ± 0,08	3,33 ± 0,24*
DVEs (mm)	2,47 ± 0,26	2,02 ± 0,19	2,46 ± 0,16	2,07 ± 0,27
FS (%)	42,03 ± 3,97	38,11 ± 2,10	39,70 ± 3,89	39,78 ± 4,44
FE (%)	77,5 ± 4,41	74,7 ± 2,4	75,5 ± 3,7	74,7 ± 4,8

**Taula 4.2. Anàlisi ecocardiogràfiques del cor dels animals amb diabetis de tipus I induïda per STZ i els seus respectius controls 1 i 6 setmanes després del tractament.** Les dimensions i la funció cardíaca en ratolins amb diabetis induïda per STZ es va determinar mitjançant ecocardiografia bidimensional transtoràcica en mode M. Els resultats estan expressats com a la mitjana ± SEM (n=6-7 animals/grup). SIVd, gruix del septe interventricular a diàstole; PVEd, gruix de la paret posterior del ventricle esquerre a diàstole; DVEd, diàmetre del ventricle esquerre a diàstole; DVEs, diàmetre del ventricle esquerre a sístole; FS, fracció d'escurçament; FE, fracció d'ejecció. \*P≤0,05; \*\*P≤0,01.

Si bé no es van observar les alteracions típiques de la CMD (p.e. hipertròfia ventricular o disfunció contràctil), es va voler determinar si el model de DMI induït per STZ presentava algunes de les característiques moleculars descrites en pacients amb CMD o altres models animals de la patologia. Concretament es va analitzar mitjançant PCR quantitativa els nivells d'expressió de gens implicats en el metabolisme oxidatiu i que s'havien trobat alterats en models animals, com per exemple gens implicats en oxidació d'àcids grassos o la fosforilació oxidativa. En els resultats obtinguts (Figura 4.1), però, no s'aprecien diferències significatives en l'expressió de gens mitocondrials associats al metabolisme lipídic com per exemple *Acadm*, *Acadvl* (*very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*) o *Cpt1b*, ni en gens de la fosforilació oxidativa com *Atp5b*, *Cyts* o *Cox8b*. Tampoc hi han canvis en l'expressió del regulador transcripcional *PPARα*, un dels gens que de manera més consistent s'ha trobat incrementat en pacients i models animals de CMD. Si que es va observar un increment en els nivells d'expressió de *Pdk4*, el qual es troba típicament incrementat en diversos teixits d'individus diabètics.

## Resultats



**Figura 4.1.** Anàlisi de l'expressió gènica a cor dels animals amb diabetis de tipus I induïda per STZ i els seus respectius controls 6 setmanes després del tractament. Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=6 animals/grup); \*\* $P \leq 0,01$ .

Aquests resultats suggereixen que el tractament amb STZ, malgrat induir una severa diabetis en ratolins, no és suficient per a reproduir els canvis estructurals (hipertrofia cardíaca) ni les alteracions en l'expressió gènica característics de la CMD, almenys durant les 6 setmanes en les que es van mantenir aquests animals.

### 4.1.2. Caracterització del model de DMII *db/db*

#### 4.1.2.1 Estudi de la funció cardíaca en ratolins *db/db*

Els estudis de la CMD en context de DMII es va realitzar amb animals *db/db*, un dels models més utilitzats per estudiar la diabetis associada a la obesitat. A més, considerem que aquest model diabètic reflecteix millor l'epidemiologia humana, ja que la DMII representa entre el 90 i el 95% dels casos de diabetis. Degut a la deficiència en la senyalització de la leptina, aquests animals són hiperfàgics i desenvolupen obesitat, tal i com es pot comprovar en el pes dels ratolins. Aquest increment en el pes dels animals es degut principalment a un augment en els depòsits de teixit adipós (Taula 4.3).

Aquests animals presenten un fenotip clarament diabètic caracteritzat per una hiperglucèmia i una hiperinsulinèmia severes, i un augment en la resistència a la insulina determinat per l'índex HOMA-IR que ja són evidents a les 8 setmanes d'edat i que es mantenen fins les 24 setmanes (Taula 4.3). També s'ha observat un increment en els animals diabètics dels nivells de colesterol. No s'observen però canvis en els nivells de triglicèrids o dels àcids grassos lliures.

	8 setmanes		12 setmanes		24 setmanes	
	Control	db/db	Control	db/db	Control	db/db
Nombre d'animals	8	8	8	8	8	8
Pes (g)	24,53 ± 0,60	37,50 ± 0,79**	29,95 ± 0,60	47,51 ± 1,13**	33,13 ± 1,26	52,37 ± 1,04**
Teixit adipós (g)	0,85 ± 0,10	3,74 ± 0,22**	1,22 ± 0,05	5,35 ± 0,59**	1,50 ± 0,16	6,02 ± 0,27**
Glucosa (mg/dL)	117,5 ± 7,62	391,50 ± 72,97**	135,50 ± 9,21	449,33 ± 41,48**	12,83 ± 4,76	558,83 ± 28,81**
Insulina (ng/mL)	1,37 ± 0,37	9,96 ± 0,04**	2,04 ± 0,36	5,97 ± 0,65**	2,26 ± 0,39	3,19 ± 1,04
Triglicèrids (mg/dL)	77,5 ± 10,5	45,07 ± 12,50	67,19 ± 7,47	57,5 ± 5,26	62,14 ± 4,27	77,17 ± 10,29
Àcids grassos lliures (mmol/L)	0,99 ± 0,08	0,76 ± 0,13	0,96 ± 0,08	0,89 ± 0,08	1,06 ± 0,10	1,15 ± 0,12
Colesterol (mg/dL)	111,2 ± 2,5	138,76 ± 6,52*	114,71 ± 4,22	182,57 ± 17,67**	104,45 ± 2,93	125,19 ± 12,62
HOMA-IR	11,8 ± 3,7	277,90 ± 52,87**	20,63 ± 4,73	196,41 ± 37,14**	19,34 ± 2,77	116,42 ± 26,83**

**Taula 4.3. Pes i paràmetres serològics del animals diabètics db/db i els seus respectius controls.** Els resultats estan expressats en mitjana ± SEM (n=8 animals/grup). \*P≤0,05; \*\*P≤0,01.

Les anàlisis ecocardiogràfiques duts a terme amb aquests animals per estudiar la funció cardíaca rebel·len lleugeres alteracions estructurals en els cors dels animals diabètics. En comparació amb els animals control, els animals diabètics presenten una mida i una massa del cor inferior tant a 8, 12 i 24 setmanes d'edat (Taula 4.4). A les 8 i 12 setmanes, els ratolins db/db també presenten una disminució dels diàmetre del ventricle esquerre, en comparació amb els controls, tant a diàstole com a sístole. No es veuen diferències en el gruix de la paret del ventricle esquerre, però sí que s'observa un increment en el gruix del septe interventricular, tot i que aquest increment només és estadísticament significatiu a les 24 setmanes d'edat.

Tampoc s'observen diferències en la freqüència cardíaca, la fracció d'escurçament o la fracció d'ejecció a partir de les 12 setmanes, el que indica que la funció cardíaca no es troba alterada en els animals diabètics (Taula 4.4).

## Resultats

	8 setmanes		12 setmanes		24 setmanes	
	Control	db/db	Control	db/db	Control	db/db
Nombre d'animals	8	8	8	8	8	8
Pes del cor (mg)	113,3 ± 2,9	100,3 ± 1,8**	127,0 ± 4,3	112,1 ± 1,2*	139,8 ± 3,1	121,7 ± 3,1**
Freqüència cardíaca (pulsacions/min.)	407,56 ± 23,67	434,04 ± 23,48	437,30 ± 11,4	429,10 ± 13,9	421,38 ± 28,30	436,44 ± 14,66
SIVd (mm)	0,82 ± 0,07	0,93 ± 0,16	0,87 ± 0,05	0,98 ± 0,05	0,73 ± 0,07	0,96 ± 0,10*
PVEd (mm)	0,62 ± 0,13	0,66 ± 0,05	0,80 ± 0,04	0,76 ± 0,04	0,61 ± 0,07	0,56 ± 0,07
DVEd (mm)	4,32 ± 0,11	3,01 ± 0,21**	3,83 ± 0,13	3,48 ± 0,12*	4,32 ± 0,15	5,93 ± 2,39
DVEs(mm)	2,95 ± 0,17	1,68 ± 0,23**	2,47 ± 0,14	2,09 ± 0,09*	3,05 ± 0,22	2,62 ± 0,15
FS (%)	31,53 ± 2,57	45,63 ± 4,00**	35,8 ± 2,5	38,9 ± 1,6	29,63 ± 3,07	35,07 ± 4,25
FE (%)	65,53 ± 4,02	81,58 ± 3,83**	70,8 ± 2,7	75,3 ± 1,8	62,68 ± 4,62	70,00 ± 5,71

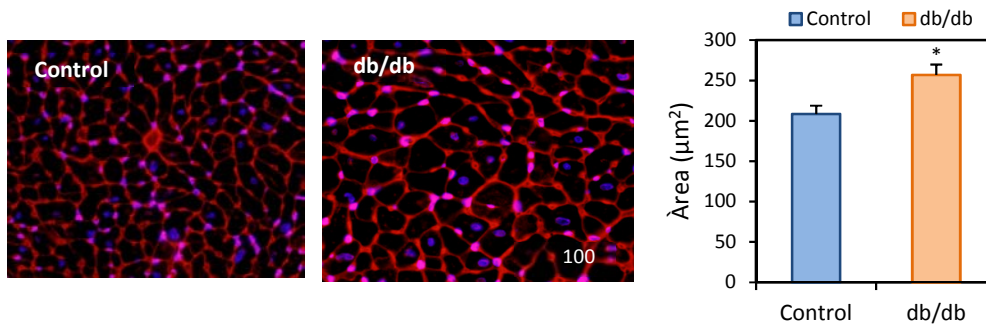
**Taula 4.5. Anàlisi ecocardiogràfiques del cor en animals diabètics db/db.** Les dimensions i la funció cardíaca en ratolins db/db es va determinar mitjançant ecocardiografia bidimensional i *M-mode* transtoràcica. Els resultats estan expressats en mitjana ± SEM (n=8 animals/grup). SIVd, gruix del septe interventricular a diàstole; PVEd, gruix de la paret del ventricle esquerre a diàstole; DVEd, diàmetre del ventricle esquerre a diàstole; DVEs, diàmetre del ventricle esquerre a sístole; FS, fracció d'escurçament; FE, fracció d'ejecció. \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .

### 4.1.2.2 Alteracions cel·lulars en els cors d'animals db/db.

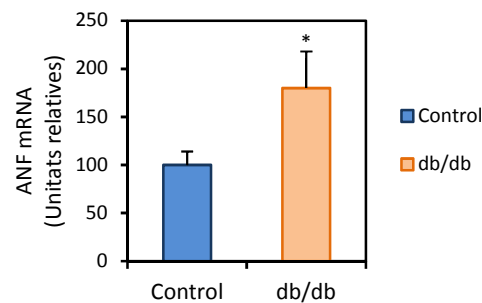
Tot i no presentar disfunció cardíaca, aquests animals presenten algunes anomalies en l'estructura cardíaca. A més, els anàlisis d'expressió gènica rebel·len que es produïx un increment en els nivells d'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic. Això, juntament amb el fet que la DMII representa aproximadament el 90% els casos de diabetis, ens va fer decidir escollir el model db/db a 12 setmanes, edat a la que ja es considera que han desenvolupat CMD, per realitzar els nostres estudis.

A continuació es va procedir a analitzar microscòpicament la morfologia cardíaca per tal de determinar si el model db/db reproduïx algunes de les alteracions cel·lulars descrites en pacients i models animals amb CMD.

El fet d'observar una disminució en la massa cardíaca dels animals db/db ens va portar a pensar que aquesta podia ser deguda a processos d'atròfia en els cardiomiòcits. Per estudiar si es produïen canvis en la morfologia dels cardiomiòcits, es van tenyir seccions histològiques dels cors obtinguts dels animals db/db i els seus respectius controls amb lectina marcada amb un fluorocrom i es va determinar l'àrea transversal dels cardiomiòcits ventriculars. L'anàlisi morfomètrica dels cardiomiòcits va revelar que hi ha un augment significatiu d'aproximadament un 25% en la mida de les cèl·lules cardíques dels animals diabètics (Figura 4.3). Aquest augment en la mida dels cardiomiòcits es correspon amb un increment en l'expressió de mRNA del marcador d'hipertrofia ANF (Figura 4.4).



**Figura 4.3. Anàlisi de la mida dels cardiomiòcits dels cors diabètics i els seus respectius controls.** La mida dels cardiomiòcits es va determinar mesurant l'àrea cel·lular en talls histològics tenyits amb lectina. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=4 animals/grup). \* $P \leq 0,05$ .

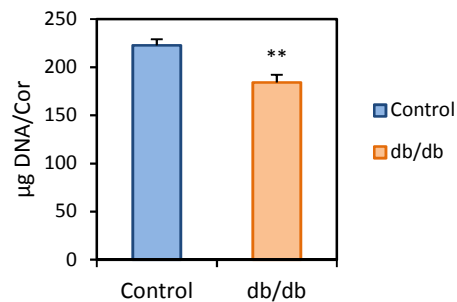


**Figura 4.4. Anàlisi de l'expressió d'ANF en cor d'animals diabètics i els seus respectius controls.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ .

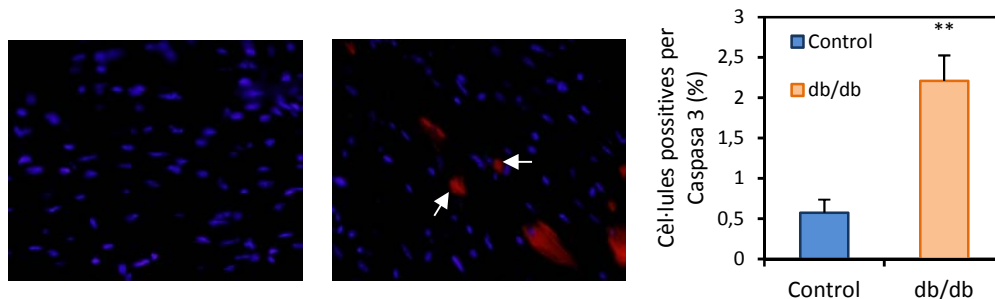


## Resultats

Ja que la mida dels cardiomiòcits es troba augmentada en els cors diabètics, és lògic pensar que la pèrdua de la massa dels cors en animals db/db sigui deguda a una disminució en el número de cèl·lules. Per tal d'estimar el nombre de cèl·lules, es va determinar el contingut de DNA total en els ventricles dels animals diabètics i control. Els resultats obtinguts mostren que el contingut de DNA total en els ventricles dels animals db/db és significativament menor que en els animals control, indicant que el número de cèl·lules al cor dels animals diabètics és inferior al dels control (Figura 4.5). Aquesta disminució en el número de cèl·lules que presenten els animals diabètics es correspon amb un augment de la mort cel·lular per apoptosi, tal i com s'observa per immunohistoquímica amb un anticòs contra la forma activa de la caspasa 3. Concretament, els resultats indiquen que hi ha tres vegades més cèl·lules apoptòtiques en el cor diabètic que en el dels animals control (Figura 4.6).

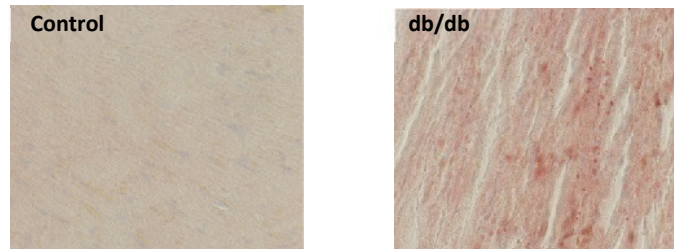


**Figura 4.5. Anàlisi del contingut de DNA total a cor dels animals diabètics..** Per estimar el contingut cel·lular en el cor dels animals diabètics i dels controls es va aïllar i quantificar el DNA total. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=5 animals/grup). \*\* $P \leq 0,01$ .



**Figura 4.6. Anàlisi de la mort cel·lular per apoptosi en els cors dels animals diabètics i els seus respectius controls.** La mesura de l'apoptosi es va realitzar mitjançant immunohistoquímica amb un anticòs contra la forma activa de la caspasa 3. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=3 animals/grup). \*\* $P \leq 0,01$ .

Una altra de les característiques observades en pacients i models animals amb CMD és la presència d'esteatosi cardíaca. La tinció amb Oil Red O de seccions del teixit cardíac demostra que es produeix un augment important en l'acumulació intracel·lular de triglicèrids en forma de gotes lipídiques en els cors dels animals diabètics en comparació amb els controls, on pràcticament no es veuen lípids tenyits (Figura 4.7). Això indica que els animals db/db ja presenten esteatosi cardíaca a les 12 setmanes.



**Figura 4.7. Anàlisi del grau d'esteatosi cardíaca en cors d'animals diabètics i els seus respectius controls.** L'acumulació de lípids al teixit cardíac es va determinar mitjançant una tinció específica amb Oil Red O.

Els resultats obtinguts indiquen que els cors dels ratolins db/db presenten una major proporció d'apoptosi, una mida dels cardiomiòcits més gran i un increment en l'acumulació de lípids, en comparació amb els ratolins control. La presència d'aquestes alteracions cel·lulars en els cors dels animals diabètics, juntament amb les dades d'expressió gènica obtingudes, idèntiques a les trobades en pacients amb CMD, indiquen que, malgrat la manca de grans alteracions estructurals i funcionals a nivell orgànic, el ratolins db/db de 12 setmanes d'edat constitueixen un bon model per a estudiar les etapes primerenques de la CMD.

## 4.2. Perfils d'expressió gènica dels ratolins db/db

### 4.2.1. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant microarrays de DNA

Amb l'objectiu de descobrir els mecanismes implicats en les alteracions observades en etapes primerenques de la CMD, es van utilitzar microarrays de DNA per tal de comparar els perfils d'expressió gènica dels animals diabètics db/db de 12 setmanes d'edat amb els dels animals control no diabètics. Es van analitzar l'expressió de més de 28.000 gens, i després de filtrar els gens amb sondes redundants al microarray i els gens no anotats es va

## Resultats

determinar que 1020 estaven regulats diferencialment en el cor dels animals db/db en comparació amb els control ( $P \leq 0,05$ ). D'aquests gens, 520 estaven sobreexpressats en el cor diabètic, mentre que 500 tenien l'expressió disminuïda en comparació amb els animals control.

Per determinar les funcions cel·lulars associades a aquests gens que es troben alterades en els cors diabètics, els llistats gens infra i sobreexpressats es va sotmetre a una anàlisi d'enriquiment gènic mitjançant el programa d'anotació funcional DAVID. D'aquesta manera podem classificar els gens segons el compartiment cel·lular al que pertanyen, el procés biològic en el que estan implicats o la funció molecular que realitzen.

Categoria	Terme GO	Nº de	p-valor
BP	Immune response	60	1,1E-25
BP	Antigen processing and presentation of peptide antigen	16	1,2E-15
BP	Antigen processing and presentation	20	2,7E-13
BP	Antigen processing and presentation of exogenous antigen	12	2,6E-11
CC	MHC protein complex	14	1,4E-10
BP	Antigen processing and presentation of peptide via MHC class II	9	1,4E-9
CC	External side of plasma membrane	21	8,2E-8
CC	Cell surface	24	8,6E-7
MF	GTPase activity	15	1,7E-6
CC	MHC class I protein complex	9	5,0E-6
MF	Purine ribonuclease binding	69	2,7E-5
MF	Purine nucleotide binding	71	3,0E-5
CC	Multivesicular body	5	3,4E-5

**Taula 4.6. Categories de la Gene Ontology (GO) que estan més representades entre els gens regulats negativament en cors diabètics.** Només es mostren les categories que tenen un  $P \leq 4,0E-5$  ( $n=7$  animals/grup). CC=compartiment cel·lular, BP=procés biològic, MF=funció molecular.

EntrezID	Símbol	Nomb del gen	logFC	p-valor
17329	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-1,5877695	6,55E-9
16149	Cd74	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	-1,526556	2,03E-8
246728	Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	-1,459668	3,95E-8
14968	H2-Ea	histocompatibility 2, class II antigen E alpha, pseudogene	-1,394293	4,83E-8
21822	Tgtp1	T-cell specific GTPase 1	-1,3930007	7,24E-8
17472	Gbp4	guanylate binding protein 4	-1,2696544	1,42E-7
14960	H2-Aa	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	-1,2613456	2,04E-7
110557	H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 6	-1,2234637	3,21E-7
434341	Nlrc5	NLR family, CARD domain containing 5	-1,1997494	3,62E-7
15019	H2-Q8	histocompatibility 2, Q region locus 8	-1,1732393	3,76E-7
14972	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region	-1,1026862	5,23E-7
55987	Cpxm2	carboxypeptidase X 2 (M14 family)	-1,0876599	8,47E-7
15018	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7	-1,0538206	1,28E-6
17084	Ly86	lymphocyte antigen 86	-1,0330993	1,59E-6
14961	H2-Ab1	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	-0,9969616	2,62E-6
15165	Hcn1	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1	-0,9919278	3,02E-6
229900	Gbp6	guanylate binding protein 6	-0,9659801	3,64E-6
630294	H2-t9	predicted gene 7030	-0,9632732	4,34E-6
99899	Ifi44	interferon-induced protein 44	-0,9620578	4,67E-6
67775	Rtp4	receptor transporter protein 4	-0,9600857	4,89E-6
23962	Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	-0,9513746	4,97E-6
436493	H2-gs10	H2-Gs10 MHC class I like protein GS10	-0,9468185	5,85E-6
100702	Gbp6	guanylate binding protein 6	-0,9257862	5,90E-6
11459	Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	-0,9103182	6,55E-6
14964	H2-D1	histocompatibility 2, D region locus 1	-0,8956636	8,19E-6

**Taula 4.7. Llista de gens que tenen l'expressió disminuïda en cors de ratolins db/db respecte als controls.** L'expressió gènica es va analitzar mitjançant arrays de DNA. Només es mostren els 25 gens que més tenen alterada la seva expressió (logFC) (n=7 animals/grup).

L'anàlisi d'enriquiment de gens mitjançant el programa bioinformàtic *DAVID* dels gens regulats negativament en els cors diabètics rebel·la que la majoria d'aquests gens estan associats a termes de la *Gene Ontology* (GO) relacionats amb el sistema immune (Taula 4.6

## Resultats

i 4.7). Aquests resultats concorden amb el paper que té la leptina en la regulació de la funció immunològica, fet que fa que els ratolins db/db, deficients en la senyalització de la leptina, presentin deficiències en la resposta immune i cert grau d'immunodeficiència.

Per altra banda, l'anàlisi dels gens l'expressió dels quals estava incrementada en cors diabètics rebel·la que la molts d'aquests gens estan relacionats amb processos associats al metabolisme oxidatiu i, més concretament a processos metabòlics que es donen al mitocondri (Taula 4.8). De tots aquests, el metabolisme oxidatiu dels lípids, tant mitocondrial com peroxisomal, és el que es troba més representat, el que concorda amb el que diferents estudis han descrit fins ara en models de CMD (Taula 4.9).

Categoria	Terme GO	Nº de gens	p-valor
CC	Mitochondrion	85	2,0E-13
CC	Mitochondrial part	45	5,1E-11
BP	Fatty acid metabolic process	25	3,2E-10
CC	Mitochondrial inner membrane	30	4,0E-9
CC	Mitochondrial membrane	33	1,1E-8
CC	Organelle inner membrane	30	1,3E-8
MF	O-acyltransferase activity	9	3,5E-6
BP	Coenzyme metabolic process	15	4,8E-5
BP	Fatty acid beta-oxidation	6	5,6E-5
MF	Coenzyme binding	15	1,3E-4
MF	Magnesium ion binding	26	1,5E-4
BP	Hexose metabolic process	15	2,8E-4
BP	Fatty acid catabolic process	6	3,7E-4
MF	Cofactor binding	17	4,9E-4
MF	Phosphatase activity	17	8,4E-4

**Taula 4.8. Categories segons la Gene Ontology (GO) que estan més representades entre els gens desregulats positivament en cors diabètics.** Només es mostren les categories que tenen un  $P \leq 1,0E-3$  (n=7 animals/grup). CC=compartiment cel·lular, BP=procés biològic, MF=funció molecular.

Gran part d'aquests gens que es troben incrementats estan implicats en el metabolisme de lípids, com *Scd4* (*stearoyl-CoA desaturase 4*), *Acot1* (*acyl-CoA thioesterase 1*), *Hmgcs2* (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2*) i *Angptl4* (*angiopoietin-like 4*).

EntrezID	Símbol	Nom del gen	logFC	p-valor
15360	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	1,6217006	1,27E-4
329065	Scd4	stearoyl-coenzyme A desaturase 4	1,30272727	4,68E-8
57875	Angptl4	angiopoietin-like 4	1,27614105	2,50E-3
16855	Lgals4	lectin, galactose binding, soluble 4	1,19422414	5,40E-7
26897	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1	1,07614196	2,44E-4
74747	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	0,98574595	2,11E-4
17898	Myl7	myosin, light polypeptide 7, regulatory	0,95482524	2,76E-2
18787	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	0,95221356	6,13E-4
16509	Kcne1	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1	0,90607261	5,72E-7
233813	Vwa3a	von Willebrand factor A domain containing 3A	0,90412772	1,46E-4
14120	Fbp2	Fructose biphosphatase 2	0,88781388	2,70E-4
140781	Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	0,83229464	1,96E-6
14955	H19	H19 fetal liver mRNA	0,80036483	1,66E-3
16819	Lcn2	lipocalin 2	0,79581116	6,90E-3
22229	Ucp3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, protoncarrier)	0,79215711	3,03E-2
18104	Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	0,76771355	5,61E-4
56437	Rrad	Ras-related associated with diabetes	0,74602886	5,05E-3
11606	Agt	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	0,73027181	1,61E-4
17967	Ncam1	neural cell adhesion molecule 1	0,70972808	2,05E-5
100042437	Vmn1r79	vomeronasal 1 receptor 79	0,69824132	2,54E-2
30927	Snai3	snail homolog 3 (Drosophila)	0,69244165	2,19E-4
14230	Fkbp10	FK506 bindingprotein 10	0,68649974	1,54E-4
57742	Abhd1	abhydrolase domain containing 1	0,67556486	1,97E-3
171266	Vmn1r10	vomeronasal 1 receptor, G10	0,67099764	1,91E-2
18190	Nrxn2	neurexin II	0,66359705	2,15E-3

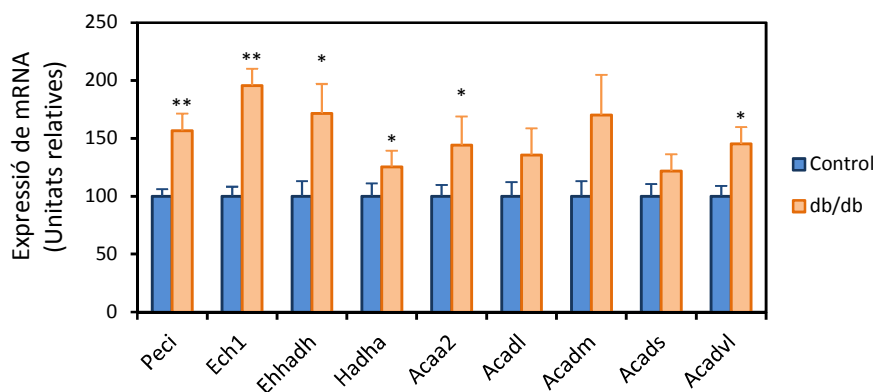
**Taula 4.9.** Llista de gens que tenen l'expressió incrementada en cors de ratolins db/db respecte als controls. L'expressió gènica es va analitzar mitjançant arrays de DNA. Només es mostren els 25 gens que més tenen alterada la seva expressió (logFC) (n=7 animals/grup).

A les Taules 4.7 i 4.9 es mostren els primers 25 gens que veuen més alterada la seva regulació en els cors diabètics respecte dels controls. La llista completa dels gens que es troben regulats de manera diferencial es pot consultar a les Taules 1 i 2 de l'annex.

#### 4.2.2. Anàlisi de l'expressió gènica per RT-qPCR

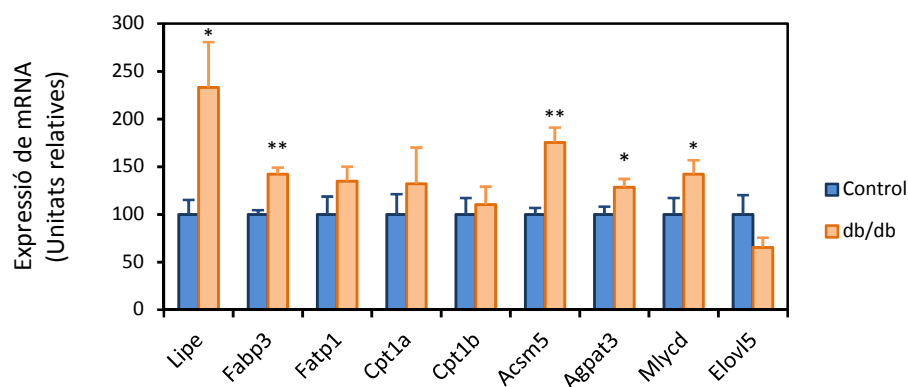
Les dades d'expressió obtingudes amb els arrays van ser validades mitjançant RT-qPCR. Els resultats obtinguts al mesurar els nivells d'expressió per RT-qPCR concorden amb els obtinguts en l'anàlisi del microarray, on s'observa un increment en l'expressió de gens implicats en diferents aspectes del metabolisme lipídic.

El que s'observa és un increment en els cors diabètics dels nivells de mRNA de gens que codifiquen per proteïnes implicades en la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos mitocondrial com *Peci* (*enoyl-CoA delta isomerase 2*), *Acadl*, *Hadha* i *Acaa2* (*acetyl-CoA acyltransferase 2*). A més, també es troben incrementats els nivells de mRNA d'alguns gens implicats en la  $\beta$ -oxidació peroxisomal com *Ech1* (*enoyl-CoA hidratase 1*) i *Ehhadh* (*enoyl-CoA, hidratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase*) (Figura 4.8).

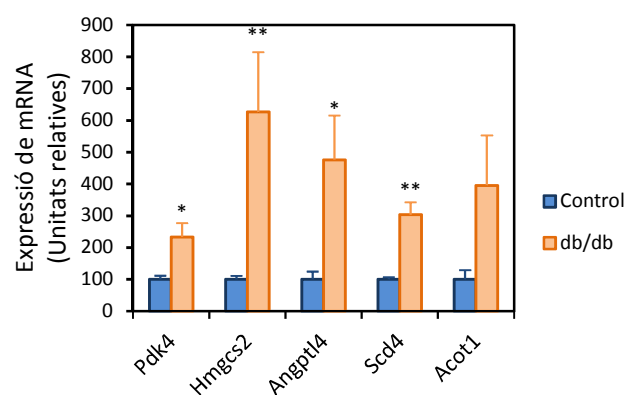


**Figura 4.8. Anàlisi de l'expressió gènica a cor de gens implicats en la  $\beta$ -oxidació d'àcids grassos.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .

A més, també s'ha observat un increment en cors dels ratolins db/db de gens implicats en diversos aspectes del metabolisme lipídic que inclouen la hidròlisi de triglicèrids com *Lipe* (*hormone-sensitive lipase*), la captació i el transport d'àcids grassos, com *Fatp1* i *Fabp3*, o amb la síntesi de lípids com *Acsm5* (*acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5*), *Acp3* (*1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3*), *Scd4* i *Acot1* (Figura 4.9 i 4.10). L'increment en l'expressió de gens implicats en el transport i la síntesi lipídica concorda amb l'acumulació de triglicèrids que s'observa en el teixit cardíac dels ratolins diabètics (Figura 4.7).



**Figura 4.9.** Anàlisi de l'expressió gènica a cor de gens implicats en la hidròlisi, el transport i la síntesi de lípids. Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .



**Figura 4.10.** Anàlisi de l'expressió gènica a cor de gens implicats en altres aspectes del metabolisme de lípids. Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .

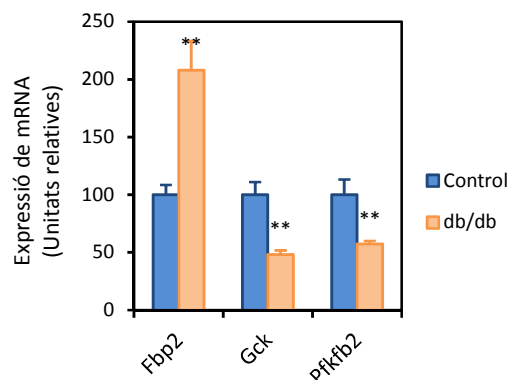
En els resultats també es pot veure un increment en els nivells d'expressió de gens que participen en la regulació del metabolisme de lípids (Figura 4.10). Consistent amb el que s'ha vist en altres estudis i s'ha explicat fins ara, es pot apreciar un increment en l'expressió del gen que codifica per l'enzim PDK4, el qual contribueix a l'augment en la  $\beta$ -oxidació característica dels cors diabètics al inhibir l'enzim PDH. L'expressió del gen *Angptl4*, que codifica per una proteïna que regula el metabolisme lipídic a més de la homeòstasi de la glucosa i la sensibilitat a la insulina, també es troba incrementada en els cors diabètics. A més, també s'observa un augment en els nivells de mRNA de *Hmgcs2*, que codifica per un enzim mitocondrial que catalitza la primera reacció en el procés de la cetogènesi per formar



## Resultats

cossos cetònics a partir dels àcids grassos. Per últim, també es troben incrementats els nivells del gen que codifica per l'enzim ACOT1, que catalitza la hidròlisi dels acil-CoAs a àcids grassos lliures i coenzim A, tot i que aquest increment no és estadísticament significatiu.

L'anàlisi dels nivells d'expressió gènica també va mostrar alteracions en el metabolisme dels carbohidrats en els cors diabètics (Figura 4.11). La disminució en l'expressió de gens com la *Gck* (*glucokinase*), que catalitza el pas inicial en la utilització de la glucosa, i de la *Pfkfb2* (*6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2*), que regula els nivells de la fructosa-2,6-bifosfat, juntament amb l'increment de *Pdk4* que hem esmentat abans i que inhibeix la glucòlisi, recolza que es produeix una disminució en el metabolisme de la glucosa. A més, s'observa un increment en els nivells d'expressió del gen que codifica per l'enzim FBP2 (*fructose-biphosphatase 2*) implicat en el procés de gluconeogènesi i que catalitza la hidròlisi de la fructosa 1,6-bifosfat a fructosa 1,6-fosfat, contribuint encara més en la inhibició de la glucòlisi.

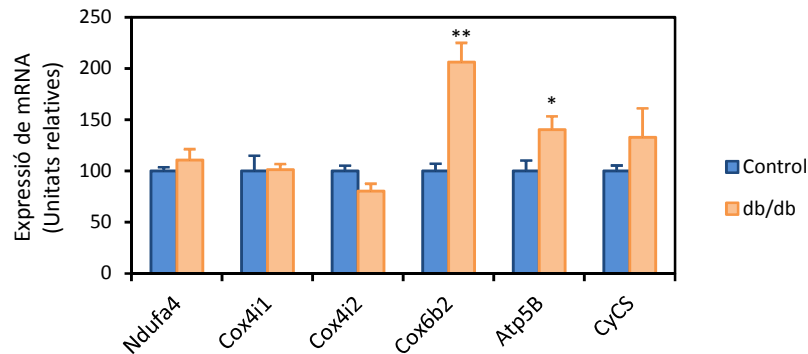


**Figura 4.11. Anàlisi de l'expressió gènica a cor de gens implicats en el metabolisme de la glucosa.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \*\* $P \leq 0,01$ .

Aquests canvis en l'expressió gènica confirmen la inflexibilitat metabòlica descrita per altres autors i que caracteritza la CMD, en la que l'oxidació de la glucosa es troba inhibida i l'oxidació d'àcids grassos augmentada, i que provoca que el cor diabètic depengui exclusivament dels lípids per obtenir energia en detriment de la glucosa.

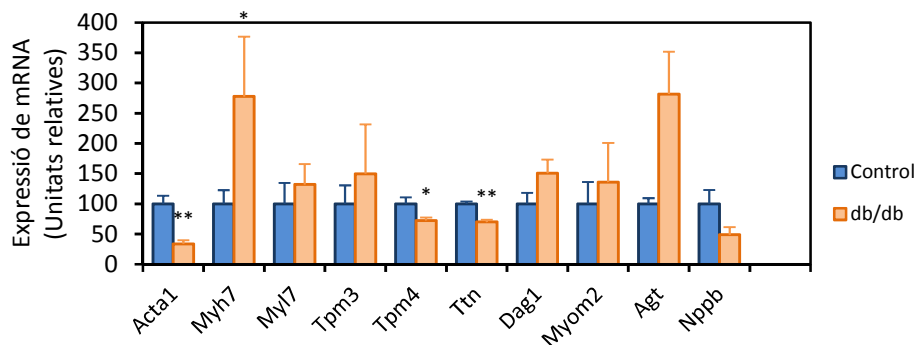
Com s'ha comentat en la introducció, alguns autor han descrit una disminució en l'expressió de proteïnes implicades en la fosforilació oxidativa en cors d'animals amb diabetis (Wang 2015, Kuo 1983). Per aquest motiu, vam analitzar l'expressió d'alguns d'aquests gens. Tal i com es pot observar en la Figura 4.12, amb l'excepció d'un increment significatiu en l'expressió de *Cox6b2* (*cytochrome C oxidase subunit 6B2*) i *Atp5b*, no es va observar

alteracions destacables en la regulació de gens implicats en la fosforilació oxidativa. Això concorda amb el fet de que categories de la GO relacionades amb la cadena respiratòria/sistema de fosforilació oxidativa no van aparèixer com a significativament sobrerrepresentades en la nostra anàlisi d'enriquiment (Taula 4.8).



**Figura 4.12. Anàlisi de l'expressió gènica a cor de gens implicats en la fosforilació oxidativa.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,005$ .

A part del metabolisme oxidatiu, també es veu afectada la funció cardíaca en els animals diabètics, tal i com es dedueix de la desregulació en l'expressió de gens implicats en la funció contràctil dels cardiomiòcits (Figura 4.13). Com es pot observar, l'expressió de gens com *Acta1* ( $\alpha$ -actin 1), *Tpm4* (tropomyosin 4) o *Ttn* (titin), gens claus associats a la maquinària contràctil de cèl·lules musculars, es troba disminuïda de manera significativa en els cors dels ratolins db/db. En canvi, l'expressió d'altres gens com per exemple *Myh7* ( $\beta$ -myosin heavy chain 7), marcador de disfunció ventricular que també està associat a la funció del múscul cardíac, es troba incrementada.

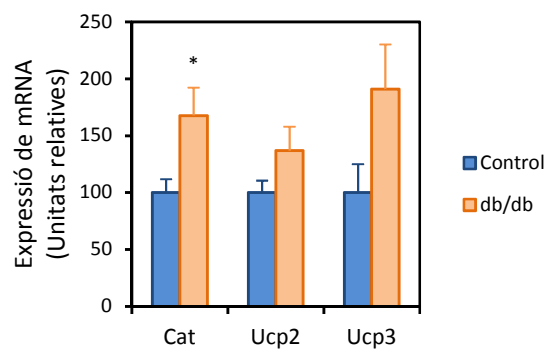


**Figura 4.13. Anàlisi de l'expressió gènica a cor de gens implicats en funció contràctil del cor.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .

## Resultats

Com s'ha descrit en la introducció, alguns estudis previs han descrit un augment de l'estrès oxidatiu en diferents models diabètics (Barouch 2003, Anderson 2009). En el nostre model, en l'anàlisi de l'expressió en els cors diabètics també es pot observar com els nivells de mRNA de gens implicats en el control de l'estrès oxidatiu es troben incrementats (Figura 4.14). Tal i com es veu a la gràfica, l'expressió de gens com *Cat* (*catalasa*), que codifica per un enzim antioxidant que converteix el peròxid d'hidrogen en aigua i oxigen, i dels gens que codifiquen per les proteïnes desacoblants *Ucp2* (*uncoupling protein 2*) i *Ucp3* (*uncoupling protein 3*) es troba augmentada en els cors db/db, encara que els canvis de les proteïnes *Ucp* no són significatius.

Com s'ha descrit en la introducció, alguns estudis previs han descrit un augment de l'estrès oxidatiu en diferents models diabètics (Barouch 2003, Anderson 2009). En el nostre model, en l'anàlisi de l'expressió en els cors diabètics també es pot observar com els nivells de mRNA de gens implicats en el control de l'estrès oxidatiu es troben



**Figura 4.14. Anàlisi de l'expressió gènica a cor de gens implicats en l'estrès oxidatiu.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ .

Aquests resultats confirmen que els ratolins diabètics db/db presenten una alteració metabòlica, caracteritzada per un increment en el metabolisme lipídic i una desregulació de gens associats a la funció contràctil del cor.

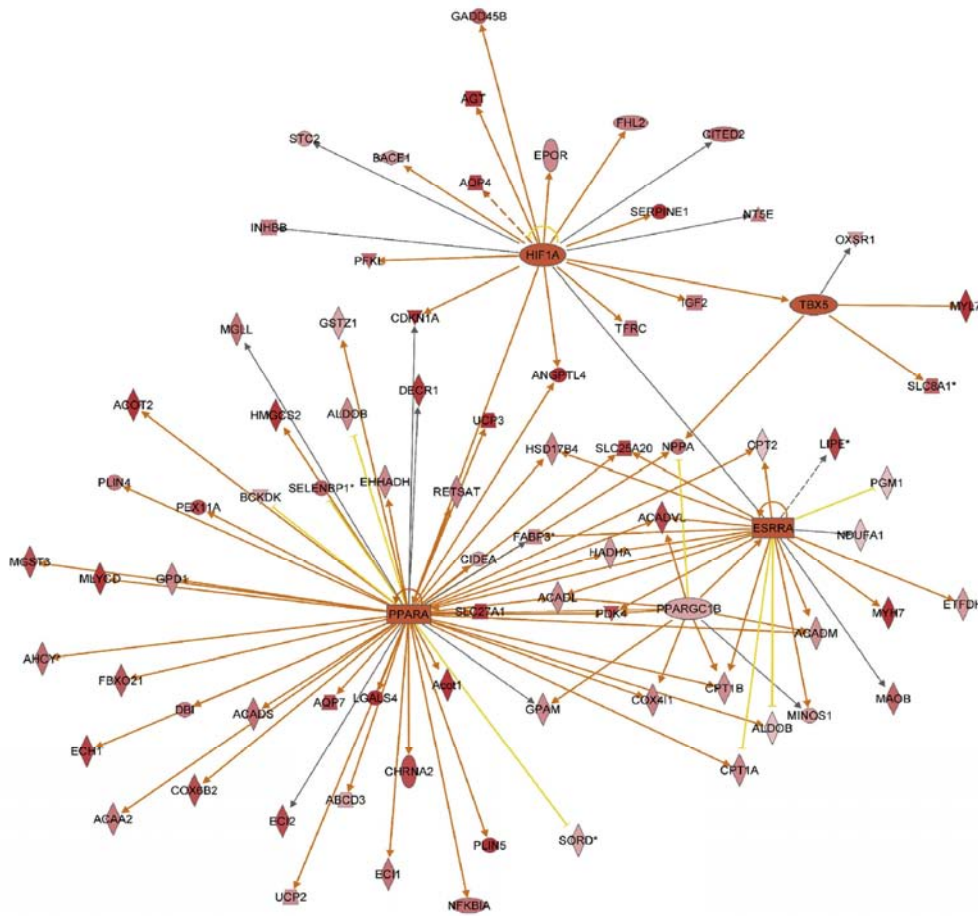
### 4.2.3. Identificació de potencials reguladors transcripcionals dels programes gènics alterats en la CDM

Per tal d'identificar possibles reguladors transcripcionals potencialment responsables dels perfils d'expressió gènica observats en els cors diabètics es va dur a terme un *Upstream Regulator Analysis* mitjançant el *software* IPA (Ingenuity Pathway Analysis). L'*Upstream Regulator Analysis* es basa en el coneixement previ dels efectes que determinades molècules tenen sobre l'expressió dels gens que nosaltres sotmetem a

l'anàlisi. Això inclou no només factors de transcripció o altres moduladors de la transcripció (coactivadors o repressors) sinó qualsevol altre tipus de molècula, incloent-hi hormones, segons missatgers o fàrmacs. En el nostre cas, es van sotmetre a anàlisi només els gens l'expressió dels quals estava incrementada en els cor dels animals diabètics. Un cop identificades les molècules amb algun tipus d'acció reguladora sobre els gens analitzats, nosaltres vam preseleccionar únicament els factors reguladors de la transcripció, incloent-hi factors de transcripció, receptors nuclears d'hormones i coreguladors, l'expressió dels quals es trobava alterada (positivament o negativament) en el cor dels ratolins db/db. Per a fer aquesta selecció es va utilitzar com a punt de tall un P valor de solapament inferior a  $2,0E-03$ . De tots aquests, únicament el reguladors transcripcionals l'expressió dels quals estava augmentada en cor d'animals diabètics i per als que el software predeia un estat d'activació van ser utilitzats per a generar la xarxa reguladora (Figura 4.15). Els factors triats van ser PPAR $\alpha$ , ERR $\alpha$ , HIF1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  i Tbx5.

Els reguladors que es presenten a la figura 4.16 estan associats als gens que es troben desregulats en els cors diabètics. Un dels principals nòduls reguladors correspon a PPAR $\alpha$ , que regula l'expressió de nombrosos gens que trobem alterats al cor diabètic, principalment aquells relacionats amb el transport i el metabolisme oxidatiu d'àcids grassos. Aquestes dades estan d'acord amb el paper important que PPAR $\alpha$  sembla tenir com a un dels principals mediadors de les alteracions metabòliques descrites en la CMD, tal i com s'ha comentat a la introducció (apartat 1.2.4.9).

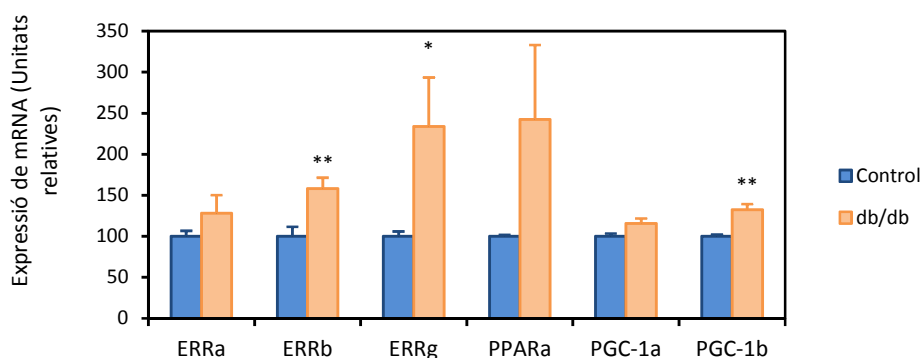
A més, també apareix ERR $\alpha$ , un dels membres de la família ERR de receptors nuclears orfes, com un altre nòdul regulador important, compartint algunes dianes relacionades amb el metabolisme lipídic amb PPAR $\alpha$ . Com s'ha comentat en la introducció, els ERR tenen un paper important en la biogènesi mitocondrial, i per tant regulen l'expressió de vies oxidatives en aquest orgànul, incloent-hi l'oxidació d'àcids grassos. A més, tal i com s'observa a la figura 4.16 i ha estat descrit per diversos autors, ERR $\alpha$  regula l'expressió de PPAR $\alpha$ , el que suggereix que els ERR podrien tenir un paper preponderant i contribuir de manera significativa en els canvis que tenen lloc en la CMD, regulant directament l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic, però també de manera indirecta a través de la regulació de PPAR $\alpha$ .



**Figura 4.16. Anàlisi dels reguladors transcripcionals mitjançant el software IPA.** Els receptors nuclears ERR (Estrogen-Related Receptor) i PPAR $\alpha$  apareixen com els principals nòduls reguladors dels canvis en els patrons d'expressió observats en els cors diabètics.

Els nivells d'expressió a cor dels diferents membres de la família de receptors nuclears ERR i d'altres gens implicats en la regulació del metabolisme oxidatiu es van analitzar mitjançant RT-qPCR (Figura 4.17). Es va observar que l'expressió d'ERR $\alpha$  no canvia significativament en els cors diabètics en comparació amb els control. En canvi, sí que es troba incrementada l'expressió d'ERR $\beta$  i, més destacada encara, la d'ERR $\gamma$ . També es pot

observar, com ja s'ha descrit en altres estudis, un increment en l'expressió de PPAR $\alpha$ , encara que no sigui de manera significativa. Per últim es va analitzar l'expressió dels coactivadors PGC-1 $\alpha$  i PGC-1 $\beta$ , els quals són un reconeguts reguladors del metabolisme oxidatiu tot interaccionant i coactivant els receptors nuclears de la família d'ERR i PPAR, així com altres receptors nuclears. En cors diabètics es va observar un augment modest en l'expressió del coactivador PGC-1 $\beta$ , mentre que la regulació de PGC-1 $\alpha$  no es va trobar alterada.



**Figura 4.17. Anàlisi de l'expressió gènica a cor dels reguladors.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .

La desregulació en el metabolisme i l'expressió gènica observada en els cors diabètics està clarament associada a un increment en l'expressió d'ERR $\gamma$  i PPAR $\alpha$ . Com hem comentat anteriorment, diversos estudis han demostrat la importància d'ERR $\gamma$  en el metabolisme i funció contràctil del teixit cardíac (Alaynick et al., 2007; Dufour et al., 2007). Per tant, els resultats obtinguts suggereixen que ERR $\gamma$  podria ser responsable, almenys en part, dels canvis d'expressió observats en els cors diabètics en les etapes primerenques del desenvolupament de la patologia.

### 4.3. Estudi dels efectes de la sobreexpressió del receptor nuclear ERR $\gamma$ en cardiomiòcits en cultiu.

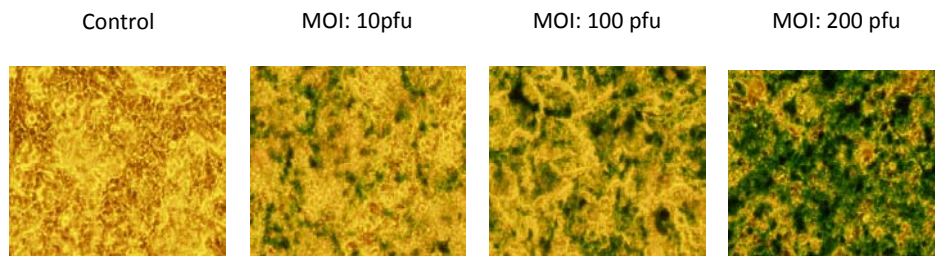
Per tal recolzar la hipòtesi de que ERR $\gamma$  és un dels factors responsables de les alteracions en l'expressió gènica i metabòliques que caracteritzen la CMD, es va procedir a avaluar la

## Resultats

capacitat d'ERRY per a reproduir el perfil d'expressió gènica observat en CMD utilitzant cardiomiòcits HL-1 en cultiu. Amb aquesta finalitat es van generar vectors adenovirals amb els que transduir les cèl·lules HL-1 per tal de sobreexpressar ERRγ.

### 4.3.1 Optimització de la transducció amb vectors adenovirals de cardiomiòcits en cultiu HL-1

Són diversos els factors que determinen l'eficiència de la transducció, i aquests inclouen el tipus de vector que s'utilitza per introduir el DNA en la cèl·lula i el tipus cel·lular amb el que s'està treballant. A més, estudis anteriors apunten a que es produeix una disminució en l'eficiència de transducció quan és tracta cèl·lules diferenciades, en comparació amb cèl·lules indiferenciades. Donat que era el primer cop que en el nostre laboratori s'utilitzaven cèl·lules HL-1, primer comprovar l'eficiència de transducció dels nostres model vector adenovirals en aquest model de cardiomiòcits en cultiu per tal d'optimitzar la tècnica de transducció.



**Figura 4.18.** Transducció dels cardiomiòcits HL-1 amb un vector adenoviral que sobreexpressa la proteïna  $\beta$ -Galactosidasa. Les cèl·lules es van transduir amb 10, 100 i 200 MOI de l'adenovirus i es van tindre amb X-Gal per determinar l'eficiència de la transducció.

Els cardiomiòcits HL-1 en postconfluència es van transduir a diferents MOI (10, 100 i 200) amb un adenovirus que sobreexpressa la proteïna  $\beta$ -galactosidasa per poder detectar les cèl·lules transduïdes amb una tinció amb X-Gal (Figura 4.18). De les diferents MOI que es van fer servir, la de 100 va ser la que permetia una sobreexpressió òptima de la proteïna i a la vegada permetia mantenir la viabilitat de les cèl·lules. En canvi, la infecció a 10 MOI presentava valors baixos de sobreexpressió de la proteïna, mentre que la de 200 MOI, tot i infectar la totalitat de les cèl·lules, provocava canvis morfològics en les cèl·lules i una disminució de la contracció de aquestes, i a més, donava lloc a una elevada mortalitat.

#### 4.3.2. Anàlisi de la sobreexpressió d'ERR $\gamma$ en cardiomiòcits HL-1

Per estudiar si la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  és suficient per reproduir les alteracions observades en els cors diabètics es van transduir cardiomiòcits HL-1 amb un vector adenoviral que sobreexpressa la proteïna recombinant 2xFlag-hERR $\gamma$  (Figura 4.19). Les cèl·lules es van transduir per triplicat amb una MOI de 100, per posteriorment obtenir-ne el RNA i determinar els nivells d'expressió gènica.

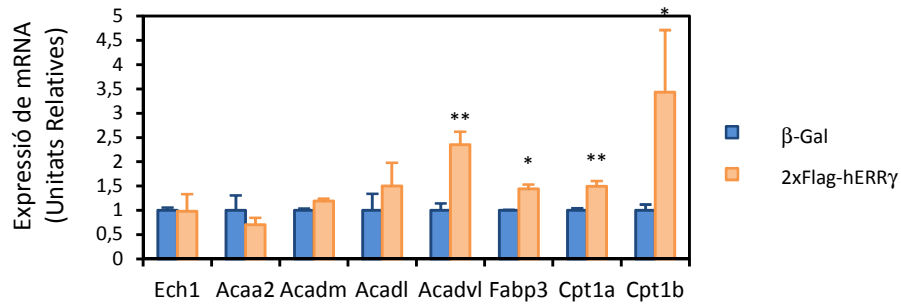


**Figura 4.19. Nivells de proteïna 2xFlag-hERR $\gamma$  en cardiomiòcits HL-1 transduïts amb adenovirus Ad-2xFlag-hERR $\gamma$ .** Els nivells de la proteïna 2xFlag-ERR $\gamma$  es van determinar per western blot amb un anticòs específic contra l'epítot Flag. Com a control negatiu es va utilitzar proteïna de cèl·lules infectades amb un adenovirus que permet la sobreexpressió de la proteïna  $\beta$ -Galactosidasa.

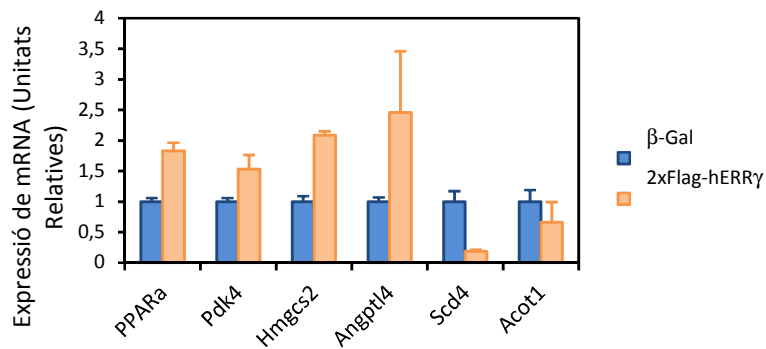
La sobreexpressió d'ERR $\gamma$  provoca un increment en els nivells d'expressió de gens implicats en la  $\beta$ -oxidació i el transport d'àcids grassos, com ara *Acadvl*, *Cpt1a*, *Cpt1b* o *Fabp3* (Figura 4.20). Altres gens relacionats amb el metabolisme de lípids com *Ppara*, *Pdk4* o *Hmgcs2* també veuen incrementada la seva expressió (Figura 4.21). Aquests canvis en els nivells d'expressió de gens del metabolisme lipídic coincideixen amb el que hem observat en els cors dels ratolins db/db (Figures 4.8, 4.9 i 4.10). No obstant, no tots els gens estudiats segueixen el mateix patró d'expressió que el trobat en els cors dels animals diabètics, com per exemple *Scd4*, que té disminuïts els nivells d'expressió en cardiomiòcits HL-1 que sobreexpressen ERR $\gamma$  (Figura 4.21). Això suggereix que alguns dels canvis en l'expressió gènica que veiem en els cors diabètics podrien ser secundaris al desenvolupament de la malaltia i no directament associats a canvis en els nivells d'expressió d'ERR $\gamma$ .



## Resultats

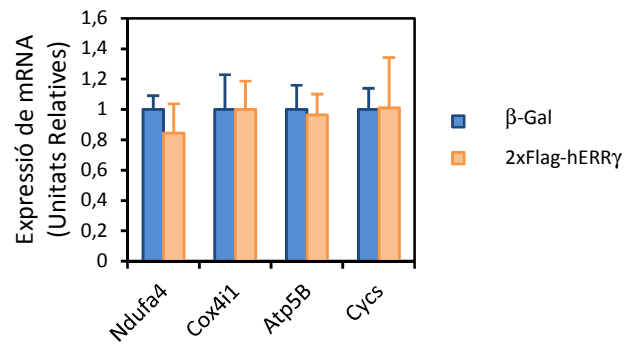


**Figura 4.20. Anàlisi de l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic en cardiomiòcits HL-1.** Els nivells de mRNA es van determinar mitjançant RT-qPCR. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=3 mostres/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .



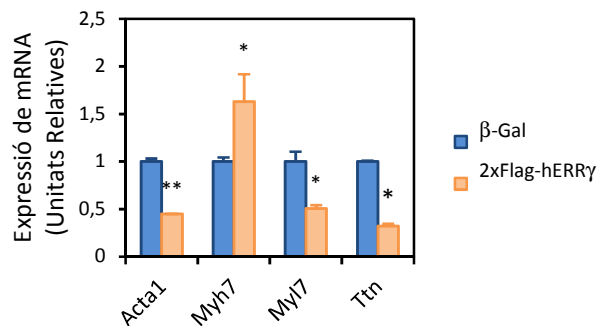
**Figura 4.21. Anàlisi de l'expressió de gens implicats en la regulació del metabolisme lipídic en cardiomiòcits HL-1.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=3 mostres/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .

Sorprenentment, tenint em compte el paper important que els ERR tenen en la regulació de la biogènesi mitocondrial, la sobreexpressió d'ERRγ en cardiomiòcits HL-1 no va produir canvis rellevants en els nivells d'expressió de gens implicats en la fosforilació oxidativa (Figura 4.22). S'observa, doncs, un perfil d'expressió gènica similar al model animal db/db, on gens com *Ndufa4*, *Cox4i1* (*cytochrome C oxidase subunit 4I1*), *Atp5B* o *Cytc* no veuen alterats els seus nivells quan es sobreexpressa ERRγ.



**Figura 4.22. Anàlisi de l'expressió de gens implicats en la fosforilació oxidativa lipídica en cardiomiòcits HL-1.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=3 mostres/grup).

Tal i com succeeix amb els cors dels ratolins diabètics, en el model *in vitro* també s'observa una desregulació en l'expressió de gens implicats en la funció contràctil del múscul cardíac quan es sobreexpressa ERR $\gamma$  (Figura 4.23). El que es pot observar és una disminució en els nivells d'expressió de gens associats a la maquinària contràctil com *Acta1*, *Ttn* o *Myl7*. A més, els nivells d'expressió de *Myh7* es troben incrementats, el que suggereix que els cardiomiòcits tenen alterada la funció contràctil.



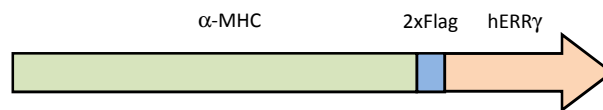
**Figura 4.23. Anàlisi de l'expressió de gens implicats en la funció contràctil en cardiomiòcits HL-1.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=3 mostres/grup); \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ .

Aquests resultats indiquen que la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  en cardiomiòcites HL-1 en cultiu reproduceix, almenys parcialment, moltes de les alteracions de l'expressió gènica que caracteritzen la CMD. Aquests resultats recolzen la hipòtesi de que ERR $\gamma$  podria ser un important mediador de les alteracions metabòliques observades en la CMD.

#### 4.4. Estudi dels efectes de la sobreexpressió cardíaca d'ERRγ in vivo.

##### 4.4.1. Generació d'un model de ratolí transgènic de sobreexpressió d'ERRγ específica a cor

Per estudiar si la sobreexpressió d'ERRγ en cor de ratolins és suficient per induir unes alteracions gèniques i funcionals semblants a les que caracteritzen la cardiomiopatia diabètica, es van generar ratolins transgènics que sobreexpressen la proteïna recombinant 2xFlag-hERRγ específicament a cor. La sobreexpressió específica en el teixit cardíac s'aconsegueix dirigint l'expressió del cDNA que codifica per a la proteïna 2xFlag-hERRγ sota el control del promotor del gen codificant per a la cadena pesada de l'α-miosina cardíaca (α-MHC), un gen que s'expressa de forma específica en teixit cardíac (Figura 4.24).

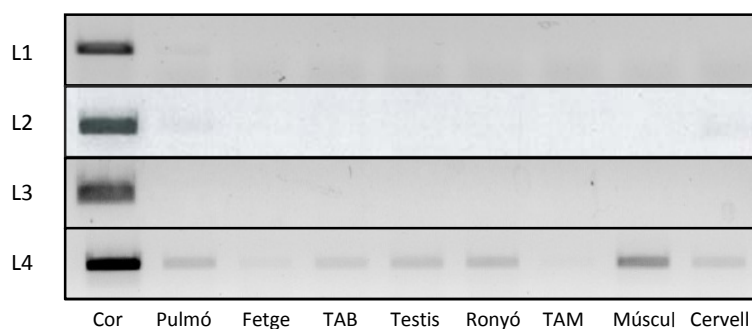


**Figura 4.24. Representació del constructe αMyHC-2xFlag-hERRγ.** El transgen conté el CDNA hERRγ amb l'etiqueta 2xFlag l'expressió del qual està dirigida pel promotor cardíac-específic de la α-MHC.

Mitjançant la injecció del transgen en el pronucli d'òvuls fecundats de ratolins de la soca C57BL/6 es van obtenir un total de 19 ratolins, dels quals únicament 14 havien integrat el transgen en el seu genoma (Figura 4.25). Dels 14 ratolins fundadors, només 4 transmetien el transgen a la seva descendència. A partir d'aquests ratolins es van establir quatre línies transgèniques diferents amb les que es va prosseguir l'estudi. Un cop establertes les diferents línies de ratolins, es va procedir a avaluar l'expressió del transgen en diferents teixits per determinar si, tal i com preteníem, la seva expressió estava restringida al teixit cardíac. L'anàlisi per PCR convencional mostra que 3 de les línies transgèniques (L1, L2 i L3) expressen el transgen de manera específica a cor, mentre que en una de les línies l'expressió del transgen es va detectar en varis teixits (L4). Aquesta última línia va ser descartada i el nostre estudi va prosseguir amb la resta (Figura 4.26).

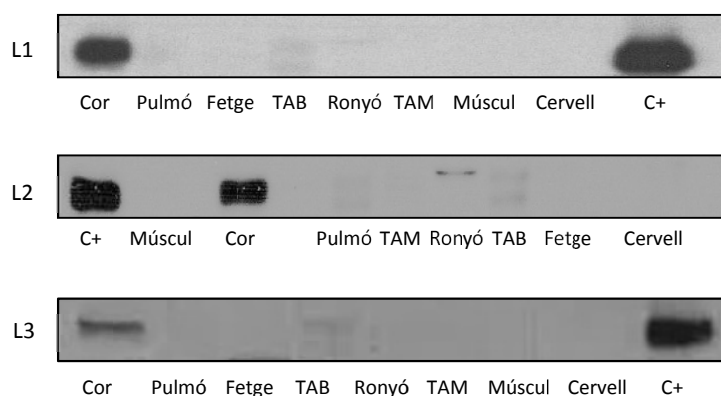


**Figura 4.25. Esquema de les etapes de la generació de les línies transgèniques H-ESRRG.** Les línies transgèniques es van establir a partir dels 3 ratolins que transmetien el transgen a la descendència i tenien expressió específica del transgen a cor.



**Figura 4.26. Anàlisi de l'expressió del transgen en les diferents línies transgèniques.** Els nivells d'expressió es van mesurar mitjançant PCR a partir de RNA dels diferents teixits. TAB, Teixit adipós blanc; TAM, Teixit adipós marró.

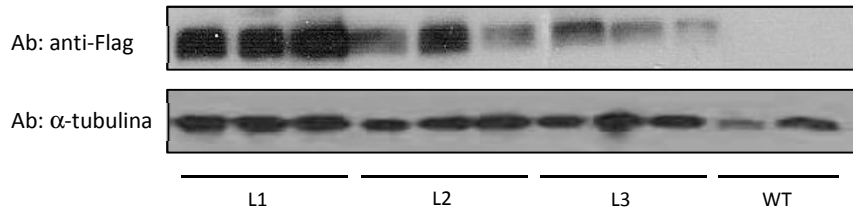
A continuació es va procedir a analitzar els nivells proteics de 2xFlag-hERRY per tal de verificar que aquests correlacionaven amb els nivells de mRNA observats en els diferents teixits. Mitjançant western blot es va observar que les tres línies transgèniques que sobreexpressaven el mRNA del transgen específicament a cor presentaven nivells detectables de la proteïna 2xFlag-hERRY exclusivament en el teixit cardíac (Figura 4.27).



**Figura 4.27. Anàlisi dels nivells proteics de 2xFlag-hERRY en les diferents línies transgèniques establertes.** Els nivells d'expressió es van mesurar mitjançant western blot a partir de proteïna total dels cors de les diferents línies transgèniques. Per detectar la proteïna és va utilitzar un anticòs anti-Flag. Com a control positiu (C+) és va utilitzar un extracte proteic de cèl·lules Cos-7 que sobreexpressen 2x-Flag-hERRY.

A més, les tres línies transgèniques tenen nivells d'expressió diferents, tal i com es pot observar a la Figura 4.28, essent la línia transgènica L1 la que més sobreexpressa el constructe 2xFlag-hERRY, i la línia L3 la que menys sobreexpressa el transgen.

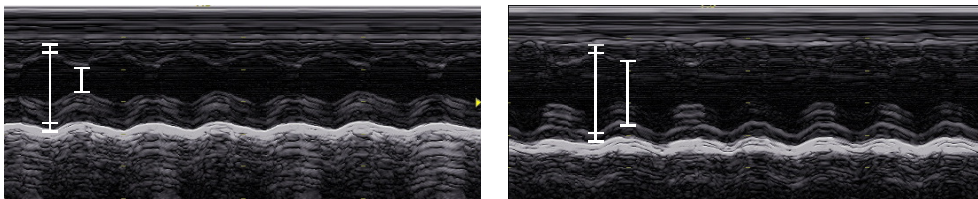
## Resultats



**Figura 4.28. Anàlisi dels nivells proteics de 2xFlag-hERR $\gamma$  en teixits de les diferents línies transgèniques establertes.** Els nivells d'expressió de 2xFlag-hERR $\gamma$  es van mesurar mitjançant western blot a partir de proteïna total dels diferents teixits. Per detectar la proteïna es va utilitzar un anticòs anti-Flag. Com a control de càrrega es va utilitzar un anticòs anti- $\alpha$ -tubulina. WT, *wild type*.

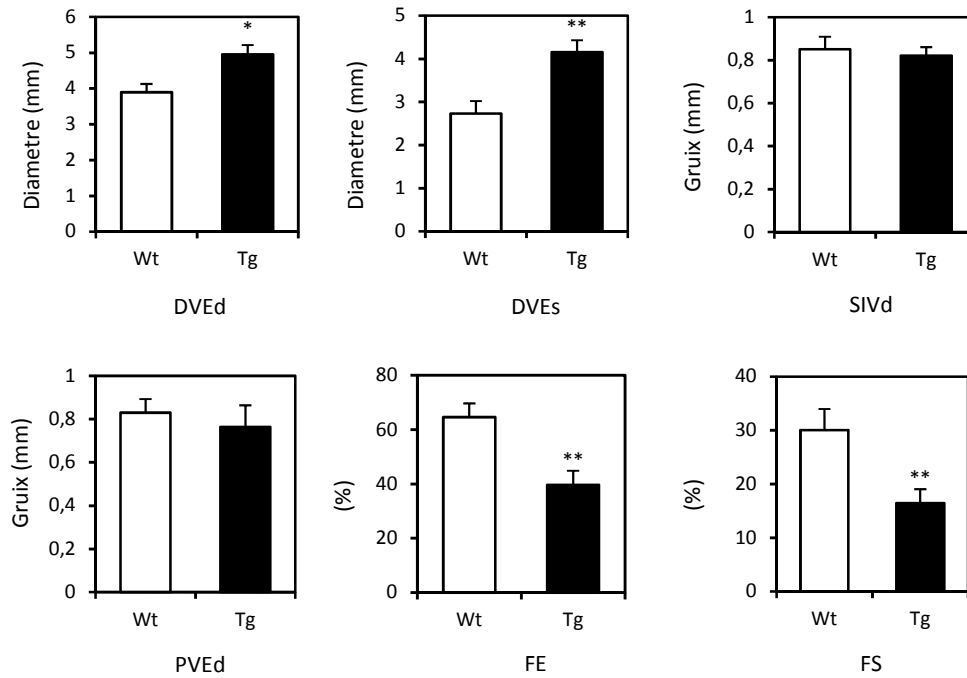
### 4.4.2. Anàlisi de la funció cardíaca en animals transgènics Tg-hERR $\gamma$ .

Amb l'objectiu de veure si la sobreexpressió de hERR $\gamma$  a cor capaç d'alterar la funció cardíaca, es van mesurar les dimensions i la funció contràctil del cor dels ratolins transgènics i es respectius controls mitjançant ecocardiografia bidimensional i mode M transtoràcica (Figura 4.29).



**Figura 4.29. Anàlisi ecocardiogràfiques de la funció cardíaca dels animals transgènics H-ERRG.** Les dimensions i la funció cardíaca en ratolins transgènics es va determinar mitjançant ecocardiografia bidimensional i mode M transtoràcica. TG, transgènic; WT, *wild type*.

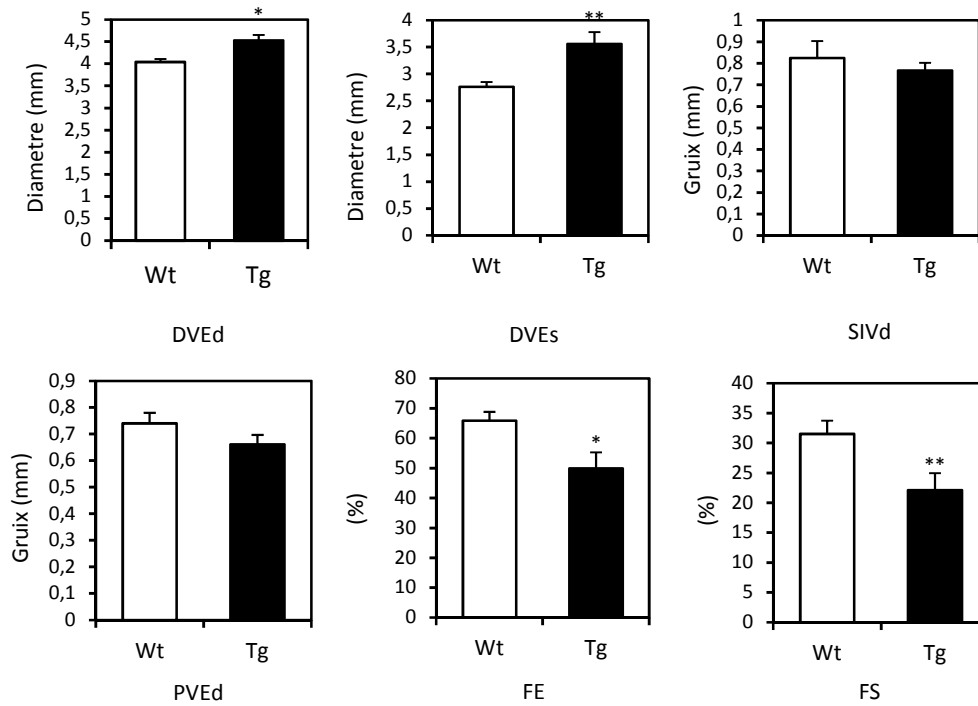
Els estudis ecocardiogràfics per analitzar la funció cardíaca indiquen que hi han diferències importants en la morfologia cardíaca i la contracció ventricular entre els ratolins transgènics (Tg) i els ratolins WT de la línia L1 (Figura 4.30). Paràmetres com el diàmetre del ventricle esquerre, tant a diàstole com a sístole, es troben incrementats en els animals transgènics respecte als controls. També, hi ha una tendència a disminuir del gruix de la paret del ventricle esquerre, encara que les diferències no són estadísticament significatives. A més, la fracció d'ejecció i la fracció d'escurçament, que són indicadors de la funció cardíaca, es troben disminuïdes en els ratolins transgènics (Figura 4.30), el que indica que el cor no està funcionant correctament.



**Figura 4.30. Anàlisi ecocardiogràfiques de la funció cardíaca dels animals de la línia transgènica L1.** Les dimensions i la funció cardíaca en ratolins transgènics es va determinar mitjançant ecocardiografia bidimensional i mode M transtoràcica. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup). DVEd, diàmetre del ventricle esquerre a diàstole; DVEs, diàmetre del ventricle esquerre a sístole; SIVd, gruix del septe interventricular a diàstole; PVEd, gruix de la paret del ventricle esquerre a diàstole; FS, fracció d'escurçament; FE, fracció d'ejecció. \* $P \leq 0,05$ . \*\* $P \leq 0,01$ .

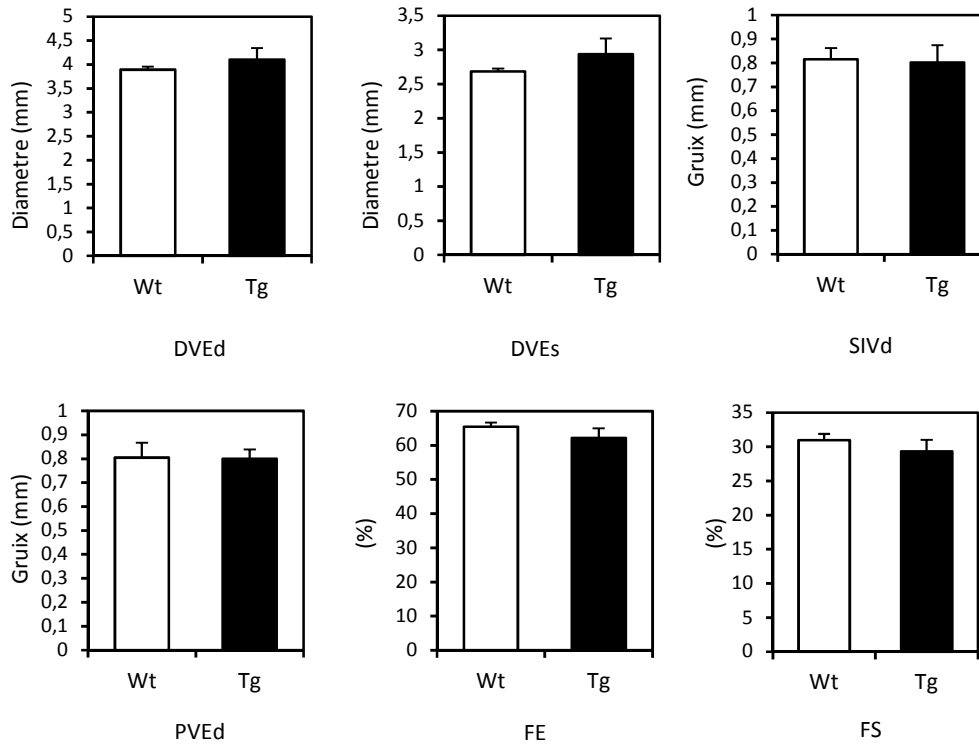
Resultats similars es poden veure al analitzar la funció cardíaca en els animals de la línia transgènica L2, que expressa un nivell de la proteïna 2xFlag-hERRg més baixos que la L1. L'anàlisi de les ecocardiografies realitzades mostren un augment en els diàmetres telediastòlics i telesistòlics dels ratolins transgènics en comparació amb els controls (Figura 4.31). De la mateixa manera, tal i com s'ha vist en la línia transgènica 1, la fracció d'ejecció i la fracció d'escurçament també es troben disminuïdes. Els valors d'aquests paràmetres estan disminuïts en els transgènics respecte dels WT, el que indica la presència de disfunció cardíaca.

## Resultats



**Figura 4.31. Anàlisi ecocardiogràfica de la funció cardíaca dels animals de la línia transgènica L2.** Les dimensions i la funció cardíaca en ratolins transgènics es va determinar mitjançant ecocardiografia bidimensional i mode M transtoràcica. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup). DVEd, diàmetre del ventricle esquerre a diàstole; DVEs, diàmetre del ventricle esquerre a sístole; SIVd, gruix del septe interventricular a diàstole; PVEd, gruix de la paret del ventricle esquerre a diàstole; FS, fracció d'escurçament; FE, fracció d'ejecció. \* $P \leq 0,05$ . \*\* $P \leq 0,01$ .

Quan es va analitzar la morfologia i la funció contràctil del cor mitjançant ecocardiografies en els individus de la línia transgènica L3, que expressa la proteïna 2xFlag-hERR $\gamma$  a nivells més baixos no es van observar diferències entre els animals transgènics i els WT en cap dels paràmetres cardíacs mesurats (Figura 4.32). Això indica que els nivells d'ERR $\gamma$  assolits en aquesta línia no és suficient com per arribar a produir canvis manifestos en la estructura i funció cardíaca.



**Figura 4.32. Anàlisi ecocardiogràfiques de la funció cardíaca dels animals de la línia transgènica L2.** Les dimensions i la funció cardíaca en ratolins transgènics es va determinar mitjançant ecocardiografia bidimensional i mode M transtoràcica. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup). DVEd, diàmetre del ventricle esquerre a diàstole; DVEs, diàmetre del ventricle esquerre a sistole; SIVd, gruix del septe interventricular a diàstole; PVEd, gruix de la paret del ventricle esquerre a diàstole; FS, fracció d'escurçament; FE, fracció d'ejecció.

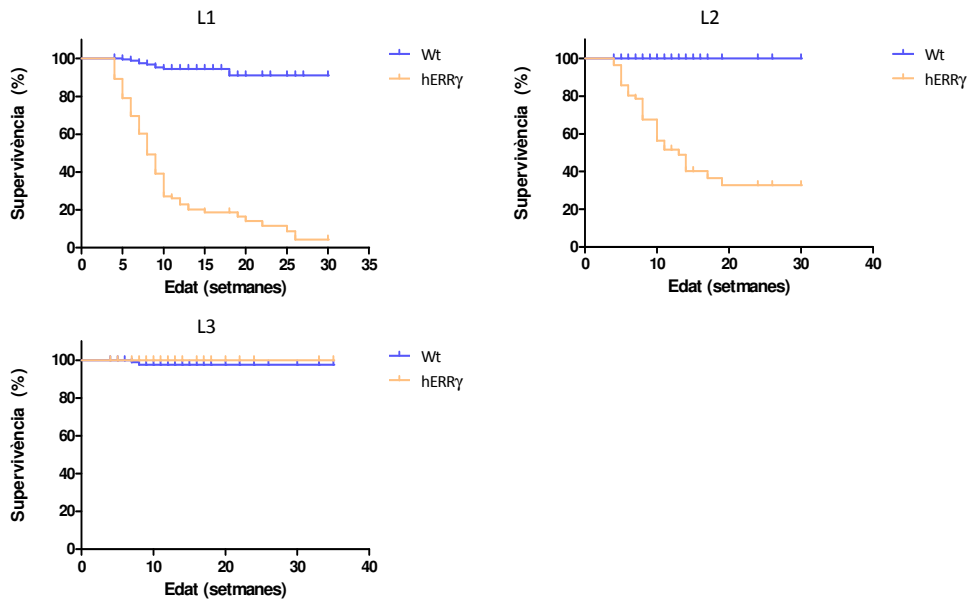
#### 4.4.3. Anàlisi de la supervivència en animals transgènics que sobreexpressen hERRY a cor.

Durant el manteniment de les diferents línies transgèniques de ratolins, es va observar una elevada mortalitat prematura (abans de les 12 setmanes) en ratolins pertanyents a les línies L1 i L2. Al genotipar els animals morts, es va observar que tots ells eren transgènics, el que ens va fer sospitar que la sobreexpressió d'ERRY, i les alteracions funcionals associades descrites anteriorment, podrien ser les responsables d'aquesta mortalitat. Per tal de verificar que efectivament existia una mortalitat associada a la sobreexpressió d'ERRY es van realitzar estudis per analitzar la supervivència en les diferents línies de ratolins Tg-hERRY.



## Resultats

Després d'analitzar més de 100 ratolins de cada línia durant un període màxim de 30 setmanes, els resultats obtinguts mostren que les alteracions funcionals produïdes per la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  en el cor dels ratolins transgènics de les línies L1 i L2 es tradueixen en una significativa reducció de la taxa de supervivència. Tal i com s'observa en la figura 4.33, la vida mitja estimada va ser de 8 setmanes pels individus de la línia L1 i de 13 setmanes per als individus de la línia L2. En canvi, els animals de la línia L3, que no presentaven alteracions detectables per ecocardiografia en la funció cardíaca, no veuen compromesa la seva supervivència.



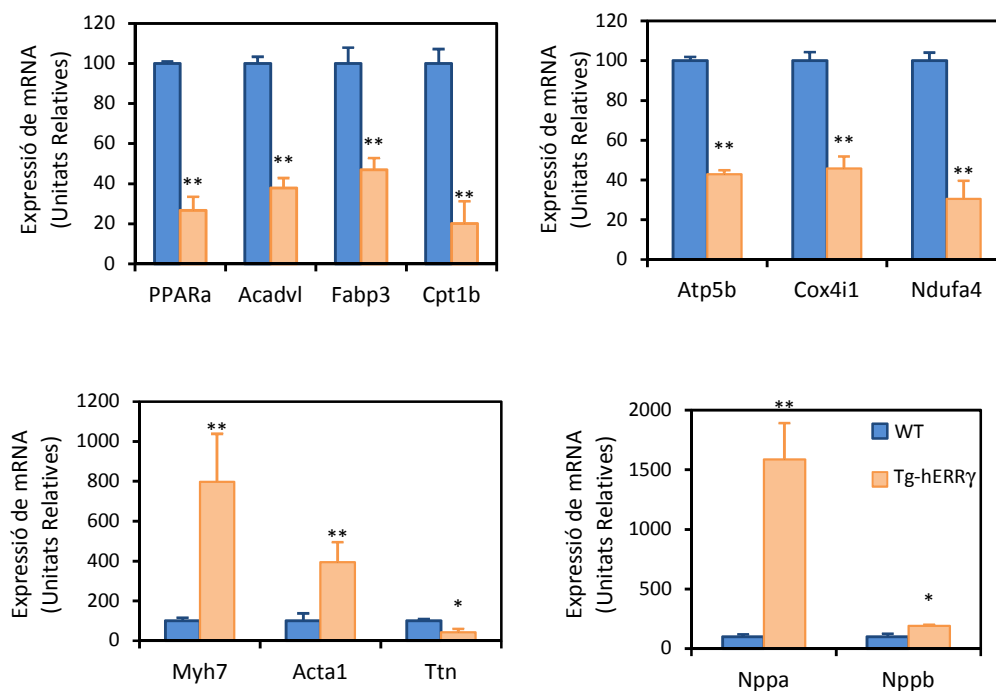
**Figura 4.33. Taxa de supervivència dels ratolins transgènics.** La taxa de supervivència es va mesurar mitjançant el recompte del nombre d'animals que morien al llarg del temps durant 30 setmanes. Els resultats estan expressats en %.

### 4.4.4. Anàlisi de l'expressió gènica en cor d'animals transgènics Tg-hERR $\gamma$

Com s'ha descrit en apartats anteriors, els animals diabètics db/db tenen alterats els nivells d'expressió de gens relacionats amb el metabolisme oxidatiu i la funció contràctil. A més, aquests animals també tenen incrementats els nivells d'expressió d'ERR $\gamma$  en comparació amb els individus control. Per altra banda, també hem vist que la sobreexpressió de hERR $\gamma$  en cardiomiòcits reproduïx parcialment els patrons d'expressió gènica observats en els ratolins diabètics, augmentant els nivells d'expressió de gens associats al metabolisme de

lípidis i alterant els nivells d'expressió de gens implicats en la funció contràctil del cor. Tenint en compte això, es va analitzar l'expressió gènica als cors de les diferents línies d'animals transgènics a 10 setmanes d'edat per tal de comprovar si la sobreexpressió de hERR $\gamma$  és capaç de reproduir els patrons d'expressió gènica observats en el model diabètic db/db i en cardiomiocits en els quals s'ha sobreexpressat la proteïna.

Contràriament al que es va observar en els estudis amb animals diabètics, els resultats obtinguts mostren que es produeix una severa disminució en els nivells d'expressió dels gens implicats en el metabolisme de lípidis com *Ppara*, *Acadvl*, *Fabp3* o *Cpt1b* (Figura 4.34). Així mateix, el nivells d'expressió de gens associats a la fosforilació oxidativa com *Atp5b*, *Cox4i1* i *Ndufa4* també es troben disminuïts en els ratolins transgènics en comparació amb els controls (Figura 4.34), a diferència del que es va veure en els cors diabètics on no hi havia canvis en els nivells d'expressió.

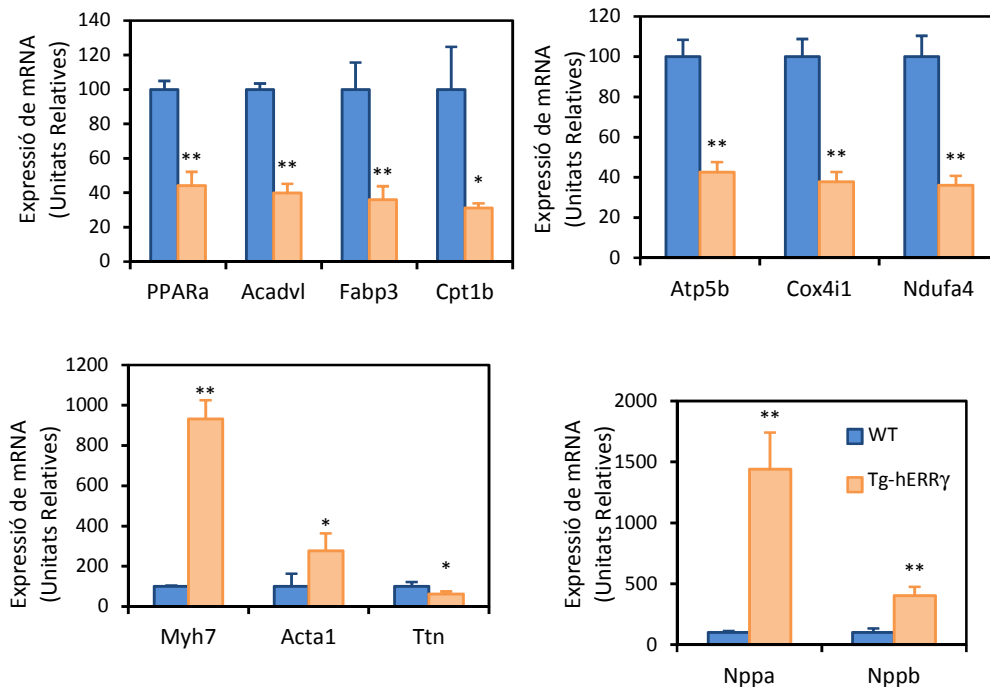


**Figura 4.34. Anàlisi de l'expressió gènica a cor dels animals de la línia transgènica L1.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=4 animals/grup); \* $P \leq 0,05$ . \*\* $P \leq 0,01$ .

## Resultats

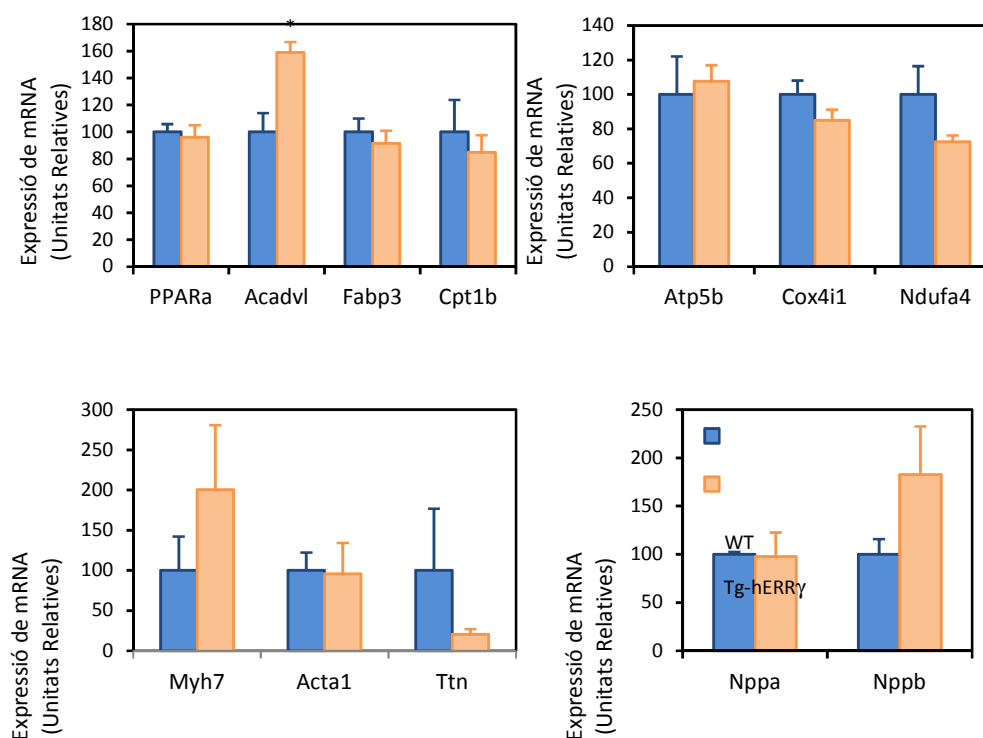
Els nivells d'expressió a cor de gens associats amb la funció contràctil es troben alterats en els animals transgènics (Figura 4.34). En aquest sentit, es important destacar que *Myh7*, freqüentment associat a patologies cardíaques està altament incrementat, i coincideix amb el que s'havia observat prèviament en animals diabètics db/db. A més, l'expressió dels pèptids natriurètics *Nppa* i *Nppb* també es troben augmentats en els cors dels transgènics, d'acord amb l'elevat grau de disfunció cardíaca observada.

Resultats molt semblants es van observar en la línia L2 de ratolins transgènics (Figura 4.35). Tants els nivells d'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic com en la fosforilació oxidativa es troben disminuïts, mentre que l'expressió de gens associats a la funció contràctil del cor està alterada. Tal i com passava en els cors dels ratolins de la línia L1, s'observa un increment en l'expressió de *Myh7*, *Nppa* i *Nppb*, el que indica la presència de disfunció cardíaca en aquests animals.



**Figura 4.35. Anàlisi de l'expressió gènica a cor dels animals de la línia transgènica L2.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=4 animals/grup); \* $P < 0,05$ . \*\* $P < 0,01$ .

Quan es van analitzar els nivells d'expressió en els cors dels ratolins transgènics de la línia 3, que és la que menys sobreexpressa el transgen a cor i en la que no es van trobar alteracions funcionals significatives, no es va observar el mateix patró d'expressió gènica (Figura 4.36). Amb excepció d'algun gen com *Acadvl*, que es troba lleugerament incrementat en el cor dels ratolins transgènics, no s'observen diferències en els nivells d'expressió dels gens analitzats relacionats amb el metabolisme oxidatiu i la funció contràctil entre animals transgènics i controls. Si bé és cert que *Myh7* i *Nppb* presenten un increment en la seva expressió, aquest no és estadísticament significatiu.



**Figura 4.36. Anàlisi de l'expressió gènica a cor dels animals de la línia transgènica L3.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins *db/db* i *db/+*. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM ( $n=4$  animals/grup); \* $P<0,05$ .

En general, els resultats obtinguts en les línies 1 i 2 indiquen que hi ha una alteració en l'expressió gènica associada a la disfunció cardíaca derivada de la sobreexpressió de 2xFlag-

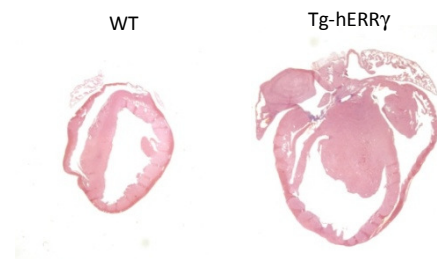
## Resultats

hERR $\gamma$ . Els resultats, però, no són consistents amb el que havíem observat en els estudis *in vitro*, que eren semblants al que s'havia vist en els models diabètics. Aquesta diferència en el patró d'expressió observat *in vivo* bé podria ser conseqüència de la disfunció cardíaca observada en els ratolins transgènics de les línies 1 i 2, ja que en altres estudis s'ha observat una associació entre la disfunció cardíaca i nivells d'expressió baixos en la oxidació d'àcids grassos i la fosforilació oxidativa (Doenst T et al. 2010, Stride N et al. 2013).

### 4.4.5. Anàlisi histològic dels cors en animals de la línia transgènica L2 que sobreexpressen hERR $\gamma$

Donat que els individus de la línia transgènica L3 no presenten disfunció cardíaca ni alteracions en els nivells d'expressió de gens associats a la cardiomiopatia diabètica i els ratolins de la línia L1 presenten un fenotip molt semblant als de la línia L2 pel que respecta a l'expressió gènica i la funció cardíaca, el subsegüents estudis es van realitzar exclusivament en animals de la línia L2, que és la que presentava un valor intermedi de sobreexpressió del transgen.

La primera diferència significativa que es pot observar en els cors dels animals transgènics respecte als controls en disseccionar els animals és una augment important en la seva mida (Figura 4.37). Aquest increment en la mida del cor dels animals transgènics ve acompanyat d'un augment en la massa cardíaca (L2-Tg-hERR $\gamma$  = 144  $\pm$  5,4 mg; WT = 108  $\pm$  6,2 mg). Els ratolins transgènics també presenten un augment en el pes respecte dels WT, tot i que aquest canvi no és significatiu (L2-Tg-ERR $\gamma$  = 22  $\pm$  0,2 g; WT = 29  $\pm$  3,2 g).

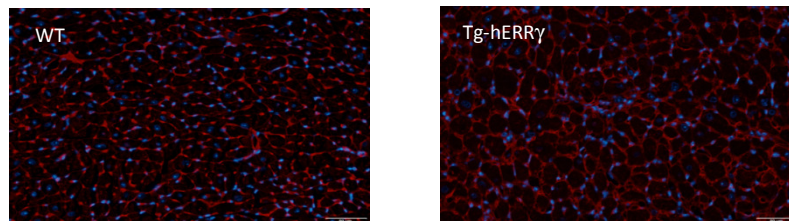


**Figura 4.37. Anàlisis histològic dels cors de la línia transgènica L2.** Seccions longitudinals dels cors dels animals Tg-hERR $\gamma$  i WT es van tenyir amb Hematoxilina-Eosina per determinar l'estructura cardíaca.

A diferència amb el que es veia en el model diabètic, s'observa una evident augment de la mida del ventricle associat, però, a un menor gruix de les parets del mateix del cor en els

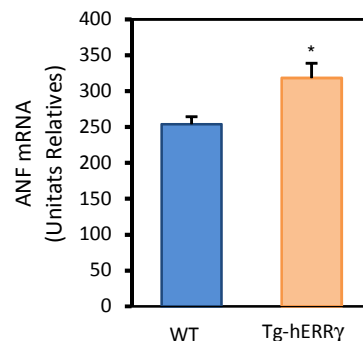
animals transgènics, encara que aquesta disminució no és significativa (Figura 4.31). Aquest patró morfològic es però més típic d'una cardiomiopatia dilatada, i no pas al de la cardiomiopatia diabètica que es caracteritza per una hipertròfia de les parets ventricular.

Per determinar si les alteracions en l'estructura cardíaca està acompanyada d'una hipertròfia dels cardiomiòcits, es va analitzar la mida d'aquests mitjançant la tinció amb lectina marcada amb un fluorocrom, el que permet distingir clarament el contorn cel·lular i així determinar-ne l'àrea transversal.



**Figura 4.38. Anàlisi de la mida dels cardiomiòcits dels cors dels ratolins Tg-hERRγ i WT de la línia L2.** La mida dels cardiomiòcits es va determinar mesurant l'àrea cel·lular en talls histològics tenyits amb lectina. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=4 animals/grup). \*P $\leq$ 0,05.

Els resultats obtinguts rebel·len que hi ha un increment en la mida dels cardiomiòcits en el cor transgènic d'aproximadament un 25% (Figura 4.38), el que està en consonància amb la clara disfunció contràctil observada en aquests animals. El increment en la mida dels cardiomiòcits també es correspon amb el increment en l'expressió del marcador d'hipertròfia ANF que s'observa en aquests animals (Figura 4.39).

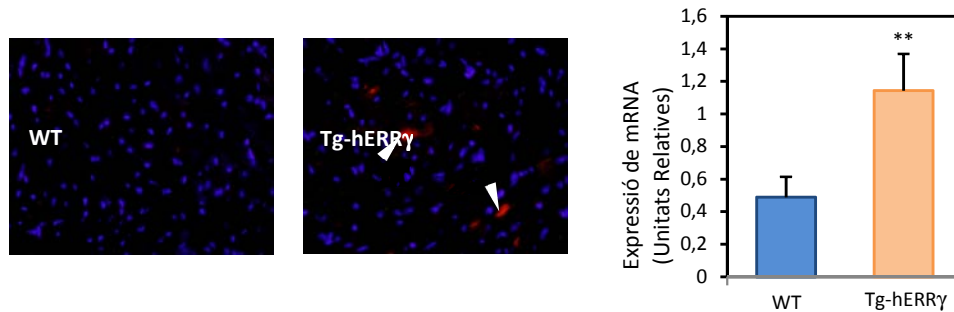


**Figura 4.39. Anàlisi de l'expressió d'ANF en cors dels ratolins Tg-hERRγ i WT de la línia L2.** Els nivells de mRNA es va determinar mitjançant RT-qPCR a partir de cors de ratolins db/db i db/+. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=8 animals/grup); \*P $\leq$ 0,05.

Com ja s'havia vist en altres estudis i hem comprovat anteriorment en el model diabètic db/db, es produeix un augment en la mort cel·lular per apoptosi associada a cardiomiopatia

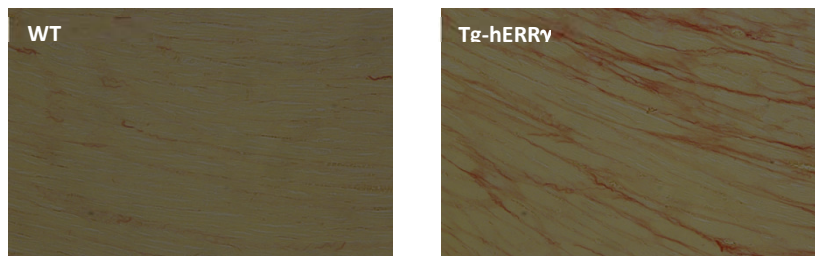
## Resultats

diabètica-. Per tal de determinar si la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  pot induir mort cel·lular en el cor de manera semblant a la observada en el model de diabetis, es van realitzar anàlisis immunohistoquímics amb un anticòs contra la caspasa 3 activa en seccions dels cors transgènics L2-hERR $\gamma$ . Tal i com es pot observar en els resultats, hi ha un augment de gairebé tres vegades en l'apoptosi en els animals transgènics respecte dels WT (Figura 4.40).



**Figura 4.40. Anàlisi de la mort cel·lular per apoptosi en els cors dels ratolins Tg-hERR $\gamma$  i WT de la línia L2.** La mesura de l'apoptosi es va realitzar mitjançant immunohistoquímica amb un anticòs contra la forma activa de la caspasa 3. Els resultats estan expressats en mitjana  $\pm$  SEM (n=3 animals/grup). \*\* $P \leq 0,01$ .

Per últim, també es va mesurar la presència a cor de dipòsits de col·lagen intersticial mitjançant tinció específica amb Sirius Red per determinar la presència de fibrosi, quelcom habitual en models i pacients amb cardiomiopatia diabètica en estat molt avançat, així com en altres patologies cardíaques greus. Tal i com es pot observar en la Figura 4.41, es produeix un increment de la fibrosi en els cors dels animals transgènics quan es comparen amb els controls.



**Figura 4.41. Anàlisi de la fibrosi en els cors dels ratolins Tg-hERR $\gamma$  i WT de la línia L2.** La presència de fibrosi a cor es va determinar mesurant els dipòsits de col·lagen mitjançant una tinció específica amb Sirius Red (n=3 animals/grup).

Els resultats obtinguts indiquen que la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  a cor produeix canvis en la seva morfologia i estructura que incluen una dilatació de la cavitat ventricular, un aprimament de

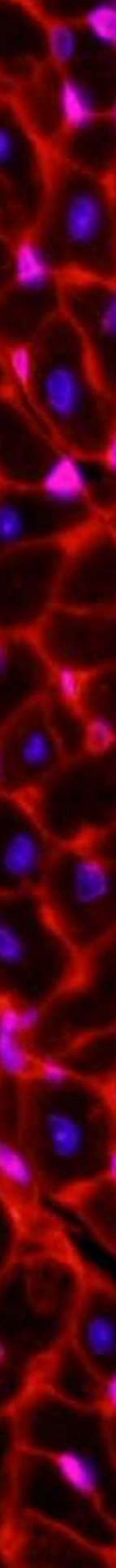
les parets del ventricle, així com un augment en l'apoptosi i en la mida dels cardiomiòcits. Aquestes alteracions van acompanyades d'un increment de la fibrosi intersticial. Tot plegat està associat a una severa disminució de l'activitat contràctil del cor. Per tant, la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  per sobre d'uns determinats valors llindars és suficient per a induir una severa disfunció cardíaca, si bé les característiques d'aquesta difereix en alguns aspectes de l'observada en models de diabetis.





## Discussió

---





## 5. Discussió

La incidència de les malalties cardiovasculars ha crescut de manera dràstica en les últimes dècades, en paral·lel al increment de la prevalença de la diabetis tipus 2, una malaltia que afecta actualment a més de 350 milions de persones a tot el món i que representa aproximadament el 10% de la població adulta. Tot i que la prevalença de la cardiomiopatia diabètica és considerablement alta entre la població diabètica, no es coneixen amb exactitud els mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament i la progressió de la malaltia. En aquest treball hem dut a terme un estudi encaminat a identificar les xarxes gèniques que es troben alterades en cors de ratolins diabètics, utilitzant com a model d'estudi els ratolins db/db, un model caracteritzat per obesitat mòrbida i una manifesta DMII. La identificació de les principals xarxes gèniques alterades en cors diabètics en ha permès, primer de tot, identificar els principals processos metabòlics i cel·lulars que es troben alterats en la cardiomiopatia diabètica, i també ha permès també identificar ERRγ com un possible regulador de les alteracions característiques que s'observen en la cardiomiopatia diabètica.

### 5.1 Els ratolins db/db com a model per a l'estudi de la cardiomiopatia diabètica

En humans, la cardiomiopatia diabètica es caracteritza per una funció cardíaca anòmala associada a alteracions estructurals en el cor [Fang et al., 2004, Devereux 2000, Lee 1997]. Les anomalies morfològiques i funcionals que s'observen en els cors de pacients diabètics inclouen la hipertròfia del ventricle esquerre associada a un increment del gruix i de la massa ventricular, la disfunció ventricular, la hipertròfia dels cardiomiòcits, la esteatosi cardíaca, la mort cel·lular per apoptosi dels cardiomiòcits i, en etapes més avançades de la malaltia, la fibrosi intersticial. Aquestes anomalies no coincideixen exactament amb les observacions realitzades en el model diabètic de ratolins db/db de 12 setmanes d'edat, en els quals s'observen únicament lleugeres alteracions estructurals. A més, però, s'ha observat també una major acumulació de lípids en el teixit cardíac, un increment en l'apoptosi i una hipertròfia dels cardiomiòcits, però que no afecten significativament a la funció cardíaca. La manca de greus alteracions estructurals en el cor dels ratolins db/db a les 12 setmanes es tradueix en l'absència de canvis en la fracció d'escurçament dels cors diabètics en comparació amb els controls.

Tot i que els ratolins db/db s'han utilitzat freqüentment com a model per l'estudi de la cardiomiopatia diabètica, els diversos estudis que s'han dut a terme per analitzar la funció cardíaca en aquests animals han proporcionat resultats contradictoris en relació a la presència o no d'alteracions en l'estructura o funcions ventriculars. Aquesta variabilitat

## Discussió

pot ser deguda a diferències en la metodologia utilitzada per determinar la funció del cor, o a l'edat dels animals que s'han fet servir en l'estudi. Estudis *ex vivo* en preparacions de Langendorff demostren la presència d'alteracions funcionals en cors d'animals db/db fins i tot a edats primerenques (Aasum 2003, Belke 2000, Carley 2004, Boudina 2007), mentre que la utilització de tècniques electrocardiogràfiques dóna resultats més variables. Per exemple, alguns estudis ecocardiogràfics revelen disfunció contràctil en ratolins db/db a 12 setmanes d'edat (Carley 2004, Semeniuk 2002), però no a les 6 setmanes (Semeniuk 2002). En canvi, en altres estudis amb ecocardiografia en ratolins db/db de fins a 16 setmanes d'edat no es reproduïen aquests resultats i no s'observen alteracions significatives ni en la estructura ni en la funció cardíaca (Daniels 2010, Li 2014). Si bé l'ecocardiografia és la tècnica més utilitzada, la seva elevada variabilitat recomana el seu ús en combinació amb altres tècniques que puguin complementar-la i reforçar els resultats obtinguts. Altres mètodes com la ressonància magnètica també han permès observar alteracions de la CMD com la hipertròfia cardíaca i la disfunció contràctil en aquest model diabètic. També és cert que a edats primerenques només es poden observar canvis subtils en l'estructura cardíaca, i no és fins a edats més avançades que aquestes alteracions es fan més evidents i van acompanyades d'una disminució en la fracció d'ejecció (Yu 2007).

No obstant, malgrat l'absència d'alteracions estructurals importants en els ventricles dels animals db/db, els nostres resultats demostren que aquests ratolins presenten alteracions a nivell cel·lular que són característiques de la cardiomiopatia diabètica, i que s'ha observat tant en models animals de CDM com en pacients. Aquestes inclouen la hipertròfia dels cardiomiòcits, l'acumulació de lípids i l'augment en la mort cel·lular. Aquests resultats, doncs, indiquen que els ratolins db/db de 12 setmanes d'edat poden constituir un bon model per l'estudi de la cardiomiopatia diabètica en les etapes primerenques, on ja hi ha alteracions cel·lulars importants tot i que aquestes no es tradueixen en una disfunció contràctil evident, o almenys el suficientment important com per a que pugui ser detectada mitjançant les tècniques ecocardiogràfiques.

Així com el model db/db és utilitzat freqüentment en l'estudi de la DMII, el model de diabetis induïda per STZ és el més comú en el context de la DMI. Al igual que passa amb els models de DMII, la detecció d'alteracions manifestes en la funcionalitat del cor depèn en gran mesura de les tècniques emprades, i mentre que alguns dels estudis no detecten canvis en la funció contràctil (Nielsen/Bartens/Bollano JBC 2002), d'altres sí que ho fan (Kajstura, diabetis 2001; Van Linthout Bas Res Cardiol 2008). En aquests últims, s'observa un increment de la pressió intraventricular diastòlica i una disminució de la pressió sistòlica ventricular als 7 i 30 dies després d'iniciar la DMI (Kajstura, diabetis 2001;) o a les 6 setmanes (Van Linthout Bas Res Cardiol 2008). En els casos citats la mesura de la funció cardíaca es va realitzar mitjançant la implantació d'un microcatèter, i contrasta amb l'ús de l'ecocardiografia que nosaltres vam emprar en el nostre estudi. Davant la

manca d'alteracions evidents en l'estructura cardíaca o la funció ventricular en el nostre estudi amb animals amb DMI de 6 setmanes, ens vam fixar en la presència de certs marcadors descrits com a típics de la CMD. Per la facilitat amb la que es pot analitzar i la seva sensibilitat, vam determinar els nivells de mRNA de gens l'expressió dels quals se sap que està alterada en models de DMI induïda per STZ, com ara gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos (*Ppara*, *Pdk4*, *Acadm*, *Cpt1b*, etc) o gens del sistema OxPhos (*Atp5b*, *Cyts*, *Cox8b*) (Finck, JCI, 2002; Depre, J. Mol Cell Cardiol 2000; Flarsheim, Am J. Physiol 1996). La manca d'alteracions en l'expressió d'aquests gens marcadors (amb l'excepció de *Pdk4*) en els nostres animals amb DMI de 1 o 6 setmanes, juntament amb la manca d'evidències de la presència de disfunció cardíaca ens fa fer dubtar sobre la idoneïtat d'aquest model, almenys a les edats a les que vam realitzar l'estudi. A part de la limitació que pot presentar aquest model en quant a la toxicitat extrapancreàtica de la STZ (Bolzan and Bianchi, Mutat Res 2002), la dificultat en mantenir aquests animals vius sense administrar-los insulina més enllà de les 7 setmanes ens va fer decantar pel l'ús del model de ratolí db/db amb DMII. A més, el model de DMII pot reflectir més fidelment la patofisiologia humana de la CMD, doncs més del 90% dels cassos de diabetis en humans corresponen a DMII.

## 5.2 Alteracions metabòliques en la cardiomiopatia diabètica

L'anàlisi del perfil d'expressió gènica en cors de ratolins db/db de 12 setmanes mostra que les principals xarxes gèniques alterades en aquest model són principalment aquelles relacionades amb el metabolisme mitocondrial, i molt particularment amb l'oxidació d'àcids grassos com *Acads*, *Acadvl*, *Acsm5*, *Agpat3*, *Angptl4*, *Fabp3*, *Fatp1*, *Hadh*, *Hmgcs2*, *Lipe*, *Pdk4*, *Peci* i *Scd4*. A més, hem observat un increment en l'expressió dels gens implicats en la  $\beta$ -oxidació peroxosomal (*Ech1*, *Ehhadh*). Tot i que en estudis previs realitzats per altres investigadors (Buchanan et al., 2005, Boudina et al., 2007) s'havia observat un increment en l'expressió d'alguns gens relacionats amb l'oxidació d'àcids grassos com per exemple *Acadm*, *Acadl*, *Acadvl* o *Hadha*, els nostres resultats demostren que el metabolisme del cor diabètic està associat a l'activació global de tot el programa genètic implicat en el catabolisme d'àcids grassos. Si bé nosaltres no hem mesurat directament la capacitat del teixit cardíac d'animals db/db per oxidar àcids grassos, altres autors han demostrat de manera inequívoca que aquest model animal presenta elevades tasses d'oxidació de palmitat en comparació amb animals sans (Belke, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000; Buchanan, Endocrinology, 2005; Aasum, diabetes 2003). De manera similar, estudis amb altres models animals amb CMD com ara els ratolins ob/ob (Mazumder, diabetes 2004) o models d'obesitat i resistència a insulina induïda per dieta (Wirght, Cardiovascular research 2009) també han descrit un increment en el l'oxidació de lípids en el teixit cardíac. Per tant, podem concloure que els nostres resultats

## Discussió

clarament mostren que el metabolisme del cors diabètics es caracteritza per un increment exacerbat del catabolisme lipídic.

A més, els resultats que hem obtingut indiquen que els canvis en l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme va més enllà d'un increment en l'expressió de gens involucrats en la  $\beta$ -oxidació, ja sigui mitocondrial o peroxisomal. El nostre estudi mostra que els cors d'animals diabètics presenten també un increment en els nivells d'expressió de gens implicats en la captació (*Fatp1*), el transport (*Fabp3*) i la síntesi de lípids (*Acsm5*, *Agpat3*, *Scd4*). L'alteració d'aquests gens no només pot contribuir directament a l'increment de l'oxidació d'àcids grassos, sinó que també a la esteatosi cardíaca que pateixen els animals db/db. Aquesta acumulació neta de triglicèrids en el teixit cardíac d'animals diabètics clarament indica que la captació de lípids excedeix la capacitat del cor d'oxidar els àcids grassos, tot i l'increment en la  $\beta$ -oxidació.

També hem observat una disminució en l'expressió de gens associats al metabolisme de la glucosa com ara *Gck* o *Pfkfb2* en els cors diabètics, el que pot contribuir a la reducció en la utilització de la glucosa a cor característica de la CMD.

Un aspecte del nostre estudi que ha resultat, fins a cert punt, sorprenent, és el fet de no haver trobat alteracions significatives en l'expressió de gens implicats en la fosforilació oxidativa, més enllà d'un discret augment en l'expressió dels gens *Cox6b2* o *Atp5b*. Tot i que nombrosos estudis han descrit una clara disfunció mitocondrial en pacients i models animals amb CMD, com ara una disminució de la capacitat i eficiència respiratòria (Flarsheim *Am J Physiol* 1996; Shen *Am J. Physiol Endocrinol Metab* 2004) i també alteracions estructurals (Giacomelli *J Lab Invest* 1979; Aragno, *Endocrinology*, 2008), diversos estudis han demostrat l'existència d'un increment en l'expressió de gens mitocondrials i en els nivells de proteïnes mitocondrials, així com un augment de la biogènesi mitocondrial (Shen *Am J. Physiol Endocrinol Metab* 2004; Duncan, *Circulation*, 2007; turko *J Biol Chem* 2003). Això inclou també el model db/db, en els que s'ha observat un augment de la massa mitocondrial i el contingut en DNA mitocondrial associat a un increment, encara que modest, en l'expressió de gens OxPhos (Boudina, *Diabetes*, 2007). Aquest increment en l'expressió de gens mitocondrials s'ha interpretat com a una mesura per a compensar la disfunció mitocondrial observada en la CMD i un intent per intentar fer front a l'enorme flux d'àcids grassos que arriben a aquest òrganul. Tot i això, no tots els models de CMD presenten un augment de l'expressió de gens mitocondrials. Per exemple, l'anàlisi proteòmic dels cors de ratolins Akita, un model de DMI, no revela canvis significatius en els nivells de proteïnes del sistema OxPhos o el cicle dels àcids tricarbòxilics (Bugger *Diabetes*, 2009). D'altres estudis duts a terme prèviament amb el model diabètic db/db han descrit una disminució en la biogènesi mitocondrial i l'expressió de gens associats a la fosforilació oxidativa que afecta a la funció mitocondrial (Wang 2015, Kuo 1983), el que estaria més d'acord amb les nostres dades.

En els nostres resultats també s'ha observat un increment en els nivells d'expressió de gens com *Cat*, *Ucp2* i *Ucp3*. Aquestes proteïnes tenen un paper fonamental en el control de la producció de ROS, pel que l'increment en la seva expressió pot ser interpretada com a un indicatiu de l'existència d'estrès oxidatiu que la cèl·lula cardíaca intenta disminuir tot incrementant els nivells d'aquestes proteïnes. L'increment de l'estrès oxidatiu present en el cor dels ratolins db/db i documentat per altres autors (Boudina Diabetes, 2007), podria estar contribuint a la mort cel·lular observada en el nostre model diabètic. El paper rellevant de l'estrès oxidatiu en la fisiopatologia de la CMD està recolzat per estudis en els que la disminució dels nivells de ROS mitjançant la sobre-expressió de catalasa (Ye et al, Diabetes, 2004) o superòxid dismutasa mitocondrial (Shen, diabetes 2006) millora la capacitat contràctil del cor d'animals diabètics.

Les nostres dades suggereixen que les alteracions metabòliques que sofreix el cor diabètic no són només el resultat de la inhibició de la glucòlisi fruit de la resistència a la insulina i d'una major disponibilitat d'àcids grassos, sinó que la inflexibilitat metabòlica que caracteritza la CMD és fruit també d'una alteració en l'expressió de les xarxes gèniques implicades, principalment, en el control del metabolisme lipídic.

### 5.3 ERR $\gamma$ com a possible mediador de les alteracions en l'expressió gènica observada en la cardiomiopatia diabètica

En el nostre estudi hem identificat ERR $\gamma$  com un potencial regulador de les alteracions en l'expressió gènica que donen lloc a les anomalies metabòliques característiques de la cardiomiopatia diabètica. Si bé l'anàlisi realitzat amb el software IPA per tal de trobar possibles reguladors de les xarxes gèniques que es troben alterades en el cor dels ratolins db/db va identificar el receptor ERR $\alpha$ , i no pas ERR $\gamma$ , com a un node regulador important (Figura 4.16), cal dir que el software basa la seva predicció en dades prèviament validades i publicades que demostren una acció reguladora del factor de transcripció considerat amb els gens que es troben diferencialment expressats en la mostra. Per tant, considerant que, com s'ha descrit en l'apartat d'introducció, els diferents membres de família dels ERR s'uneixen als mateixos ERRE i en general regulen els mateixos gens diana, no ha de sorprendre que el software IPA identifiqués ERR $\alpha$  com a un regulador important en cors diabètics, doncs ERR $\alpha$  és el factor més estudiat d'aquesta família de receptors nuclears i del que s'han identificat de manera inequívoca més gens diana. Tot i això, el fet de que l'expressió d'ERR $\alpha$  no estigui significativament incrementada en cors d'animals diabètics i que, en canvi, l'expressió d'ERR $\gamma$  ho estigui més de dues vegades recolza la nostra conclusió de que ERR $\gamma$  és un dels principals factors responsables de gran part de les alteracions en l'expressió gènica observada en cors de ratolins db/db.



## Discussió

Així com els anàlisis d'expressió gènica ens han revelat un increment en els nivells de mRNA d'ERR $\gamma$  en els cors diabètics, la manca d'un anticòs suficientment sensible i específic per detectar aquesta sobreexpressió no ens ha permès completar els nostres estudis amb un anàlisi de l'expressió de la proteïna. Tot i que no s'ha descrit en l'apartat de resultats, durant aquest treball s'han provat diversos anticossos comercials contra ERR $\gamma$  i també ERR $\alpha$ . Si bé aquests anticossos eren capaços d'identificar de manera específica les respectives proteïnes recombinants ERR $\alpha$  i ERR $\gamma$ , malgrat que amb poca afinitat, no vam aconseguir identificar de manera inequívoca les proteïnes endògenes en teixit cardíac. A més, aquest contratemps ens va obligar a buscar alternatives, com és la generació de la proteïna recombinant a la que se li ha afegit l'epítot Flag, per realitzar els diferents estudis de sobreexpressió tant *in vivo* com *in vitro*.

El possible paper d'ERR $\gamma$  en la patofisiologia de la cardiomiopatia diabètica no només està evidenciat pel fet que els seus nivells d'expressió es troben significativament augmentats en el cor diabètic, sinó que a més, la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  en cardiomiòcits HL-1 en cultiu produeix un increment en l'expressió de gens associats a l'oxidació d'àcids grassos. És interessant destacar que estudis d'immunoprecipitació de la cromatina realitzats al nostre laboratori per altres investigadors demostren que ERR $\gamma$  es recluta a les regions promotores de gens que representen passos claus del metabolisme de lípids com *Fabp3*, *Cpt1b* i *Pdk4*, i que tots ells es troben incrementats tant en cors d'animals diabètics com en cèl·lules HL-1 que sobreexpressen ERR $\gamma$  (Lasheras et al., 2016). Això clarament indica que ERR $\gamma$  actua directament regulant l'expressió d'aquests gens i recolza la nostra hipòtesi de que ERR $\gamma$  és un mediador clau de les alteracions gèniques i metabòliques que tenen lloc en la CMD.

Altres aproximacions experimentals utilitzades al nostre laboratori en les que es van fer servir cardiomiòcits neonatals de rata en cultiu com a model d'estudi també han demostrat que la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  és suficient per a reproduir algunes de les alteracions cel·lulars que caracteritzen la CMD, incloent-hi l'alteració del metabolisme oxidatiu i la inducció de hipertròfia (Lasheras et al., 2016). De la mateixa manera que es va observar en cèl·lules HL-1, la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  en cultius primaris de cardiomiòcits neonatals de rata dona lloc un augment generalitzat de gens implicats en la  $\beta$ -oxidació, tant mitocondrial com peroxisomal. Aquesta alteració en l'expressió gènica va acompanyada per un augment significatiu de l'oxidació de palmitat i un augment de la mida dels cardiomiòcits. Aquests estudis funcionals recolzen la nostra hipòtesi de que ERR $\gamma$  és un element clau en la patofisiologia de la CMD,

La sobreexpressió d'ERR $\gamma$  en els cors diabètics estaria contribuint no només al increment en l'oxidació d'àcids grassos mitjançant la regulació directa de gens de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial i peroxisomal, sinó també augmentant l'expressió del gen que codifica per

PDK4, la cinasa que fosforil·la l'enzim piruvat deshidrogenasa (PDH) inhibint-ne la seva activitat. La inhibició de PDH dóna lloc a la inhibició de l'oxidació de la glucosa i afavoreix l'oxidació de lípids, tal i com s'ha descrit en estudis anteriors (Dufour et al., 2007, Zhang et al., 2006).

Tot i que s'ha descrit que la sobreexpressió d'ERR $\alpha$  en cardiomiòcits en cultiu és suficient per incrementar l'acumulació intracel·lular de lípids, en el treball realitzat al nostre laboratori no s'ha observat un increment en l'acumulació de triglicèrids en els cardiomiòcits al sobreexpressar ERR $\gamma$  (Lasheras, MCE2016). Estudis anteriors han demostrat que ERR $\alpha$  i ERR $\gamma$  comparteixen gran part dels seus gens diana i que regulen l'expressió, entre d'altres, de gens implicats en la captació i el transport d'àcids grassos (Dufour 2007). Els nostres resultats demostren que, tot i produir-se un increment en l'expressió de gens associats a la captació d'àcids grassos, això no es reflexa en una major acumulació de lípids. És possible que, en les condicions assajades in vitro, l'increment en l'oxidació d'àcids grassos que resulta de la sobre-expressió d'ERR $\gamma$  és superior a la taxa de transport d'aquests a l'interior cel·lular, de manera que si bé ERR $\gamma$  incrementa el transport lipídic mitjançant un increment en l'expressió de *Fatp1* o *Fabp3*, això no es veu reflectit en una major acumulació de triglicèrids.

Els experiments duts a terme en el nostre laboratori també han revelat una desregulació en l'expressió de gens relacionats amb la funció cardíaca en els cors diabètics. Curiosament, alguns d'aquests gens implicats en la funció contràctil del cor, com *Myh7* i *Acta1*, han estat identificats com gens diana d'ERR $\gamma$  (Dufour et al., 2007). L'increment en l'expressió de *Myh7* que s'observa en els cors diabètics és compatible amb un efecte directe d'ERR $\gamma$  en la regulació del programa contràctil cardíac en els ratolins db/db. Aquesta desregulació en l'expressió de gens de la maquinària contràctil del cor també l'hem pogut observar quan augmentem l'expressió d'ERR $\gamma$  en cultius de cardiomiòcits HL-1. El fet de que alguns gens relacionats amb la funció contràctil com *Acta1*, *Myl7* o *Ttn* tinguin disminuïda l'expressió, suggereix que la desregulació d'alguns gens de la maquinària contràctil podria ser secundària a la regulació d'ERR $\gamma$ .

Segons el que s'ha descrit en els paràgrafs anteriors, és evident que la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  en cardiomiòcits en cultiu reproduïx moltes de les característiques més rellevants de la CDM i ens permet suggerir que ERR $\gamma$  juga un paper preponderat en la patogènesi de la CDM.

L'anàlisi dels reguladors transcripcionals també ha identificat a PPAR $\alpha$  com un important nòdul associat al perfil d'expressió gènica dels cors diabètics. Aquest resultat concorda amb el paper que es coneix de PPAR $\alpha$  en el control de l'expressió de gens implicats en el catabolisme lipídic en diferents teixits, entre d'ells el cor. De fet, nombrosos estudis han relacionat també PPAR $\alpha$  amb les alteracions metabòliques que trobem en el cor diabètic

## Discussió

(Barger 2000, Finck 2002, Fink 2003, Burkart 2007). Per començar, i de manera consistent amb els nostres resultats obtinguts a partir dels estudis realitzats en els cors dels ratolins db/db, els nivells de mRNA i proteïna de PPAR $\alpha$  es troben incrementats en els cors de models murins de diabetis tipus 1 i 2 (Finck et al., 2002). A més, la sobreexpressió específica a cor de PPAR $\alpha$  també reproduïx parcialment el fenotip metabòlic i la disfunció cardíaca que caracteritzen als individus amb cardiomiopatia diabètica. Concretament, s'ha observat que la sobreexpressió de PPAR $\alpha$  en cors de ratolins donen lloc a un increment en l'expressió de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos (com per exemple *Acox* o *Cpt1b*), a l'estimulació en l'oxidació de palmitat, a la reducció en la utilització de glucosa, a esteatosi cardíaca i a hipertrofia ventricular associada a una disfunció contràctil (Finck et al., 2002)

La importància de PPAR $\alpha$  en la patofisiologia de la cardiomiopatia diabètica és compatible amb el paper rellevant que nosaltres pensem que té ERR $\gamma$ . En primer lloc i com s'ha descrit en els paràgrafs anteriors, ERR $\gamma$  no només regula l'expressió de gens implicats en el metabolisme d'àcids grassos juntament amb PPAR $\alpha$ , sinó que controla un ampli programa genètic indispensable per una correcta funció cardíaca, incloent-hi el metabolisme de carbohidrats, la biogènesi mitocondrial, la maquinària contràctil i la funció electrofisiològica [71, 74]. La gran majoria d'aquestes vies, si no totes, estan alterades en la cardiomiopatia diabètica. En segon lloc, s'ha demostrat que els ERR regulen directament l'expressió de PPAR $\alpha$ , tant en ratolins com en humans, mitjançant la unió directa als elements de resposta (ERRE) que es troba en el promotor del gen que codifica per PPAR $\alpha$  (Huss et al., 2004). Per aquest motiu, podem suggerir que la regulació positiva de PPAR $\alpha$  per part d'ERR $\gamma$  contribuiria a potenciar el fenotip metabòlic de la cardiomiopatia diabètica estimulant l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic.

L'anàlisi amb el software IPA també revela altres nòduls reguladors que estarien controlant alguns dels gens alterats en els cors diabètics. Aquest és el cas de TBX5, un factor de transcripció implicat en el desenvolupament del cor. Diferents estudis demostren que TBX5 és un important regulador de la proliferació cel·lular durant la cardiogènesi i que mutacions en aquest gen donen lloc a cardiopaties congènites (Hatcher et al., 2001). Per altra banda, el factor transcripcional HIF1A, regulador clau en la resposta adaptativa a hipòxia i que controla l'expressió de nombrosos gens implicats en el metabolisme energètic, també apareix com a nòdul de la nostra xarxa regulatòria regulant diferents gens alterats en el cor diabètic, entre ells els reguladores PPAR $\alpha$  o TBX5. Estudis anteriors han demostrat que deficiències en l'expressió de HIF1A comprometen el correcte desenvolupament cardiovascular en etapes embrionàries i en condicions d'hipòxia severa (Iyer et al., 1998, Bohuslavova et al., 2013). Les alteracions en l'expressió d'aquests gens podria explicar, al menys en part, les anomalies estructurals

que s'observen en els cors diabètics, però no es necessiten d'estudis addicionals per determinar la implicació de TBX5 i HIF1A en les alteracions observades en la CDM.

Els resultats obtinguts en aquest estudi suggereixen que l'increment d'ERR $\gamma$  actua com un important mediador dels canvis patològics que es donen en el context de la diabetis. Això pot semblar contradictori donat el paper d'ERR $\gamma$  en la correcta funció cardíaca. Estudis anteriors han demostrat que la manca d'ERR $\gamma$  en ratolins resulta en una disfunció cardíaca letal deguda a la incapacitat del cor per canviar de glucosa a lípids com a font d'energia (Alaynick et al., 2007). Les alteracions metabòliques observades en els cors de ratolins ERR $\gamma$  KO són degudes a una disminució significativa de gens implicats en l'oxidació d'àcids grassos com *Acadm*, *Cpt1a*, *Cpt1b*, *Acaa2* o *Fabp3* (Alaynick et al., 2007), el que està d'acord amb que aquests gens són diana d'ERR $\gamma$ . És interessant destacar que els ratolins ERR $\gamma$  KO presenten una disminució en la mida del cor, en contrast amb el que s'observa en el nostre estudi on veiem un increment en la mida del cor quan sobreexpressem ERR $\gamma$  en teixit cardíac. A més, cal esmentar que en altres estudis s'ha comprovat el paper d'ERR $\alpha$  com a mediador dels canvis adaptatius que tenen lloc al cor en resposta a un increment en la càrrega de treball (Huss 2007). Ratolins ERR $\alpha$  KO sotmesos a estrès cardíac presenten una disminució en els nivells d'expressió de gens associats al metabolisme oxidatiu i desenvolupen disfunció cardíaca, i no és estrany pensar que ERR $\gamma$  pugi tenir un paper similar.

No obstant, el nostre descobriment de que l'increment en l'expressió i l'activitat transcripcional d'ERR $\gamma$  en el context de la diabetis podria resultar perjudicial per la funció cardíaca està recolzat per un estudi recent que mostra un increment d'ERR $\gamma$  en pacients amb cardiomiopatia hipertròfica (Kwon et al., 2013). Encara més important són els resultats obtinguts en aquest estudi que mostren que la inducció d'hipertròfia cardíaca per constricció aòrtica en ratolins dona lloc a un increment en l'expressió d'ERR $\gamma$ , i que tal i com succeeix en el nostre estudi, la sobreexpressió d'ERR $\gamma$  en cultius de cardiomiòcits produeix un fenotip hipertròfic (Kwon et al., 2013). Els nostres resultats també són compatibles amb els obtinguts en un altre estudi on es sobreexpresca ERR $\gamma$  a múscul esquelètic i en el que es pot observar un increment en l'expressió de gens mitocondrials implicats en l'oxidació de lípids (Rangwala et al., 2010). De la mateixa manera, l'activació del catabolisme lipídic mitocondrial mitjançant la sobreexpressió específica a cor de PGC-1 $\alpha$ , un reconegut coactivador dels ERR, dona lloc a un increment en el metabolisme oxidatiu i el consum d'oxigen que resulta en una hipertròfia i una disfunció contràctil del cor [67]. Tots aquests resultats donen suport al fet que la hiperactivació de l'eix regulador PGC-1/ERR resulta perjudicial per la funció cardíaca. Alguns estudis també han demostrat la importància del coactivador PGC-1 com a regulador de la funció mitocondrial (Lehman 2000, Hock 2009) mitjançant la coactivació de gens com PPAR $\alpha$  (Vega 2000) i ERR $\alpha$  (Schreiber 2003). Així doncs, s'ha vist que PGC-1 és necessari en la regulació de la

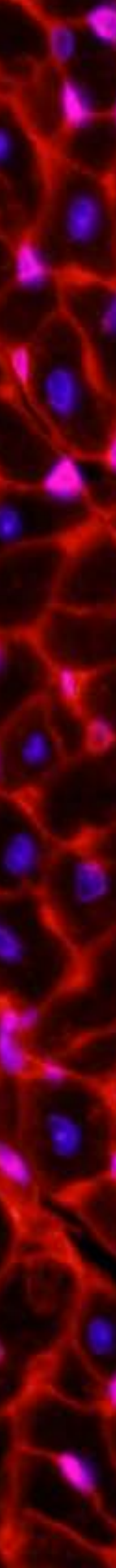
## Discussió

biogènesi i la funció mitocondrial a cor en les etapes postnatsals (Martin-Kelly 2014) i en la resposta adaptativa en les primeres etapes de la resistència a la insulina (Mitra-Duncan 2012). Aquests resultats són compatibles amb els obtinguts en els altres estudis que hem vist i donen consistència al paper d'ERR $\gamma$  en la CMD.

En resum, el nostre estudi ha identificat ERR $\gamma$  com un potencial factor que contribueix a la desregulació metabòlica i les alteracions funcionals de la cardiomiopatia diabètica. El increment d'ERR $\gamma$  en el cor de ratolins diabètics, juntament amb el seu paper com a regulador de l'expressió de gens implicats en el metabolisme de lípids, reforça aquesta hipòtesi. Estudis addicionals són necessaris per demostrar de manera inequívoca i definitiva el paper d'ERR $\gamma$  com a causant en la patofisiologia de la cardiomiopatia diabètica, i establir la seva contribució en el desenvolupament de la malaltia. A més, tenint en compte la presència d'un domini d'unió a lligand, ERR $\gamma$  resulta una diana terapèutica interessant per mitigar o prevenir la cardiomiopatia diabètica amb l'ús de molècules amb activitat antagonista específica.

## Conclusions

---





## 6. Conclusions

Les conclusions derivades del treball realitzat són les següents:

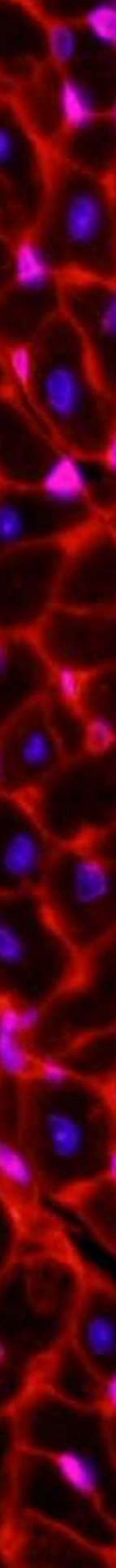
- 1- El model de ratolí db/db amb diabetis de tipus 2 no presenta alteracions estructurals evidents del ventricle esquerre ni disminució de l'activitat contràctil a les 12 setmanes d'edat.
- 2- El cor de ratolins db/db de 12 setmanes d'edat es caracteritzen per un increment de la mort cel·lular, esteatosi cardíaca i hipertròfia dels cardiomiòcits. Aquestes alteracions són característiques distintives de la cardiomiopatia diabètica, pel que podem considerar el ratolí db/db com a un bon model per a l'estudi de les etapes primerenques de la patologia.
- 3- Els estudis del perfil d'expressió gènica de ratolins db/db de 12 setmanes revela que un dels trets característics de la cardiomiopatia diabètica en les seves fases inicials és l'increment de l'expressió de gens implicats en transport, síntesi i oxidació de lípids, així com una desregulació de l'expressió de gens involucrats en l'activitat contràctil del cor i del metabolisme dels carbohidrats.
- 4- L'expressió del mRNA d'ERR $\gamma$  està incrementat en el cor dels ratolins db/db. ERR $\gamma$  constitueix un dels principals nòduls reguladors associats a les alteracions de l'expressió gènica que caracteritzen la cardiomiopatia diabètica.
- 5- *In vitro*, la sobre-expressió d'ERR $\gamma$  en cardiomiòcits HL-1 en cultiu reproduïx parcialment les alteracions gèniques típiques de la cardiomiopatia diabètica, essent suficient per induir l'expressió de gens implicats en el transport i oxidació de lípids, i desregular l'expressió de gens involucrats en l'activitat contràctil del cor.
- 6- *In vivo*, la sobre-expressió d'ERR $\gamma$  de manera específica a cor en ratolins transgènics Tg-hERR $\gamma$  per damunt d'un determinat llindar és suficient per induir una severa cardiomiopatia que dóna lloc a la mort prematura dels animals.
- 7- La cardiomiopatia induïda per la sobre-expressió d'ERR $\gamma$  a cor està associada a un increment de la mort cel·lular, hipertròfia dels cardiomiòcits, fibrosi i una disminució de l'expressió de gens implicats en el catabolisme lipídic i la fosforilació oxidativa.





## Referències

---





## 7. Referències

Achenbach, S., Ropers, D., Regenfus, M., Pohle, K., Giesler, T., Moshage, W., and Daniel, W.G. (2001). Noninvasive coronary angiography by magnetic resonance imaging, electron-beam computed tomography, and multislice computed tomography. *Am J Cardiol* 88, 70E-73E.

Afzal, N., Ganguly, P.K., Dhalla, K.S., Pierce, G.N., Singal, P.K., and Dhalla, N.S. (1988). Beneficial effects of verapamil in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 37, 936-942.

Alaynick, W.A., Kondo, R.P., Xie, W., He, W., Dufour, C.R., Downes, M., Jonker, J.W., Giles, W., Naviaux, R.K., Giguere, V., and Evans, R.M. (2007). ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart. *Cell Metab* 6, 13-24.

Alaynick, W.A., Way, J.M., Wilson, S.A., Benson, W.G., Pei, L., Downes, M., Yu, R., Jonker, J.W., Holt, J.A., Rajpal, D.K., Li, H., Stuart, J., McPherson, R., Remlinger, K.S., Chang, C.Y., McDonnell, D.P., Evans, R.M., and Billin, A.N. (2010). ERRgamma regulates cardiac, gastric, and renal potassium homeostasis. *Mol Endocrinol* 24, 299-309.

Alsaad, K.O., and Herzenberg, A.M. (2007). Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update. *J Clin Pathol* 60, 18-26.

Anderson, E.J., Kypson, A.P., Rodriguez, E., Anderson, C.A., Lehr, E.J., and Neuffer, P.D. (2009). Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol* 54, 1891-1898.

Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., and Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70, 200-214.

Aragno, M., Mastrocola, R., Medana, C., Catalano, M.G., Vercellinato, I., Danni, O., and Boccuzzi, G. (2006). Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. *Endocrinology* 147, 5967-5974.

Araki, M., and Motojima, K. (2006). Identification of ERRalpha as a specific partner of PGC-1alpha for the activation of PDK4 gene expression in muscle. *FEBS J* 273, 1669-1680.

Avendano, G.F., Agarwal, R.K., Bashey, R.I., Lyons, M.M., Soni, B.J., Jyothirmayi, G.N., and Regan, T.J. (1999). Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. *Diabetes* 48, 1443-1447.

Ban, C.R., and Twigg, S.M. (2008). Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc Health Risk Manag* 4, 575-596.

## Referències

- Barger, P.M., and Kelly, D.P. (2000). PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 10, 238-245.
- Barouch, L.A., Berkowitz, D.E., Harrison, R.W., O'Donnell, C.P., and Hare, J.M. (2003). Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation* 108, 754-759.
- Barouch, L.A., Gao, D., Chen, L., Miller, K.L., Xu, W., Phan, A.C., Kittleson, M.M., Minhas, K.M., Berkowitz, D.E., Wei, C., and Hare, J.M. (2006). Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ Res* 98, 119-124.
- Basu, R., Oudit, G.Y., Wang, X., Zhang, L., Ussher, J.R., Lopaschuk, G.D., and Kassiri, Z. (2009). Type 1 diabetic cardiomyopathy in the Akita (Ins2WT/C96Y) mouse model is characterized by lipotoxicity and diastolic dysfunction with preserved systolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H2096-2108.
- Belke, D.D., Larsen, T.S., Gibbs, E.M., and Severson, D.L. (2000). Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1104-1113.
- Belke, D.D., Swanson, E.A., and Dillmann, W.H. (2004). Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. *Diabetes* 53, 3201-3208.
- Boehm, E.A., Jones, B.E., Radda, G.K., Veech, R.L., and Clarke, K. (2001). Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H977-983.
- Borradaile, N.M., Han, X., Harp, J.D., Gale, S.E., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2006). Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res* 47, 2726-2737.
- Boudina, S., and Abel, E.D. (2007). Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 115, 3213-3223.
- Boudina, S., and Abel, E.D. (2010). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord* 11, 31-39.
- Boudina, S., Sena, S., O'Neill, B.T., Tathireddy, P., Young, M.E., and Abel, E.D. (2005). Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 112, 2686-2695.

- Boudina, S., Sena, S., Theobald, H., Sheng, X., Wright, J.J., Hu, X.X., Aziz, S., Johnson, J.I., Bugger, H., Zaha, V.G., and Abel, E.D. (2007). Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 56, 2457-2466.
- Boyer, J.K., Thanigaraj, S., Schechtman, K.B., and Perez, J.E. (2004). Prevalence of ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic, normotensive patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 93, 870-875.
- Buchanan, J., Mazumder, P.K., Hu, P., Chakrabarti, G., Roberts, M.W., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Litwin, S.E., and Abel, E.D. (2005). Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 146, 5341-5349.
- Bugger, H., and Abel, E.D. (2008). Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 114, 195-210.
- Bugger, H., and Abel, E.D. (2009). Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech* 2, 454-466.
- Bugger, H., and Abel, E.D. (2010). Mitochondria in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 88, 229-240.
- Bugger, H., Boudina, S., Hu, X.X., Tuinei, J., Zaha, V.G., Theobald, H.A., Yun, U.J., McQueen, A.P., Wayment, B., Litwin, S.E., and Abel, E.D. (2008). Type 1 diabetic akita mouse hearts are insulin sensitive but manifest structurally abnormal mitochondria that remain coupled despite increased uncoupling protein 3. *Diabetes* 57, 2924-2932.
- Bugger, H., Chen, D., Riehle, C., Soto, J., Theobald, H.A., Hu, X.X., Ganesan, B., Weimer, B.C., and Abel, E.D. (2009). Tissue-specific remodeling of the mitochondrial proteome in type 1 diabetic akita mice. *Diabetes* 58, 1986-1997.
- Bugger, H., Riehle, C., Jaishy, B., Wende, A.R., Tuinei, J., Chen, D., Soto, J., Pires, K.M., Boudina, S., Theobald, H.A., Luptak, I., Wayment, B., Wang, X., Litwin, S.E., Weimer, B.C., and Abel, E.D. (2012). Genetic loss of insulin receptors worsens cardiac efficiency in diabetes. *J Mol Cell Cardiol* 52, 1019-1026.
- Burkart, E.M., Sambandam, N., Han, X., Gross, R.W., Courtois, M., Gierasch, C.M., Shoghi, K., Welch, M.J., and Kelly, D.P. (2007). Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest* 117, 3930-3939.

## Referències

- Busch, B.B., Stevens, W.C., Jr., Martin, R., Ordentlich, P., Zhou, S., Sapp, D.W., Horlick, R.A., and Mohan, R. (2004). Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *J Med Chem* 47, 5593-5596.
- Cai, L., Li, W., Wang, G., Guo, L., Jiang, Y., and Kang, Y.J. (2002). Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 51, 1938-1948.
- Cai, L., Wang, Y., Zhou, G., Chen, T., Song, Y., Li, X., and Kang, Y.J. (2006). Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 48, 1688-1697.
- Callaghan, B.C., Cheng, H.T., Stables, C.L., Smith, A.L., and Feldman, E.L. (2012). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol* 11, 521-534.
- Carley, A.N., Semeniuk, L.M., Shimoni, Y., Aasum, E., Larsen, T.S., Berger, J.P., and Severson, D.L. (2004). Treatment of type 2 diabetic db/db mice with a novel PPARgamma agonist improves cardiac metabolism but not contractile function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E449-455.
- Castet, A., Herledan, A., Bonnet, S., Jalaguier, S., Vanacker, J.M., and Cavailles, V. (2006). Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptor-related receptor transactivation depending on target genes. *Mol Endocrinol* 20, 1035-1047.
- Chambers, K.T., Leone, T.C., Sambandam, N., Kovacs, A., Wagg, C.S., Lopaschuk, G.D., Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2011). Chronic inhibition of pyruvate dehydrogenase in heart triggers an adaptive metabolic response. *J Biol Chem* 286, 11155-11162.
- Charest-Marcotte, A., Dufour, C.R., Wilson, B.J., Tremblay, A.M., Eichner, L.J., Arlow, D.H., Mootha, V.K., and Giguere, V. (2010). The homeobox protein Prox1 is a negative modulator /PGC-1{alpha} bioenergetic functions. *Genes Dev* 24, 537-542.
- Chatham, J.C., and Seymour, A.M. (2002). Cardiac carbohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Res* 55, 104-112.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y.H., Yeo, H.C., Yeo, Z.X., Narang, V., Govindarajan, K.R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Sung, W.K., Clarke, N.D., Wei, C.L., and Ng, H.H. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133, 1106-1117.
- Chiu, H.C., Kovacs, A., Blanton, R.M., Han, X., Courtois, M., Weinheimer, C.J., Yamada, K.A., Brunet, S., Xu, H., Nerbonne, J.M., Welch, M.J., Fettig, N.M., Sharp, T.L., Sambandam, N.,

- Olson, K.M., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2005). Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 96, 225-233.
- Chiu, H.C., Kovacs, A., Ford, D.A., Hsu, F.F., Garcia, R., Herrero, P., Saffitz, J.E., and Schaffer, J.E. (2001). A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 107, 813-822.
- Choi, K.M., Zhong, Y., Hoit, B.D., Grupp, I.L., Hahn, H., Dilly, K.W., Guatimosim, S., Lederer, W.J., and Matlib, M.A. (2002). Defective intracellular Ca(2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H1398-1408.
- Chowdhry, M.F., Vohra, H.A., and Galinanes, M. (2007). Diabetes increases apoptosis and necrosis in both ischemic and nonischemic human myocardium: role of caspases and poly-adenosine diphosphate-ribose polymerase. *J Thorac Cardiovasc Surg* 134, 124-131, 131 e121-123.
- Coward, P., Lee, D., Hull, M.V., and Lehmann, J.M. (2001). 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8880-8884.
- Dahlstrom, U. (2004). Can natriuretic peptides be used for the diagnosis of diastolic heart failure? *Eur J Heart Fail* 6, 281-287.
- Daniels, A., van Bilsen, M., Janssen, B.J., Brouns, A.E., Cleutjens, J.P., Roemen, T.H., Schaart, G., van der Velden, J., van der Vusse, G.J., and van Nieuwenhoven, F.A. (2010). Impaired cardiac functional reserve in type 2 diabetic db/db mice is associated with metabolic, but not structural, remodelling. *Acta Physiol (Oxf)* 200, 11-22.
- Deblois, G., and Giguere, V. (2011). Functional and physiological genomics of estrogen-related receptors (ERRs) in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1812, 1032-1040.
- Denton, R.M., Randle, P.J., and Martin, B.R. (1972). Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J* 128, 161-163.
- Devereux, R.B., Roman, M.J., Paranicas, M., O'Grady, M.J., Lee, E.T., Welty, T.K., Fabsitz, R.R., Robbins, D., Rhoades, E.R., and Howard, B.V. (2000). Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation* 101, 2271-2276.
- Di Bonito, P., Cuomo, S., Moio, N., Sibilio, G., Sabatini, D., Quattrin, S., and Capaldo, B. (1996). Diastolic dysfunction in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus of short duration. *Diabet Med* 13, 321-324.
- Diamant, M., Lamb, H.J., Groeneveld, Y., Endert, E.L., Smit, J.W., Bax, J.J., Romijn, J.A., de Roos, A., and Radder, J.K. (2003). Diastolic dysfunction is associated with altered myocardial



## Referències

metabolism in asymptomatic normotensive patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 42, 328-335.

Dufour, C.R., Wilson, B.J., Huss, J.M., Kelly, D.P., Alaynick, W.A., Downes, M., Evans, R.M., Blanchette, M., and Giguere, V. (2007). Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma. *Cell Metab* 5, 345-356.

Epshteyn, V., Morrison, K., Krishnaswamy, P., Kazanegra, R., Clopton, P., Mudaliar, S., Edelman, S., Henry, R., and Maisel, A. (2003). Utility of B-type natriuretic peptide (BNP) as a screen for left ventricular dysfunction in patients with diabetes. *Diabetes Care* 26, 2081-2087.

Epstein, P.N., Overbeek, P.A., and Means, A.R. (1989). Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice. *Cell* 58, 1067-1073.

Fang, Z.Y., Prins, J.B., and Marwick, T.H. (2004). Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev* 25, 543-567.

Fang, Z.Y., Schull-Meade, R., Leano, R., Mottram, P.M., Prins, J.B., and Marwick, T.H. (2005). Screening for heart disease in diabetic subjects. *Am Heart J* 149, 349-354.

Fauconnier, J., Lanner, J.T., Zhang, S.J., Tavi, P., Bruton, J.D., Katz, A., and Westerblad, H. (2005). Insulin and inositol 1,4,5-trisphosphate trigger abnormal cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients and reveal mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling defects in cardiomyocytes of ob/ob mice. *Diabetes* 54, 2375-2381.

Finck, B.N., Han, X., Courtois, M., Amond, F., Nerbonne, J.M., Kovacs, A., Gross, R.W., and Kelly, D.P. (2003). A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1226-1231.

Finck, B.N., Lehman, J.J., Leone, T.C., Welch, M.J., Bennett, M.J., Kovacs, A., Han, X., Gross, R.W., Kozak, R., Lopaschuk, G.D., and Kelly, D.P. (2002). The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 109, 121-130.

Frustaci, A., Kajstura, J., Chimenti, C., Jakoniuk, I., Leri, A., Maseri, A., Nadal-Ginard, B., and Anversa, P. (2000). Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 87, 1123-1132.

Gaillard, S., Dwyer, M.A., and McDonnell, D.P. (2007). Definition of the molecular basis for estrogen receptor-related receptor-alpha-cofactor interactions. *Mol Endocrinol* 21, 62-76.

- Garvey, W.T., Hardin, D., Juhaszova, M., and Dominguez, J.H. (1993). Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rats: implications for diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 264, H837-844.
- Giguere, V. (2002). To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab* 13, 220-225.
- Giguere, V., Yang, N., Segui, P., and Evans, R.M. (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331, 91-94.
- Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15, 391-407.
- Goldberg, I.J., Trent, C.M., and Schulze, P.C. (2012). Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab* 15, 805-812.
- Greschik, H., Flaig, R., Renaud, J.P., and Moras, D. (2004). Structural basis for the deactivation of the estrogen-related receptor gamma by diethylstilbestrol or 4-hydroxytamoxifen and determinants of selectivity. *J Biol Chem* 279, 33639-33646.
- Greschik, H., Wurtz, J.M., Sanglier, S., Bourguet, W., van Dorsselaer, A., Moras, D., and Renaud, J.P. (2002). Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell* 9, 303-313.
- Hassouna, A., Loubani, M., Matata, B.M., Fowler, A., Standen, N.B., and Galinanes, M. (2006). Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovasc Res* 69, 450-458.
- Herrero, P., Peterson, L.R., McGill, J.B., Matthew, S., Lesniak, D., Dence, C., and Gropler, R.J. (2006). Increased myocardial fatty acid metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 47, 598-604.
- Herzog, B., Cardenas, J., Hall, R.K., Villena, J.A., Budge, P.J., Giguere, V., Granner, D.K., and Kralli, A. (2006). Estrogen-related receptor alpha is a repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol Chem* 281, 99-106.
- Hock, M.B., and Kralli, A. (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* 71, 177-203.
- How, O.J., Aasum, E., Severson, D.L., Chan, W.Y., Essop, M.F., and Larsen, T.S. (2006). Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice. *Diabetes* 55, 466-473.

## Referències

- Huss, J.M., Imahashi, K., Dufour, C.R., Weinheimer, C.J., Courtois, M., Kovacs, A., Giguere, V., Murphy, E., and Kelly, D.P. (2007). The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab* 6, 25-37.
- Huss, J.M., Torra, I.P., Staels, B., Giguere, V., and Kelly, D.P. (2004). Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 24, 9079-9091.
- IDF (2011). IDF Diabetes Atlas. (International Diabetes Federation).
- Huynh, K., Kiriazis, H., Du, X.J., Love, J.E., Gray, S.P., Jandeleit-Dahm, K.A., McMullen, J.R., and Ritchie, R.H. (2013). Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice. *Free Radic Biol Med* 60, 307-317.
- Johnson, E.J., Dieter, B.P., and Marsh, S.A. (2015). Evidence for distinct effects of exercise in different cardiac hypertrophic disorders. *Life Sci* 123, 100-106.
- Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., and Kakizuka, A. (2003). PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12378-12383.
- Kanazawa, A., Nishio, Y., Kashiwagi, A., Inagaki, H., Kikkawa, R., and Horiike, K. (2002). Reduced activity of mtTFA decreases the transcription in mitochondria isolated from diabetic rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E778-785.
- Kannel, W.B., and McGee, D.L. (1979). Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 241, 2035-2038.
- Khong, F.L., Zhang, Y., Edgley, A.J., Qi, W., Connelly, K.A., Woodman, O.L., Krum, H., and Kelly, D.J. (2011). 3',4'-Dihydroxyflavonol antioxidant attenuates diastolic dysfunction and cardiac remodeling in streptozotocin-induced diabetic m(Ren2)27 rats. *PLoS One* 6, e22777.
- Kumar, S., Prasad, S., and Sitasawad, S.L. (2013). Multiple antioxidants improve cardiac complications and inhibit cardiac cell death in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One* 8, e67009.
- Kuo, T.H., Moore, K.H., Giacomelli, F., and Wiener, J. (1983). Defective oxidative metabolism of heart mitochondria from genetically diabetic mice. *Diabetes* 32, 781-787.

- LaBarge, S., McDonald, M., Smith-Powell, L., Auwerx, J., and Huss, J.M. (2014). Estrogen-related receptor-alpha (ERRalpha) deficiency in skeletal muscle impairs regeneration in response to injury. *FASEB J* 28, 1082-1097.
- Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., and Friedman, J.M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632-635.
- Lehman, J.J., and Kelly, D.P. (2002). Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 339-345.
- Leone, T.C., Weinheimer, C.J., and Kelly, D.P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7473-7478.
- Li, R.J., Yang, J., Yang, Y., Ma, N., Jiang, B., Sun, Q.W., and Li, Y.J. (2014). Speckle tracking echocardiography in the diagnosis of early left ventricular systolic dysfunction in type II diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord* 14, 141.
- Li, S.Y., Yang, X., Ceylan-Isik, A.F., Du, M., Sreejayan, N., and Ren, J. (2006). Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia* 49, 1434-1446.
- Liang, Q., Carlson, E.C., Donthi, R.V., Kralik, P.M., Shen, X., and Epstein, P.N. (2002). Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51, 174-181.
- Listenberger, L.L., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2001). Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem* 276, 14890-14895.
- Lonard, D.M., and O'Malley B, W. (2007). Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* 27, 691-700.
- Lopez, B., Gonzalez, A., and Diez, J. (2010). Circulating biomarkers of collagen metabolism in cardiac diseases. *Circulation* 121, 1645-1654.
- Lowell, B.B., and Shulman, G.I. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307, 384-387.
- Lubien, E., DeMaria, A., Krishnaswamy, P., Clopton, P., Koon, J., Kazanegra, R., Gardetto, N., Wanner, E., and Maisel, A.S. (2002). Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 105, 595-601.

## Referències

- Luo, J., Sladek, R., Bader, J.A., Matthyssen, A., Rossant, J., and Giguere, V. (1997). Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* 388, 778-782.
- Luo, J., Sladek, R., Carrier, J., Bader, J.A., Richard, D., and Giguere, V. (2003). Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol Cell Biol* 23, 7947-7956.
- Luptak, I., Balschi, J.A., Xing, Y., Leone, T.C., Kelly, D.P., and Tian, R. (2005). Decreased contractile and metabolic reserve in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null hearts can be rescued by increasing glucose transport and utilization. *Circulation* 112, 2339-2346.
- Maisch, B., Alter, P., and Pankuweit, S. (2011). Diabetic cardiomyopathy--fact or fiction? *Herz* 36, 102-115.
- Matsushima, S., Kinugawa, S., Ide, T., Matsusaka, H., Inoue, N., Ohta, Y., Yokota, T., Sunagawa, K., and Tsutsui, H. (2006). Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2237-2245.
- Mazumder, P.K., O'Neill, B.T., Roberts, M.W., Buchanan, J., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Boudina, S., and Abel, E.D. (2004). Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes* 53, 2366-2374.
- Metzler, B., Schocke, M.F., Steinboeck, P., Wolf, C., Judmaier, W., Lechleitner, M., Lukas, P., and Pachinger, O. (2002). Decreased high-energy phosphate ratios in the myocardium of men with diabetes mellitus type I. *J Cardiovasc Magn Reson* 4, 493-502.
- Miki, T., Yuda, S., Kouzu, H., and Miura, T. (2013). Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev* 18, 149-166.
- Mizushige, K., Yao, L., Noma, T., Kiyomoto, H., Yu, Y., Hosomi, N., Ohmori, K., and Matsuo, H. (2000). Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation* 101, 899-907.
- Mokuda, O., Sakamoto, Y., Ikeda, T., and Mashiba, H. (1990). Effects of anoxia and low free fatty acid on myocardial energy metabolism in streptozotocin-diabetic rats. *Ann Nutr Metab* 34, 259-265.
- Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., Willy, P.J., Schulman, I.G., Heyman, R.A., Lander, E.S., and

- Spiegelman, B.M. (2004). *Erfalpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle.* Proc Natl Acad Sci U S A 101, 6570-6575.
- Murray, A.J., Panagia, M., Hauton, D., Gibbons, G.F., and Clarke, K. (2005). Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the control of myocardial uncoupling protein levels. *Diabetes* 54, 3496-3502.
- Murray, J., and Huss, J.M. (2011). Estrogen-related receptor alpha regulates skeletal myocyte differentiation via modulation of the ERK MAP kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C630-645.
- Nicolino, A., Longobardi, G., Furgi, G., Rossi, M., Zoccolillo, N., Ferrara, N., and Rengo, F. (1995). Left ventricular diastolic filling in diabetes mellitus with and without hypertension. *Am J Hypertens* 8, 382-389.
- Nielsen, O.W., McDonagh, T.A., Robb, S.D., and Dargie, H.J. (2003). Retrospective analysis of the cost-effectiveness of using plasma brain natriuretic peptide in screening for left ventricular systolic dysfunction in the general population. *J Am Coll Cardiol* 41, 113-120.
- Nishio, Y., Kanazawa, A., Nagai, Y., Inagaki, H., and Kashiwagi, A. (2004). Regulation and role of the mitochondrial transcription factor in the diabetic rat heart. *Ann N Y Acad Sci* 1011, 78-85.
- Nitenberg, A., Ledoux, S., Valensi, P., Sachs, R., Attali, J.R., and Antony, I. (2000). [Dysfunction of the coronary microcirculation in type 2 diabetic patients]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 93, 937-941.
- Nunoda, S., Genda, A., Sugihara, N., Nakayama, A., Mizuno, S., and Takeda, R. (1985). Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart Vessels* 1, 43-47.
- Ohtake, T., Yokoyama, I., Watanabe, T., Momose, T., Serezawa, T., Nishikawa, J., and Sasaki, Y. (1995). Myocardial glucose metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus patients evaluated by FDG-PET. *J Nucl Med* 36, 456-463.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.
- Peng, L., Gao, X., Duan, L., Ren, X., Wu, D., and Ding, K. (2011). Identification of pyrido[1,2-alpha]pyrimidine-4-ones as new molecules improving the transcriptional functions of estrogen-related receptor alpha. *J Med Chem* 54, 7729-7733.

## Referències

- Pereira, L., Matthes, J., Schuster, I., Valdivia, H.H., Herzig, S., Richard, S., and Gomez, A.M. (2006). Mechanisms of  $[Ca^{2+}]_i$  transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. *Diabetes* 55, 608-615.
- Perry, M.C., Dufour, C.R., Tam, I.S., B'Chir, W., and Giguere, V. (2014). Estrogen-related receptor-alpha coordinates transcriptional programs essential for exercise tolerance and muscle fitness. *Mol Endocrinol* 28, 2060-2071.
- Peterson, L.R., Herrero, P., Schechtman, K.B., Racette, S.B., Waggoner, A.D., Kisrieva-Ware, Z., Dence, C., Klein, S., Marsala, J., Meyer, T., and Gropler, R.J. (2004). Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation* 109, 2191-2196.
- Phillips, M.S., Liu, Q., Hammond, H.A., Dugan, V., Hey, P.J., Caskey, C.J., and Hess, J.F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 13, 18-19.
- Pierce, G.N., and Dhalla, N.S. (1985). Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can J Cardiol* 1, 48-54.
- Poirier, P., Bogaty, P., Garneau, C., Marois, L., and Dumesnil, J.G. (2001). Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 24, 5-10.
- Rangwala, S.M., Wang, X., Calvo, J.A., Lindsley, L., Zhang, Y., Deyneko, G., Beaulieu, V., Gao, J., Turner, G., and Markovits, J. (2010). Estrogen-related receptor gamma is a key regulator of muscle mitochondrial activity and oxidative capacity. *J Biol Chem* 285, 22619-22629.
- Regan, T.J., Lyons, M.M., Ahmed, S.S., Levinson, G.E., Oldewurtel, H.A., Ahmad, M.R., and Haider, B. (1977). Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest* 60, 884-899.
- Rodrigues, B., Cam, M.C., and McNeill, J.H. (1998). Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180, 53-57.
- Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y.Z., Kumral, T., Branwood, A.W., and Grishman, A. (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 30, 595-602.
- Scheuermann-Freestone, M., Madsen, P.L., Manners, D., Blamire, A.M., Buckingham, R.E., Styles, P., Radda, G.K., Neubauer, S., and Clarke, K. (2003). Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation* 107, 3040-3046.

- Schreiber, S.N., Emter, R., Hock, M.B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E.J., and Kralli, A. (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6472-6477.
- Schreiber, S.N., Knutti, D., Brogli, K., Uhlmann, T., and Kralli, A. (2003). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem* 278, 9013-9018.
- Semeniuk, L.M., Kryski, A.J., and Severson, D.L. (2002). Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H976-982.
- Sharma, S., Adroge, J.V., Golfman, L., Uray, I., Lemm, J., Youker, K., Noon, G.P., Frazier, O.H., and Taegtmeyer, H. (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 18, 1692-1700.
- Shen, X., Zheng, S., Metreveli, N.S., and Epstein, P.N. (2006). Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 55, 798-805.
- Shen, X., Zheng, S., Thongboonkerd, V., Xu, M., Pierce, W.M., Jr., Klein, J.B., and Epstein, P.N. (2004). Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E896-905.
- Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 3015-3025.
- Shimizu, M., Umeda, K., Sugihara, N., Yoshio, H., Ino, H., Takeda, R., Okada, Y., and Nakanishi, I. (1993). Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. *J Clin Pathol* 46, 32-36.
- Shivalkar, B., Dhondt, D., Goovaerts, I., Van Gaal, L., Bartunek, J., Van Crombrugge, P., and Vrints, C. (2006). Flow mediated dilatation and cardiac function in type 1 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 97, 77-82.
- Singh, V.P., Le, B., Khode, R., Baker, K.M., and Kumar, R. (2008). Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes* 57, 3297-3306.
- Sladek, R., Bader, J.A., and Giguere, V. (1997). The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol* 17, 5400-5409.



## Referències

- Sonoda, J., Laganier, J., Mehl, I.R., Barish, G.D., Chong, L.W., Li, X., Scheffler, I.E., Mock, D.C., Bataille, A.R., Robert, F., Lee, C.H., Giguere, V., and Evans, R.M. (2007). Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense. *Genes Dev* 21, 1909-1920.
- Soriano, F.X., Liesa, M., Bach, D., Chan, D.C., Palacin, M., and Zorzano, A. (2006). Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes* 55, 1783-1791.
- Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiu, E., Calle-Pascual, A., Carmena, R., Casamitjana, R., Castano, L., Castell, C., Catala, M., Delgado, E., Franch, J., Gaztambide, S., Girbes, J., Gomis, R., Gutierrez, G., Lopez-Alba, A., Martinez-Larrad, M.T., Menendez, E., Mora-Peces, I., Ortega, E., Pascual-Manich, G., Rojo-Martinez, G., Serrano-Rios, M., Valdes, S., Vazquez, J.A., and Vendrell, J. (2012). Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 55, 88-93.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85, 1093-1129.
- Tanaka, Y., Konno, N., and Kako, K.J. (1992). Mitochondrial dysfunction observed in situ in cardiomyocytes of rats in experimental diabetes. *Cardiovasc Res* 26, 409-414.
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A., and Balaban, R.S. (2000). Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C423-435.
- Trost, S.U., Belke, D.D., Bluhm, W.F., Meyer, M., Swanson, E., and Dillmann, W.H. (2002). Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51, 1166-1171.
- Turko, I.V., and Murad, F. (2003). Quantitative protein profiling in heart mitochondria from diabetic rats. *J Biol Chem* 278, 35844-35849.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Villena, J.A., Hock, M.B., Chang, W.Y., Barcas, J.E., Giguere, V., and Kralli, A. (2007). Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1418-1423.
- Villena, J.A., and Kralli, A. (2008). ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab* 19, 269-276.

- Wang, D., Wei, Y., and Pagliassotti, M.J. (2006). Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 147, 943-951.
- Wang, H., Bei, Y., Lu, Y., Sun, W., Liu, Q., Wang, Y., Cao, Y., Chen, P., Xiao, J., and Kong, X. (2015). Exercise Prevents Cardiac Injury and Improves Mitochondrial Biogenesis in Advanced Diabetic Cardiomyopathy with PGC-1alpha and Akt Activation. *Cell Physiol Biochem* 35, 2159-2168.
- Wang, J., Takeuchi, T., Tanaka, S., Kubo, S.K., Kayo, T., Lu, D., Takata, K., Koizumi, A., and Izumi, T. (1999). A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest* 103, 27-37.
- Wang, P., Lloyd, S.G., Zeng, H., Bonen, A., and Chatham, J.C. (2005). Impact of altered substrate utilization on cardiac function in isolated hearts from Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2102-2110.
- Warley, A., Powell, J.M., and Skepper, J.N. (1995). Capillary surface area is reduced and tissue thickness from capillaries to myocytes is increased in the left ventricle of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 38, 413-421.
- Way, K.J., Isshiki, K., Suzuma, K., Yokota, T., Zvagelsky, D., Schoen, F.J., Sandusky, G.E., Pechous, P.A., Vlahos, C.J., Wakasaki, H., and King, G.L. (2002). Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta2 activation and diabetes. *Diabetes* 51, 2709-2718.
- Wende, A.R., Huss, J.M., Schaeffer, P.J., Giguere, V., and Kelly, D.P. (2005). PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 25, 10684-10694.
- Westermann, D., Rutschow, S., Jager, S., Linderer, A., Anker, S., Riad, A., Unger, T., Schultheiss, H.P., Pauschinger, M., and Tschope, C. (2007a). Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes* 56, 641-646.
- Westermann, D., Rutschow, S., Van Linthout, S., Linderer, A., Bucker-Gartner, C., Sobirey, M., Riad, A., Pauschinger, M., Schultheiss, H.P., and Tschope, C. (2006). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. *Diabetologia* 49, 2507-2513.
- Westermann, D., Van Linthout, S., Dhayat, S., Dhayat, N., Escher, F., Bucker-Gartner, C., Spillmann, F., Noutsias, M., Riad, A., Schultheiss, H.P., and Tschope, C. (2007b).

## Referències

Cardioprotective and anti-inflammatory effects of interleukin converting enzyme inhibition in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 56, 1834-1841.

Westermann, D., Van Linthout, S., Dhayat, S., Dhayat, N., Schmidt, A., Noutsias, M., Song, X.Y., Spillmann, F., Riad, A., Schultheiss, H.P., and Tschope, C. (2007c). Tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 102, 500-507.

Wu, K.K., and Huan, Y. (2007). Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis* 191, 241-249.

Xie, C.Q., Jeong, Y., Fu, M., Bookout, A.L., Garcia-Barrio, M.T., Sun, T., Kim, B.H., Xie, Y., Root, S., Zhang, J., Xu, R.H., Chen, Y.E., and Mangelsdorf, D.J. (2009). Expression profiling of nuclear receptors in human and mouse embryonic stem cells. *Mol Endocrinol* 23, 724-733.

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., and Goldberg, I.J. (2003). Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J Clin Invest* 111, 419-426.

Yang, C., and Chen, S. (1999). Two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor  $\alpha$ -1 orphan receptor. *Cancer Res* 59, 4519-4524.

Yang, X., Downes, M., Yu, R.T., Bookout, A.L., He, W., Straume, M., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* 126, 801-810.

Ye, G., Metreveli, N.S., Donthi, R.V., Xia, S., Xu, M., Carlson, E.C., and Epstein, P.N. (2004). Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1336-1343.

Ye, G., Metreveli, N.S., Ren, J., and Epstein, P.N. (2003). Metallothionein prevents diabetes-induced deficits in cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species production. *Diabetes* 52, 777-783.

Yokoyama, I., Momomura, S., Ohtake, T., Yonekura, K., Nishikawa, J., Sasaki, Y., and Omata, M. (1997). Reduced myocardial flow reserve in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 30, 1472-1477.

Yoshioka, M., Kayo, T., Ikeda, T., and Koizumi, A. (1997). A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46, 887-894.

- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., Atcheson, B., White, M.F., Kraegen, E.W., and Shulman, G.I. (2002a). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277, 50230-50236.
- Yu, Y., Ohmori, K., Kondo, I., Yao, L., Noma, T., Tsuji, T., Mizushige, K., and Kohno, M. (2002b). Correlation of functional and structural alterations of the coronary arterioles during development of type II diabetes mellitus in rats. *Cardiovasc Res* 56, 303-311.
- Yue, P., Arai, T., Terashima, M., Sheikh, A.Y., Cao, F., Charo, D., Hoyt, G., Robbins, R.C., Ashley, E.A., Wu, J., Yang, P.C., and Tsao, P.S. (2007). Magnetic resonance imaging of progressive cardiomyopathic changes in the db/db mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H2106-2118.
- Zamora, M., and Villena, J.A. (2014). Targeting mitochondrial biogenesis to treat insulin resistance. *Curr Pharm Des* 20, 5527-5557.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhao, X.Y., Hu, S.J., Li, J., Mou, Y., Chen, B.P., and Xia, Q. (2006). Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem* 62, 1-8.
- Zhou, Y.T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., and Unger, R.H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1784-1789.
- Zick, Y. (2003). Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3, S56-60.
- Zuercher, W.J., Gaillard, S., Orband-Miller, L.A., Chao, E.Y., Shearer, B.G., Jones, D.G., Miller, A.B., Collins, J.L., McDonnell, D.P., and Willson, T.M. (2005). Identification and structure-activity relationship of phenolic acyl hydrazones as selective agonists for the estrogen-related orphan nuclear receptors ERRbeta and ERRgamma. *J Med Chem* 48, 3107-3109.





