

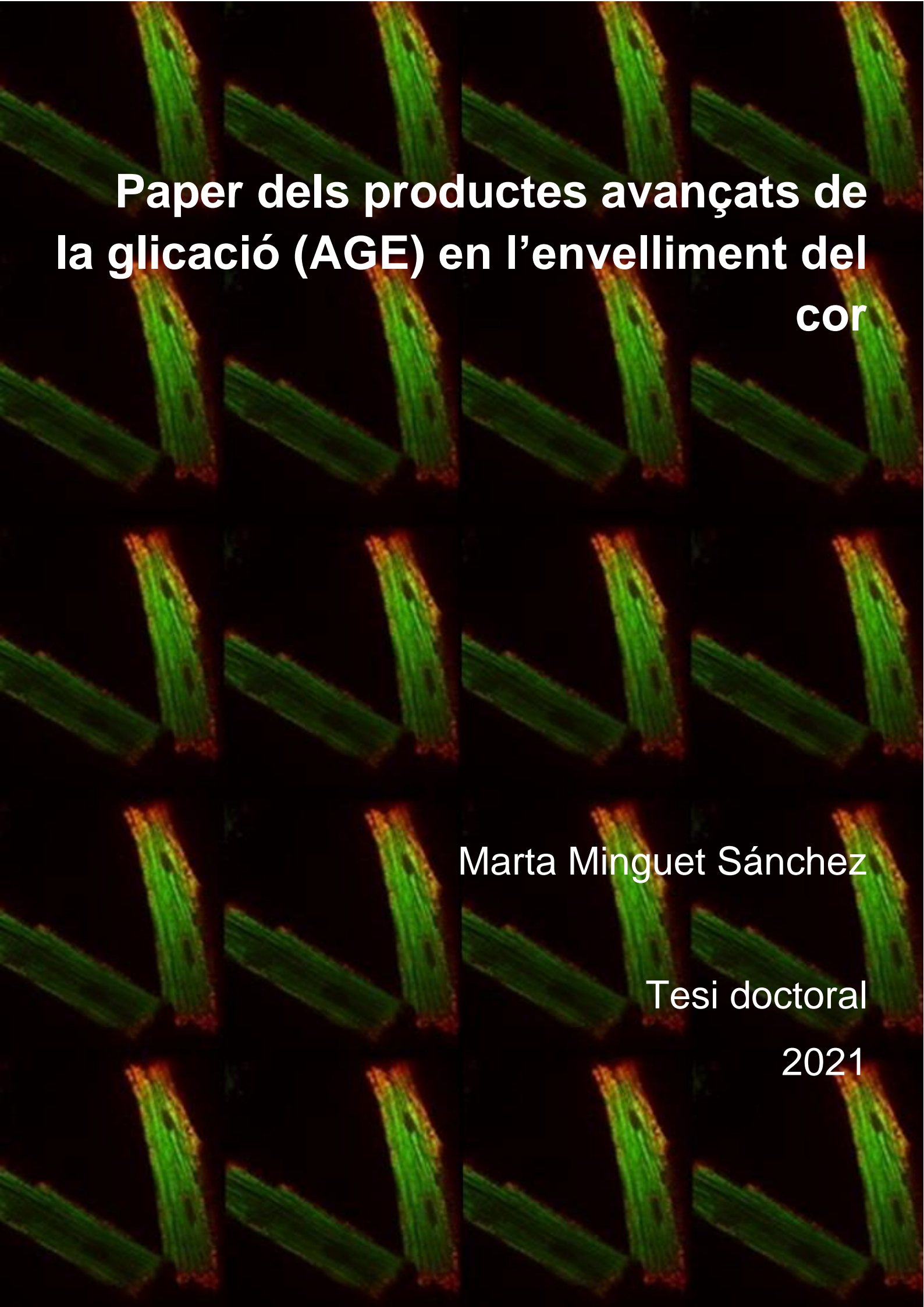


Universitat Autònoma de Barcelona

**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>

The background of the entire page is a microscopic image of plant tissue. It shows a repeating pattern of green, elongated, fibrous structures, likely cellulose fibers, arranged in a crisscross or woven pattern. The green color is vibrant, while the surrounding areas are dark, possibly black or very dark brown, which makes the green structures stand out. The overall appearance is that of a highly organized, fibrous network.

**Paper dels productes avançats de  
la glicació (AGE) en l'envelliment del  
cor**

**Marta Minguet Sánchez**

**Tesi doctoral**

**2021**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**TESI DOCTORAL**

**Paper dels productes avançats de la  
glicació (AGE) en l'envelliment del cor**

Tesi doctoral presentada per Marta Minguet Sánchez per optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

**Directora:** Dra. Marisol Ruiz-Meana

**Tutors:** Dr. Ignacio José Ferreira González  
Dr. Antonio David García-Dorado García † (2016-2019)

Programa Doctorat en Medicina  
Departament de Medicina

**Barcelona, 2021**



## *AGRAÏMENTS*

Aquesta tesi doctoral és el fruit del treball realitzat durant tres anys al laboratori de Malalties Cardiovasculars de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron, allí vaig gaudir molt del treball diari i dels ensenyaments que vaig aprendre, esforç, constància, compromís, mètode, i de tres anys més d'esforç ja fora del laboratori, acompanyada de l'incansable ajut de la Dra. Marisol Ruiz-Meana, directora d'aquesta tesi. Sense el seu inestimable suport i paciència aquesta investigació no hauria estat possible. El meu record més càlid i emocionat per al Dr. David García-Dorado, tutor d'aquesta tesi, director del laboratori de Malalties Cardiovasculars, la persona més professional i més entregada a la seva vocació i al seu treball, que he conegut. Mai oblidaré el seu exemple, els seus ensenyaments i la seva actitud valenta.

Gràcies al Dr. Ignacio Ferreira per acceptar ser el nou tutor d'aquesta tesi.

A tots els meus companys de laboratori, als estudiants de grau i màster, estudiants pre-doctorals, post-doctorals, tècnics, infermeres, secretàries i altres investigadors principals amb qui he compartit espais, dubtes, consells, molt temps i sobretot molts bons moments de treball. A la Laura Valls i al David Aluja, els meus "CoDocs", companys de feina i vida. Agrair el suport incansable de l'Elisabet Miró per ajudar-me en tot moment i a entendre les matemàtiques que no ens van quedar clares en el món universitari. El meu reconeixement i gratitud a totes les persones que com ella m'han ajudat i animat a continuar el treball quan necessitava una empenta i em costava de veure el final.

I per últim, una gran abraçada a la meva família, que m'han estimat i m'han donat suport sempre. Gràcies Iván, per tot.



## ABREVIATURES

|               |  |
|---------------|--|
| <b>3-DG</b>   | 3-desoxiglucosona  |
| <b>ADP</b>    | Adenosina-5-difosfat   |
| <b>AGE</b>    | Producte final de glicació avançada                          |
| <b>ANOVA</b>  | Anàlisi de la variància                                      |
| <b>ATPasa</b> | ATP sintasa  |
| <b>ATP</b>    | Adenosina-5-trifosfat  |
| <b>ArgP</b>   | Argipirimidina   |
| <b>BSA</b>    | Albúmina sèrica bovina                                       |
| <b>CS</b>     | Citrat Sintasa   |
| <b>CML</b>    | N-ε-carboximetil-lisina                                      |
| <b>CEL</b>    | N-ε-carboxetil-lisina  |
| <b>CQP</b>    | Control de qualitat proteic                                  |
| <b>CHAPS</b>  | 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamoni]-1-propanesulfonat hidrat |
| <b>CICR</b>   | Calcium induced calcium release                              |
| <b>CV</b>     | Cardiovascular   |
| <b>DNTB</b>   | Àcid dinitrobenzoic  |
| <b>EDTA</b>   | Àcid etilendiaminutsotetraacètic                             |
| <b>EGTA</b>   | Àcid etilenglicoltetraacètic                                 |
| <b>ELISA</b>  | Enzyme-linked immunosorbent assay                            |
| <b>EC</b>     | Excitació-contracció   |
| <b>FADH</b>   | Flavín adenín dinucleòtid                                    |
| <b>FBS</b>    | Sèrum fetal boví   |
| <b>GAP</b>    | Gliceraldehid 3-fosfat                                       |
| <b>GAPDH</b>  | Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa                        |
| <b>GSH</b>    | Glutatió total   |
| <b>GA</b>     | Glicolaldehid  |
| <b>GO</b>     | Glioxal  |
| <b>GR</b>     | Glutatió reductasa   |
| <b>GLO 1</b>  | Glioxalasa 1   |
| <b>GLO 2</b>  | Glioxalasa 2   |
| <b>HRP</b>    | Peroxidasa del rave picant                                   |
| <b>HPLC</b>   | High Performance Liquid Chromatography                       |
| <b>IC</b>     | Insuficiència cardíaca                                       |
| <b>IF</b>     | Interfibril·lars   |
| <b>IP</b>     | Inhibidors de proteases                                      |
| <b>IR</b>     | Isquèmia Reperfusió  |
| <b>LDH</b>    | Lactat deshidrogenasa  |
| <b>MCU</b>    | Uniportador mitocondrial de calci                            |
| <b>MLS</b>    | Maximum Life Span  |
| <b>mPTP</b>   | Por de transició a la permeabilitat mitocondrial             |
| <b>MOPS</b>   | àcid 3-(N-morpholino) propanesulfònic                        |

|              |  |
|--------------|--|
| <b>MG</b>    | Metilglioxal   |
| <b>MG-H1</b> | 5-hidro-5- metilimidazolones del metilglioxal          |
| <b>MOLD</b>  | Metilglioxal-lisina                                    |
| <b>MAMs</b>  | Mitochondria associated membranes                      |
| <b>NCXI</b>  | Intercanviador sodi-calci                              |
| <b>OAA</b>   | Oxalacetat   |
| <b>OMS</b>   | Organització mundial de la salut                       |
| <b>ONU</b>   | Organització de les Nacions Unides                     |
| <b>PBS</b>   | Tampó fosfat salí (Phosphate buffer saline)            |
| <b>PN</b>    | Perinuclears   |
| <b>RyR</b>   | Receptor de la Rianodina                               |
| <b>RyR2</b>  | Receptor de la Rianodina 2                             |
| <b>RAGE</b>  | Receptor dels productes de glicació avançada           |
| <b>ROS</b>   | Radicals Lliures d'oxigen                              |
| <b>RM</b>    | Reacció de Maillard                                    |
| <b>RE</b>    | Reticle endoplasmàtic                                  |
| <b>RS</b>    | Reticle sarcoplasmàtic                                 |
| <b>Ru360</b> | Rutenium 360   |
| <b>SOD</b>   | Superòxid dismutasa                                    |
| <b>SS</b>    | Subsarcolemals   |
| <b>SERCA</b> | Sarco-endoplasmatic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPasa |
| <b>TA</b>    | Temperatura ambient                                    |
| <b>TMT</b>   | Tandem mass tags                                       |
| <b>TNB</b>   | 2-nitro-5-thiobenzoat                                  |
| <b>Tris</b>  | Tris (hidroximetil) aminometà                          |
| <b>TBS</b>   | Tampó salí Tris  |
| <b>THP</b>   | Tetrahidroxipirimidina                                 |
| <b>VDAC</b>  | Canal d'anions depenents de voltatge                   |





## LLISTAT DE FIGURES I TAULES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Envel·liment de la població mundial. ....  | 24 |
| Figura 2: Piràmide poblacional a Espanya en diferents dècades i prediccions de futur.....  | 25 |
| Figura 3: Nombre de persones de $\geq 60$ anys en els països desenvolupats i en els països en vies de desenvolupament durant el període de 1950 a 2050. ....                                       | 26 |
| Figura 4: Prevalença de malalties cròniques en adults majors de 20 anys.....   | 27 |
| Figura 5: Número de publicacions (per any) relacionades amb l'envelliment. ....  | 28 |
| Figura 6: Esquema que il·lustra el procés d'acoblament electromecànic (cicle cel·lular d'excitació-contracció). ....   | 30 |
| Figura 7: Micrografia electrònica de transmissió del miocardi de rata que il·lustra les diferents poblacions mitocondrials dins els cardiomiòcit.....  | 33 |
| Figura 8: Interacció entre els mitocondris i el RS. ....   | 34 |
| Figura 9: Esquema del procés químic de formació dels AGE. ....   | 36 |
| Figura 10: Principals precursors d'AGE. ....   | 37 |
| Figura 11: Factors endògens relacionats amb la formació dels precursors d'AGE: GO, MG, 3-DG i GA. ....   | 38 |
| Figura 12: El desenvolupament històric del sistema de la glicoxalasa en investigacions d'envelliment. ....   | 39 |
| Figura 13: La via de la Glicoxalasa. ....  | 39 |
| Figura 14: Classificació dels AGE.....   | 41 |
| Figura 15: Mostres biològiques utilitzades per fer les determinacions en el model murí. ....   | 51 |
| Figura 16: Mostres biològiques utilitzades per fer les determinacions en el model humà. ....   | 52 |
| Figura 17: Esquema de l'anàlisi massiva de canvis d'abundància i modificacions per glicació utilitzant HPLC acoblada a espectrometria de masses. ....  | 54 |
| Figura 18: Cicle d'òxid-reducció del glutatió a partir de la reducció del DTNB mitjançant la glutatió reductasa.....   | 57 |
| Figura 19: Reacció catalitzada per D-LDH: La D-LDH catalitza la transformació D-lactat a piruvat reduint el NAD a NADH. ....   | 57 |
| Figura 20: Esquema dels passos de l'ELISA de tipus sandvitx per identificar la glicació del RyR. ....  | 62 |
| Figura 21: Representació esquemàtica del protocol per a l'aïllament de les dues subpoblacions de mitocondris SS i IF a partir de la centrifugació diferencial del teixit miocàrdic de ratolí. .... | 63 |
| Figura 22: Esquema de la reacció enzimàtica catalitzada per la CS.....   | 64 |
| Figura 23: Registre obtingut del les diferents fases de consum d'oxigen mitocondrial obtingudes amb l'oxímetre Oxigraph.....   | 65 |
| Figura 24: Esquema del protocol de l'ELISA de tipus competitiu utilitzat per a detectar glicació en proteïnes (CML) en el miocardi de pacients.....  | 67 |
| Figura 25: Esquema del protocol de l'ELISA sandvitx utilitzat per detectar glicació del RyR amb anti-MG biotinilat en el miocardi de pacients. ....  | 68 |
| Figura 26: Esquema de l'aïllament de mitocondris a partir d'aurícula de pacients. ....   | 70 |
| Figura 27: Quantificació de l'expressió de proteïnes modificades per AGE (CML) en el miocardi de ratolins joves i vells.....   | 74 |
| Figura 28: Canvis d'abundància en pèptids glicats (Xp) obtinguts a partir de l'anàlisi massiva de proteòmica per HPLC acoblada a espectrometria de masses en el miocardi dels ratolins. ....       | 75 |
| Figura 29: Activitat Glo 1 i contingut de D-lactat en el miocardi de ratolins. ....  | 76 |
| Figura 30: Quantificació de l'expressió de Glo 1 en el miocardi de ratolins. ....  | 77 |
| Figura 31: Contingut de GSH total en extractes miocàrdics de ratolins. ....  | 77 |
| Figura 32: Immunofluorescència d'AGE intracel·lulars en cardiomiòcits de ratolí.....   | 78 |
| Figura 33: Contingut intracel·lular d'AGE en cardiomiòcits de ratolí.....  | 79 |
| Figura 34: Identificació de zones colocalitzants entre RyR i AGE de glucosa en cardiomiòcits de ratolí.....  | 80 |
| Figura 35: Percentatge de colocalització entre RyR i AGE. ....   | 81 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 36: Canvis en l'abundància dels pèptids glicats per hidroximetil d'OP corresponents al RyR identificats per espectrometria de masses..... | 82 |
| Figura 37: Efecte de l'envelliment en el <i>calcium leak</i> depenent del RyR en cardiomiòcits aïllats.....                                      | 83 |
| Figura 38: Efecte de l'envelliment sobre la captació i alliberació de calci en vesícules aïllades de RS. ....                                    | 84 |
| Figura 39: Efecte de l'envelliment sobre la quantitat de calci lliure en els mitocondris dels cardiomiòcits de ratolins. ....                    | 85 |
| Figura 40: Contingut de calci mitocondrial total en els mitocondris SS i IF.....   | 86 |
| Figura 41: Efecte de l'envelliment sobre la respiració mitocondrial en mitocondris SS i IF.....  | 87 |
| Figura 42: Detecció de proteïnes modificades per AGE (CML) en el teixit miocàrdic humà.....  | 89 |
| Figura 43: Grau de glicació del RyR avaluada per un ELISA sandvitx.....  | 91 |
| Figura 44: Activitat Glo 1 i contingut de D-lactat en el teixit miocàrdic de pacients. ....  | 93 |
| Figura 45: Quantificació de l'expressió de Glo 1 en el miocardi humà. ....   | 94 |
| Figura 46: Contingut de GSH total en els extractes miocàrdics de pacients. ....  | 96 |
| Figura 47: Contingut de calci total en els mitocondris cardíacs humans. ....   | 97 |
| Figura 48: Efecte de l'envelliment sobre la respiració mitocondrial en els mitocondris cardíacs humans.....                                      | 99 |

Taula 1: Prevalença de malalties cardiovasculars en %, entre 2010-2030 als EUA. Figura modificada a partir de Heidenreich PA., et al. (Heidenreich et al. 2011). ....

Taula 2: Glicació del RyR detectada en un ELISA de tipus sandvitx. Valors absorbància (u.a. / 0,1 mg proteïna) obtinguts amb diferents anticossos per detectar AGE (CML, AGE glucosa i MG) a partir d'un ELISA tipus sandvitx després d'immunocapturar el RyR de les vesícules de RS de ratolins joves i ratolins vells. Els valors corresponents a RyR confirmen la immunocaptura del RyR i són iguals en els dos grups de ratolins testats. Els ratolins vells van mostrar un augment d'AGE de glucosa ( $p = 0,014$ ). Per CML no es van observar diferències i no es va detectar (ND) AGE de MG. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  ESM i han estat obtingudes a partir de  $n = 5$  ratolins joves i  $n = 6$  ratolins vells. ....

Taula 3: Determinació del rendiment mitocondrial i de l'activitat CS en el teixit miocàrdic. Rendiment mitocondrial (RM), expressat com a mg de proteïna mitocondrial/ g teixit fresc i activitat CS, expressada com a UCS/mg (UCS =  $\mu\text{mol TNB/min}$ ) en mitocondris SS i IF de teixit miocàrdic de ratolí. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  ESM i han estat obtingudes a partir d'un total de  $n = 5$  ratolins joves i  $n = 10$  ratolins vells.....

Taula 4: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc dels pacients escollits per la quantificació dels nivells d'AGE en el miocardi. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 26$  pacients joves i  $n = 15$  pacients ancians. ....

Taula 5: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc dels pacients escollits per la quantificació de la glicació del RyR en el miocardi. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 13$  pacients joves i  $n = 9$  pacients ancians. ....

Taula 6: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc dels pacients escollits per la quantificació de la disminució de l'activitat Glo 1 i reducció de la generació de D-lactat en el teixit miocàrdic humà. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 26$  pacients joves i  $n = 15$  pacients ancians. ....

Taula 7: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc dels pacients escollits per la quantificació de la disminució del contingut de glutatió en el miocardi durant l'envelliment. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 26$  pacients joves i  $n = 15$  pacients ancians. ....

Taula 8: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc cardiovascular dels pacients inclosos en l'estudi de l'augment del contingut de calci en els mitocondris cardíacs humans durant l'envelliment. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 10$  pacients joves i  $n = 10$  pacients ancians. ....

|   |            |
|---|------------|
| <b>Taula 9: Determinació del RM i activitat CS. RM, determinat com a mg de proteïna mitocondrial/ g teixit miocàrdic fresc i activitat CS expressat com a UCS/mg (UCS = <math>\mu\text{mol TNB/min}</math>), en mitocondris de teixit auricular de pacients joves (&lt; 75 anys) i ancians (<math>\geq 75</math> anys). El RM i l'activitat CS van ser significativament menors (<math>p = 0,04</math> i <math>p &lt; 0.001</math>, respectivament) en els pacients ancians respecte els pacients joves. Dades expressades com a mitjana <math>\pm</math> ESM d'un total de n = 60 pacients joves i n = 30 pacients ancians. ....</b> | <b>100</b> |
| <b>Taula 10: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc cardiovascular dels pacients inclosos en l'estudi de l'efecte de l'envelliment sobre el contingut mitocondrial i el consum d'oxigen en mitocondris cardíacs humans. Dades expressades com a mitjana <math>\pm</math> ESM d'un total de n = 60 pacients joves i n = 35 pacients ancians. ....</b>   | <b>101</b> |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>SUMMARY .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>RESUM .....</b>   | <b>20</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>1.1. L'envelliment: Definició i Prevalença de malaltia cardiovascular en l'envelliment .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>1.2. Estructura i funció del cor durant l'envelliment .....</b>   | <b>28</b> |
| 1.2.1. Fenotip cardiovascular durant l'envelliment .....   | 28        |
| 1.2.2. L'envelliment dels cardiomiòcits .....  | 29        |
| <b>1.3. Reticle sarcoplàsmic i mitocondris en l'envelliment dels cardiomiòcits.....</b>  | <b>29</b> |
| 1.3.1. El reticle sarcoplàsmic.....  | 29        |
| 1.3.2. Els mitocondris.....  | 31        |
| 1.3.3. Comunicació RS i mitocondris en l'homeòstasi del calci intracel·lular.....  | 34        |
| <b>1.4. Productes finals de glicació avançada.....</b>   | <b>35</b> |
| 1.4.1. Formació dels AGE .....   | 36        |
| 1.4.2. Precursors, sistemes de detoxificació i tipus d'AGE.....  | 36        |
| 1.4.2.1. Metilglioxal i Glioxal són importants precursors fisiològics d'AGE .....  | 36        |
| 1.4.2.2. Detoxificació dels precursors d'AGE .....   | 38        |
| 1.4.2.3. Paper del ROS en la generació d'AGE .....   | 39        |
| 1.4.2.4. Tipologia dels AGE .....  | 41        |
| 1.4.3. Paper dels AGE en l'envelliment del cor i possibles conseqüències funcionals.....   | 41        |
| <b>2. HIPÒTESI.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>3. OBJECTIUS .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>4. MATERIALS I MÈTODES .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>4.1. Declaració ètica i disseny experimental .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>4.2. Model murí.....</b>  | <b>53</b> |
| 4.2.1. Estudis amb homogenat de teixit miocàrdic de ratolins .....   | 53        |
| 4.2.1.1 Quantificació del contingut global d'AGE en el miocardi .....  | 53        |
| 4.2.1.2. Anàlisi massiva de proteòmica diferencial per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) acoblada a espectrometria de masses ..... | 53        |
| 4.2.1.3. Quantificació del contingut global d'AGE (CML) en el miocardi murí per Western-blot .....   | 54        |
| 4.2.2. Determinació de l'activitat de la via de detoxificació depenent de la Glo 1 de precursors d'AGE .....                                 | 55        |
| 4.2.2.1. Determinació de l'activitat de la Glo 1 .....   | 55        |
| 4.2.2.2. Nivells d'expressió miocàrdica de la Glo 1.....   | 55        |
| 4.2.2.3. Contingut de Glutatió total (GSH) .....   | 56        |
| 4.2.2.4. Contingut de D-lactat .....   | 57        |
| 4.2.3. Estudis en cardiomiòcits aïllats de ratolí .....  | 58        |
| 4.2.3.1. Aïllament de cardiomiòcits .....  | 58        |
| 4.2.3.2. Contingut del calci lliure en la matriu mitocondrial en cardiomiòcits aïllats ..  | 58        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 4.2.3.3.    | Determinació de <i>calcium leak</i> des del RS en cardiomiòcits .....   | 58        |
| 4.2.3.4.    | Contingut d'AGE de MG en els cardiomiòcits aïllats de ratolins.....   | 59        |
| 4.2.3.5.    | Quantificació del grau de colocalització entre AGE i RyR .....  | 59        |
| 4.2.4.      | Estudis amb vesícules aïllades de RS .....  | 60        |
| 4.2.4.1.    | Aïllament de vesícules de RS.....   | 60        |
| 4.2.4.2.    | Determinació de <i>calcium leak</i> en vesícules aïllades de RS.....  | 60        |
| 4.2.4.3.    | Determinació del grau de glicació del RyR en les vesícules de RS de ratolins  | 61        |
| 4.2.5.      | Estudis amb mitocondris aïllats de ratolins .....   | 62        |
| 4.2.5.1.    | Aïllament de mitocondris cardíacs subsarcolemals i interfibril·lars .....   | 62        |
| 4.2.5.2.    | Mesura del rendiment mitocondrial i l'activitat citrat sintasa.....   | 63        |
| 4.2.5.3.    | Quantificació del contingut de calci mitocondrial .....   | 64        |
| 4.2.5.4.    | Consum d'oxigen en mitocondris de ratolins .....  | 64        |
| <b>4.3.</b> | <b>Model humà .....</b>   | <b>66</b> |
| 4.3.1.      | Estudis amb homogenat de teixit miocàrdic de pacients .....   | 66        |
| 4.3.1.1.    | Quantificació del contingut global d'AGE en miocardi humà.....  | 66        |
| 4.3.1.2.    | Determinació de l'activitat Glo 1, contingut de glutatió i D-lactat en<br>homogenat de teixit miocàrdic de pacients ..... | 67        |
| 4.3.2.      | Estudis amb vesícules aïllades de RS de pacients .....  | 68        |
| 4.3.2.1.    | Aïllament de vesícules de RS.....   | 68        |
| 4.3.2.2.    | Determinació del grau de glicació del RyR en vesícules humanes de RS .....  | 68        |
| 4.3.3.      | Aïllament de mitocondris .....  | 69        |
| 4.3.3.1.    | Quantificació del contingut de calci mitocondrial .....   | 70        |
| 4.3.3.2.    | Consum d'oxigen en mitocondris de pacients .....  | 70        |
| 4.3.4.      | Anàlisi estadística.....  | 71        |
| <b>5.</b>   | <b>RESULTATS .....</b>  | <b>74</b> |
| <b>5.1.</b> | <b>Model murí.....</b>  | <b>74</b> |
| 5.1.1.      | Acumulació d'AGE en el miocardi .....   | 74        |
| 5.1.2.      | Deficiència de la via de detoxificació depenent de glioxalasa de precursors<br>d'AGE durant l'envelliment .....           | 75        |
| 5.1.2.1.    | Disminució de l'activitat Glo 1 i el contingut de D-lactat en el miocardi durant<br>l'envelliment.....                    | 75        |
| 5.1.2.2.    | Contingut de glutatió en el miocardi envellit.....  | 77        |
| 5.1.3.      | Augment del contingut d'AGE intracel·lulars i glicació del RyR en el miocardi   | 78        |
| 5.1.3.1.    | Contingut de proteïnes glicades en cardiomiòcits senescents.....  | 78        |
| 5.1.3.2.    | L'envelliment s'associa a un major grau de colocalització entre AGE i RyR   | 79        |
| 5.1.3.3.    | Determinació per ELISA del grau de glicació del RyR en vesícules aïllades de<br>RS .....                                  | 81        |
| 5.1.3.4.    | Identificació de pèptids glicats del RyR mitjançant proteòmica.....   | 82        |
| 5.1.4.      | Disfunció del RyR durant l'envelliment.....   | 83        |
| 5.1.5.      | Efecte de l'edat avançada sobre la funció mitocondrial .....  | 85        |
| 5.1.5.1.    | L'augment del <i>calcium leak</i> depenent del RyR s'associa a un augment del<br>contingut de calci mitocondrial .....    | 85        |
| 5.1.5.2.    | Efecte de l'envelliment sobre els mitocondris i el consum d'oxigen.....   | 86        |
| <b>5.2.</b> | <b>Model humà .....</b>   | <b>89</b> |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 5.2.1.      | Efecte de l'envelliment sobre l'acumulació d'AGE en el miocardi i la glicació del RyR.....                       | 89         |
| 5.2.1.1.    | Acumulació d'AGE en el miocardi.....   | 89         |
| 5.2.1.2.    | Glicació del RyR en el miocardi durant l'envelliment.....  | 90         |
| 5.2.2.      | En el miocardi humà l'envelliment s'associa a una deficiència de l'activitat de la via de la glioxalasa.....     | 92         |
| 5.2.2.1.    | Disminució de l'activitat Glo 1 i reducció de la generació de D-lactat en el teixit miocàrdic humà.....          | 92         |
| 5.2.2.2.    | Disminució del contingut de glutatió en el miocardi durant l'envelliment.....                                    | 95         |
| 5.2.3.      | Efecte de l'envelliment en els mitocondris cardíacs humans .....   | 97         |
| 5.2.3.1.    | Augment del contingut de calci en els mitocondris cardíacs humans durant l'envelliment.....                      | 97         |
| 5.2.3.2.    | Efecte de l'envelliment sobre el contingut mitocondrial i el consum d'oxigen en mitocondris cardíacs humans..... | 98         |
| <b>5.3.</b> | <b>Resum global de resultats .....</b>   | <b>102</b> |
| <b>6.</b>   | <b>DISCUSSIÓ GENERAL.....</b>  | <b>106</b> |
| <b>6.1.</b> | <b>Acúmul intracel·lular d'AGE en els cardiomiòcits vells.....</b>   | <b>106</b> |
| <b>6.2.</b> | <b>Dèficit de la via de la glioxalasa en el miocardi senescent.....</b>  | <b>107</b> |
| <b>6.3.</b> | <b>Glicació del RyR en el miocardi envellit.....</b>   | <b>109</b> |
| <b>6.4.</b> | <b>Efecte de la glicació del RyR sobre la comunicació RS-mitocondris .....</b>                                   | <b>110</b> |
| <b>6.5.</b> | <b>Acúmul de calci i dany mitocondrial en el cor senescent .....</b>   | <b>111</b> |
| <b>7.</b>   | <b>CONCLUSIÓ.....</b>  | <b>115</b> |
| <b>8.</b>   | <b>LÍNIES DE FUTUR .....</b>   | <b>118</b> |
| <b>9.</b>   | <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>122</b> |





## *Summary*

Aging decreases the tolerance of the heart to exercise and stress and increases the incidence of heart failure, a leading cause of death and disability worldwide. Up to 80% of heart failure patients are elderly and being old significantly worsens the prognosis of this condition. Preclinical studies indicate that aged cardiomyocytes develop some endogenous changes that contribute to their greater susceptibility to develop dysfunction and failure, independently of other factors, like higher comorbidity rate present in aging. Indeed, aged cardiomyocytes share some common phenotypic traits with failing cardiomyocytes, such as oxidative damage and energy mismatch under increased metabolic demand. Previous studies of our group have demonstrated that these phenotypic traits can be explained by an alteration in the anatomical and functional communication between the sarcoplasmic reticulum (SR) and the mitochondria, necessary to regulate energy production and antioxidant regeneration. However, the mechanisms of such disruption are not known.

This thesis investigates the contribution of intracellular advanced glycation to cardiomyocyte dysfunction and mitochondrial alteration during aging. Advanced glycation is one of the most relevant and omnipresent chemical alteration associated with biological aging. It induces, terminal damage to proteins and other macromolecules, which ultimately precipitate in the form of AGE (Advanced glycation end-products). The accumulation of AGE has been documented in several diseases associated with aging, like Alzheimer, Parkinson, cataracts, and others. However, its contribution to the pathophysiology of the aging heart is not known.

In this thesis, the impact of aging on the accumulation of AGE in the intracellular space has been investigated using mouse myocardial samples (4-6 months vs  $\geq 20$  months) and patients undergoing cardiac surgery ( $<75$  years vs  $\geq 75$  years) using antibody-based AGE detection techniques (Western blot, ELISA, immunofluorescence), and mass spectroscopy, a technique that does not depend on antibodies. The increase in glycations during aging has been corroborated by ELISA, Western blot, immunofluorescence, and proteomics, constantly and repeatedly revealing a total increase in intracellular AGE in the myocardial tissue of old mice and in the atrial tissue of elderly patients.

To investigate the possible mechanisms that may promote the accumulation of intracellular AGE, the efficiency of the glyoxalase pathway (Glo 1), the main detoxification pathway of the major AGE precursors (methylglyoxal and glyoxal), has been studied. This thesis shows for the first time how the activity of the enzyme glyoxalase decreases, both in old mice ( $\geq 20$  months) and in elderly patients ( $\geq 75$  years), as well as glutathione levels, which in addition to being an important cellular antioxidant, is a cofactor of the glyoxalase pathway.

One of the proteins we have identified to be susceptible to this glycative attack is the ryanodine receptor (RyR) from the sarcoplasmic reticulum (SR), a channel that is responsible for the release of calcium in each cardiac beat. RyR glycation has been identified in both mouse and human myocardium from elderly individuals by independent techniques, including by differential proteomics, immunolabeling and ELISA.

The functional consequences associated with RyR glycation, were assessed in isolated cardiomyocytes and in RS vesicles from myocardial tissue of young and old mice. The results demonstrate a dysfunction of the gating properties of the RyR channel, identified as an increase in spontaneous calcium leak from the SR. The alteration in the SR calcium handling is expected to promote a sustained calcium increase in the microenvironment around SR and mitochondria, with potential consequences on mitochondria. The results obtained show a significant increase in calcium content in the subpopulation of interfibrillary mitochondria (IF) of the heart of old

mice, without changes in subsarcolemmal mitochondria (SS). This increase in mitochondrial calcium content associated with aging was also observed in the cardiac mitochondria of elderly patients. Analysis of mitochondrial respiratory function demonstrated a reduction in the maximal oxygen consumption capacity in IF mitochondria of old mice compared to young mice. In human myocardium, aging was associated with a decrease in the total mitochondrial pool and a consequent reduction of myocardial aerobic capacity.

Therefore, these data show the pathophysiological relevance of AGE accumulation in the aged myocardium. The glycative damage of RyR, favored by a deficient detoxification capacity of the chemical precursors involved in the formation of AGE, contributes to mitochondrial damage in the senescent myocardium, secondary to an excessive accumulation of calcium inside the mitochondria, losing the capacity respiratory system needed to generate energy efficiently.



## Resum

L'envelliment disminueix la tolerància del cor a l'exercici i l'estrès i augmenta la incidència d'insuficiència cardíaca, una de les principals causes de mort i discapacitat a tot el món. Fins a un 80% dels pacients amb insuficiència cardíaca són ancians i aquesta condició empitjora significativament el pronòstic d'aquesta malaltia. Estudis preclínic indiquen que els cardiomiòcits envellits produeixen alguns canvis endògens, que contribueixen a una major susceptibilitat a desenvolupar disfuncions i errors, independentment d'altres factors com la taxa de comorbiditat present en l'envelliment. De fet, els cardiomiòcits envellits comparteixen alguns trets fenotípics comuns amb els cardiomiòcits malmesos, com ara el dany oxidatiu i el desajust energètic en augment de la demanda metabòlica. Estudis previs del nostre grup han demostrat que aquests trets fenotípics es poden explicar per una alteració en la comunicació anatòmica i funcional entre el reticle sarcoplasmàtic (RS) i els mitocondris, necessaris per regular la producció d'energia i la regeneració antioxidant. Tanmateix, no es coneixen els mecanismes de tal interrupció.

Aquesta tesi investiga la contribució de la glicació intracel·lular avançada a la disfunció dels cardiomiòcits i a l'alteració mitocondrial durant l'envelliment. La glicació avançada és una de les alteracions químiques més rellevants i omnipresents associades a l'envelliment biològic. Indueix danys terminals a proteïnes i altres macromolècules, que en última instància precipiten en forma de AGE (productes finals de glicació avançada). L'acumulació d'AGE s'ha documentat en diverses malalties associades a l'envelliment, com l'Alzheimer, el Parkinson, les cataractes i d'altres. No obstant això, no es coneix la seva contribució a la fisiopatologia del cor envellit.

En aquesta tesi, s'ha investigat l'impacte de l'envelliment sobre l'acumulació d'AGE en l'espai intracel·lular, utilitzant mostres de miocardi de ratolins (4-6 mesos vs  $\geq 20$  mesos) i pacients sotmesos a cirurgia cardíaca ( $<75$  anys vs  $\geq 75$  anys) mitjançant tècniques de detecció d'AGE basades en anticossos (Western blot, ELISA, immunofluorescència), i en espectroscòpia de masses, tècnica que no depèn dels anticossos. L'augment de glicacions durant l'envelliment ha estat corroborat per ELISA, Western blot, immunofluorescència i proteòmica, revelant de forma constant i reiterada un augment total d'AGE intracel·lular en el teixit miocàrdic de ratolins vells i en el teixit auricular de pacients ancians.

Per investigar els possibles mecanismes que puguin afavorir l'acumulació d'AGE intracel·lular, s'ha estudiat l'eficiència de la via de la glioxalasa (Glo 1), la principal via de desintoxicació dels principals precursors d'AGE (metilglioxal i glioxal). Aquesta tesi mostra per primera vegada com disminueixen tant l'activitat de l'enzim glioxalasa, tant en ratolins vells ( $\geq 20$  mesos) com en pacients ancians ( $\geq 75$  anys), com els nivells de glutatió, que a més de ser un important antioxidant cel·lular, és un cofactor de la via de la glioxalasa.

Una de les proteïnes que hem identificat, susceptible de patir un atac glicatiu, és el receptor de la rianodina (RyR) del reticle sarcoplasmàtic (RS), un canal que s'encarrega d'alliberar el calci de forma controlada en cada batec cardíac. La glicació del RyR s'ha identificat tant en miocardi de ratolí com en humans vells mitjançant tècniques independents, incloses per proteòmica diferencial, immunomarcatge i ELISA. Les conseqüències funcionals associades a la glicació del RyR es van avaluar en cardiomiòcits aïllats i en vesícules aïllades de RS del teixit miocàrdic de ratolins joves i vells. Els resultats generats demostren una disfunció de les propietats de tancament del canal RyR, identificat com a un augment del *calcium leak* del RS. S'espera que l'alteració en la manipulació del calci del RS afavoreixi un augment sostingut del calci en el microambient al voltant del RS i mitocondris, amb possibles conseqüències sobre

els mitocondris. Els resultats obtinguts demostren un augment significatiu del contingut de calci en la subpoblació de mitocondris interfibril·lars (IF) del cor de ratolins vells, sense canvis en els mitocondris subsarcolemals (SS). Aquest augment del contingut en calci mitocondrial associat a l'envelliment també es va observar en els mitocondris cardíacs de pacients ancians. L'anàlisi de la funció respiratòria mitocondrial va demostrar una reducció de la capacitat màxima de consum d'oxigen en mitocondris IF de ratolins vells en comparació amb ratolins joves. En el miocardi humà, l'envelliment es va associar amb una disminució del *pool* mitocondrial total i una consegüent reducció de la capacitat aeròbica del miocardi.

Per tant, aquestes dades mostren la rellevància fisiopatològica de l'acúmul d'AGE en el miocardi envellit. El dany glicatiu del RyR, afavorit per una capacitat de desintoxicació deficient dels precursors químics involucrats en la formació d'AGE, contribueix al dany mitocondrial en el miocardi senescent, secundari a un acúmul excessiu de calci a l'interior dels mitocondris, perdent la capacitat respiratòria necessària per generar energia de forma eficient.



# *Introducció*

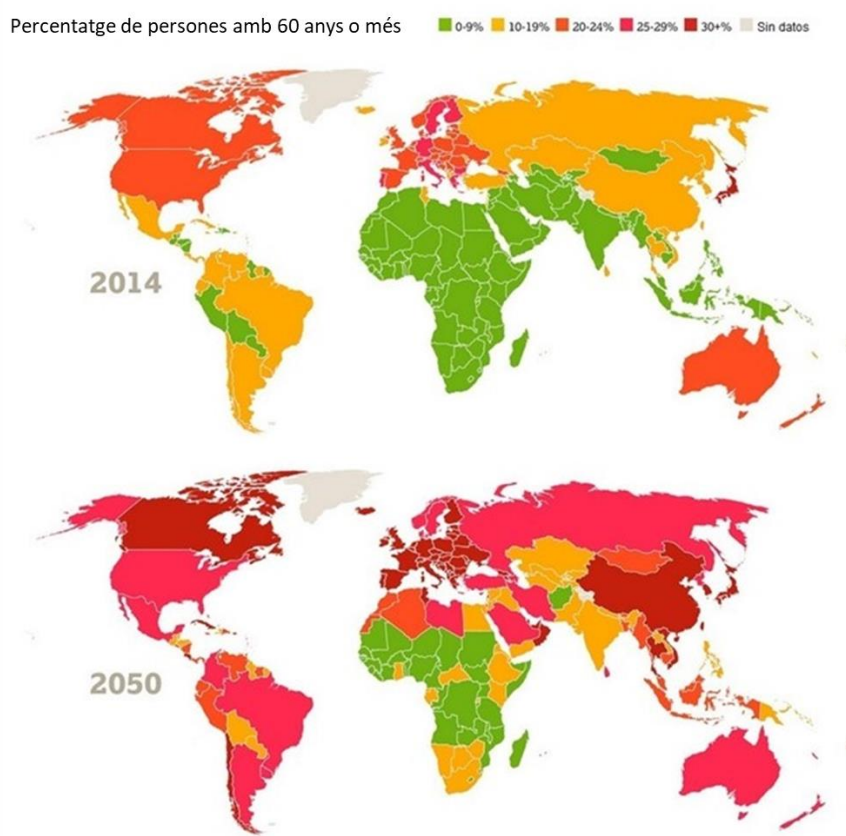


## 1. Introducció

### 1.1. L'envelliment: Definició i Prevalença de malaltia cardiovascular en l'envelliment

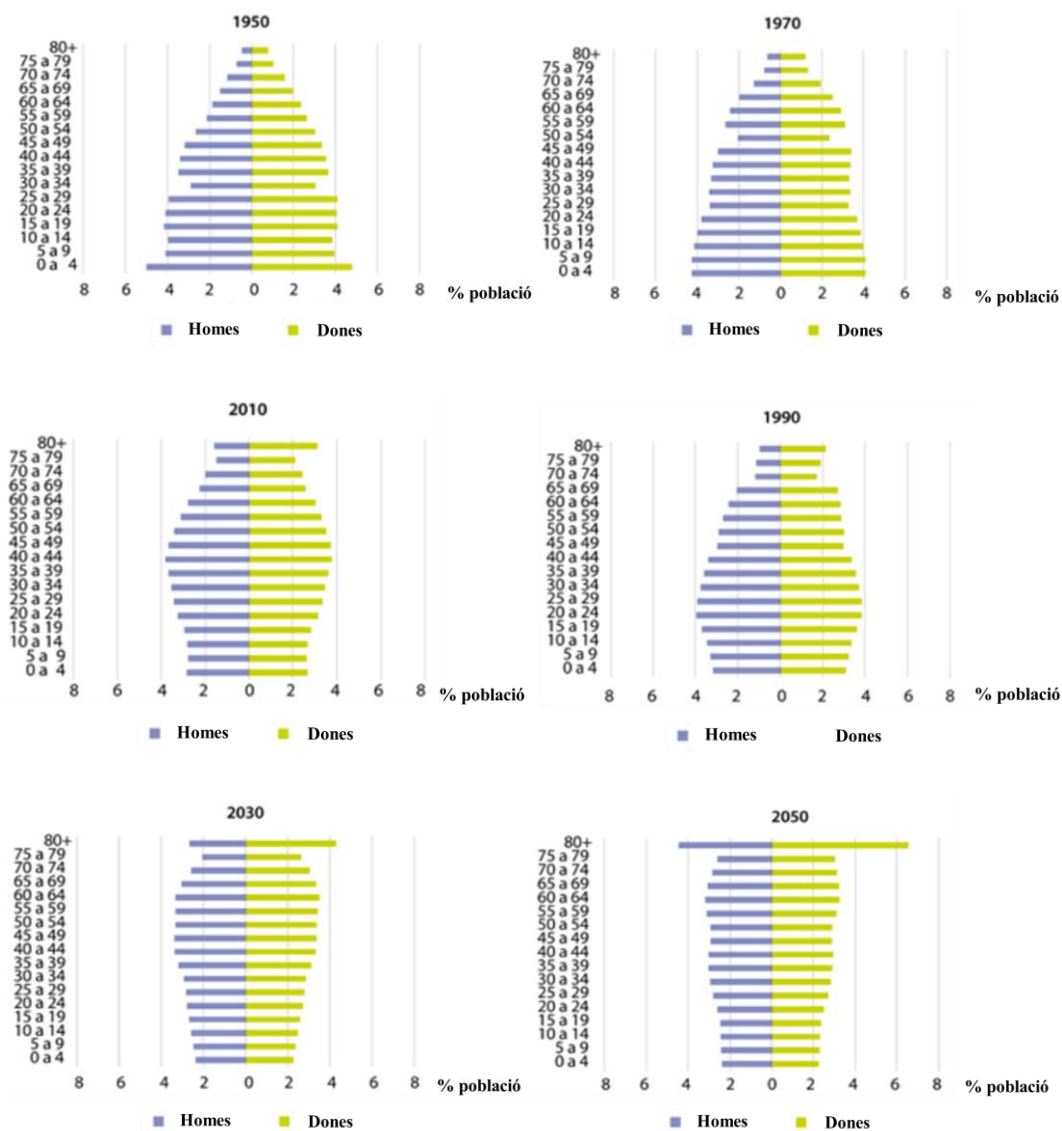
Definim l'**envelliment** com el conjunt de modificacions morfològiques i fisiològiques que es produeixen com a conseqüència de l'acció del pas del temps en els éssers vius. La vellesa es considera l'última etapa del cicle vital, envelliment, d'una espècie, que culmina amb la mort de l'individu. De manera simple podem diferenciar tres etapes del cicle vital d'una espècie: el creixement, la reproducció i la vellesa l'envelliment. Aquesta classificació del cicle vital té un eix fonamental basat en la teoria de Darwin, on la perdurabilitat d'una espècie està influenciada per la seva capacitat reproductora. De fet, en moltes de les espècies que existeixen a la Terra l'etapa que correspon a l'envelliment és molt curta degut a que es perd la seva capacitat per reproduir-se, deixant d'ésser útils per l'espècie (1)(2).

Existeixen tres conceptes que cal definir entorn al concepte propi d'envelliment, l'esperança de vida, la longitud de vida i la longevitat. Així, l'**esperança de vida** és el temps que s'espera que visquin els individus d'una espècie en un període concret. La **longitud** de vida és el període exacte de temps que viu un individu. La **longevitat** és el límit màxim de temps (maximum life span-MLS) que un individu pot arribar a viure i que ve determinat genèticament (3)(4)(5) (**Figura1**).

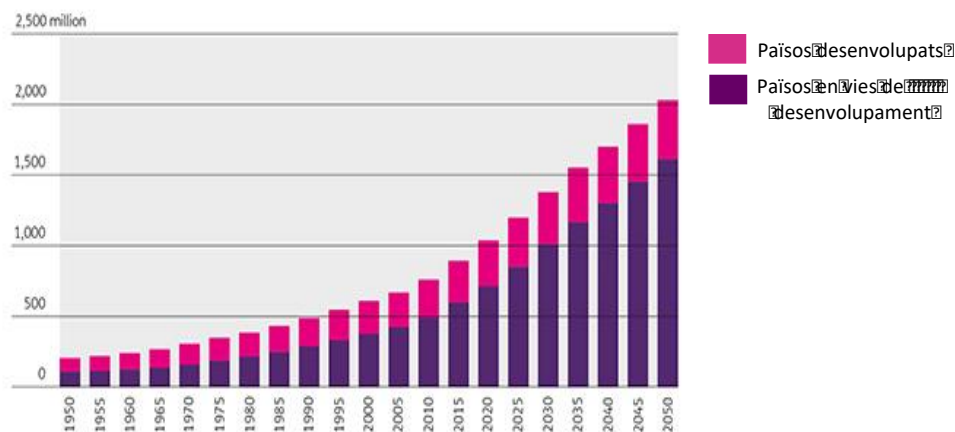


**Figura 1: Envelliment de la població mundial.** Aquest mapa representa la distribució, per colors, dels diferents segments d'edat de la població humana en tots els països del món a l'any 2014 i la previsió per l'any 2050.

Des del punt de vista biològic es podria definir l'envelliment com la transició des de l'etapa reproductora fins la mort d'un individu. En la nostra societat, des del punt de vista jurídic, l'edat de 65 anys es considera l'inici de la vellesa, sense tenir cap base científica ni biomèdica, esdevenint el conflicte entre l'edat cronològica i l'edat biològica degut a la inexistència de cap "biomarcador" que estableixi el començament i la instauració de l'envelliment (6). La proporció de persones ancianes a la nostra societat està creixent de forma gradual. Pràcticament tots els països del món experimenten un creixement en el percentatge de persones grans en la seva població, amb un ritme anual de persones majors de 60 anys d'un 3 %. Es calcula que el nombre de persones ancianes es duplicarà al 2050, el que provocarà una inversió de la piràmide poblacional (7)(8) (**Figura 2 i Figura 3**).



**Figura 2: Piràmide poblacional a Espanya en diferents dècades i prediccions de futur.** Figura procedent de Population Pyramid.net.



**Figura 3: Nombre de persones de  $\geq 60$  anys en els països desenvolupats i en els països en vies de desenvolupament durant el període de 1950 a 2050.** Figura modificada a partir de Almeida et al. (9).

L'envelliment per si mateix no és cap malaltia, encara que existeix una associació entre aquesta etapa del cicle vital i l'increment de la incidència i la severitat de les malalties. L'assistència sanitària dels pacients ancians comporta una despesa sanitària addicional per la presència de comorbiditats que agreugen la malaltia i en dificulta el tractament. En la vellesa, la malaltia apareix afavorida per la pèrdua de capacitat de la resposta d'adaptació de l'organisme vell en front a estímuls interns i externs per tant, resulta ser un factor de risc important en la patogènia de certes malalties prevalents en la vellesa com ara les malalties degeneratives, el càncer i les malalties cardiovasculars (**Figura 4**) (10).

Les malalties cardiovasculars són la principal causa de mort i discapacitat mundial (11)(12)(13)(14). Al 2015 les malalties cardiovasculars van provocar més de 17 milions de morts a tot el món (15), i la seva prevalença es troba en continu augment en persones de  $> 65$  anys, especialment en aquells de  $\geq 80$  anys, es calcula que continuarà creixent aproximadament un 5 % en els propers 10 anys (**Taula 1**) (12), relacionat amb el progressiu envelliment de la població mundial.

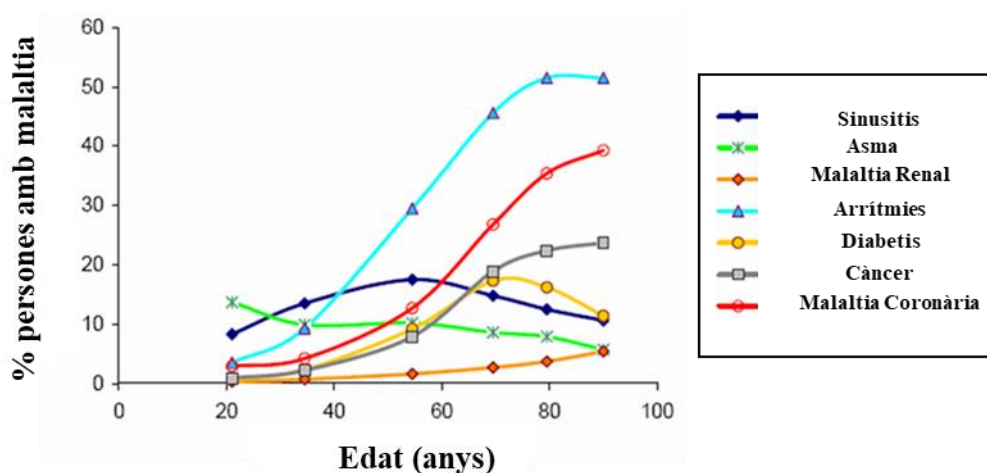
La cardiopatia isquèmica i l'accident cerebrovascular són les dues principals malalties cardiovasculars. Ambdues tenen un impacte social enorme, no tant sols per la mortalitat que causen, sinó per la seva alta morbiditat, la pèrdua de qualitat de vida dels pacients i l'elevat cost econòmic que suposen pels serveis sanitaris estatals (16)(17)(18).

| Any     | MCV* | Hipertensió | MC   | IC   | Ictus |
|---------|------|-------------|------|------|-------|
| 2010    | 36.9 | 33.9        | 8.0  | 2.8  | 3.2   |
| 2015    | 37.8 | 34.8        | 8.3  | 3.0  | 3.4   |
| 2020    | 38.7 | 35.7        | 8.6  | 3.1  | 3.6   |
| 2025    | 39.7 | 36.5        | 8.9  | 3.3  | 3.8   |
| 2030    | 40.5 | 37.3        | 9.3  | 3.5  | 4.0   |
| % Canvi | 9.9  | 9.9         | 16.6 | 25.0 | 24.9  |

MCV, indica malalties cardiovasculars; MC, malaltia coronària; IC, insuficiència cardíaca

\* Aquesta categoria inclou hipertensió, malalties coronàries, insuficiència cardíaca i ictus

**Taula 1: Prevalença de malalties cardiovasculars en %, entre 2010-2030 als EUA.** Figura modificada a partir de Heidenreich PA., et al. (12).

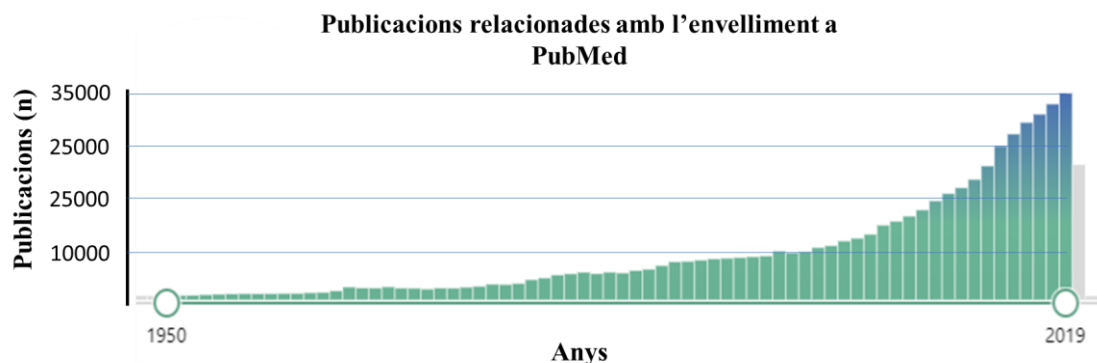


**Figura 4: Prevalença de malalties cròniques en adults majors de 20 anys.** Figura modificada a partir dels resultats de l'enquesta nacional d'examen de salut i nutrició. Figura modificada a partir de Ginneken 2017 (19).

Les actuals condicions socioambientals i l'assistència mèdica han millorat la qualitat de vida i s'han associat a un augment general de l'esperança de vida. L'envelliment de la població està a punt de convertir-se en una de les transformacions socials més significatives del segle XXI amb implicacions per a gairebé tots els sectors de la societat, suposa un gran impacte en el sector de la medicina i la investigació, els mercats laborals i financers, la demanda de béns i serveis (com l'habitatge, el transport i la protecció social) i les estructures familiars.

L'interès científic envers l'envelliment de la població és cada cop més gran. Durant els últims anys, a augmentat de forma sostinguda el nombre de publicacions científiques realitzades en l'àmbit mundial (**Figura 5**). Segons les dades proporcionades per l'Índex Global d'Innovació, un llistat elaborat per l'Organització Mundial de la Propietat Intel·lectual (OMPI), INSEAD Business School i la Universitat de Cornell, Espanya es troba entre els 30 països més innovadors del món, exactament, en el lloc 28, d'un total de 143. La producció científica en el

període de 2009-2019 va créixer a ritme constant i de forma diferencial respecte a altres àmbits de la recerca, sent de més de dues vegades superior de la resta de països.



**Figura 5: Número de publicacions (per any) relacionades amb l'envelliment.** El terme de cerca "envelliment" es va introduir a PubMed el 27 de juliol de 2020.

## 1.2. Estructura i funció del cor durant l'envelliment

### 1.2.1. Fenotip cardiovascular durant l'envelliment

L'edat avançada s'ha relacionat amb alteracions estructurals, funcionals, mecàniques i elèctriques del cor, i cadascuna d'elles pot tenir implicacions significatives per a les malalties cardiovasculars. Hi ha una sèrie de factors que vinculen l'envelliment amb la insuficiència cardíaca i redueixen gradualment la quantitat de reserva cardíaca, augmentant així la probabilitat de que el cor es torni funcionalment deficient (18)(20).

El miocardi senescent desenvolupa diversos canvis cel·lulars i extracel·lulars. Alguns dels canvis més prominents associats a l'envelliment son: una reducció del nombre total de cardiomiòcits i un augment compensatori de la seva mida, juntament amb un augment compensatori del desenvolupament d'àrees focals de fibrosi, i també canvis intracel·lulars (oxidacions i carbonilacions de proteïnes, lípids i nucleòtids) que tenen importants conseqüències funcionals i estructurals, així com importants implicacions en l'estrès de la paret cardíaca i l'eficàcia contràctil.

En l'àmbit vascular, es produeixen canvis en la paret arterial i l'endoteli vascular que indueixen un augment de la rigidesa de les artèries i una reducció de la seva distensibilitat que a la llarga poden afavorir el desenvolupament d'aterosclerosi (disminució de l'alliberament de vasodilatadors i augment de la síntesi de vasoconstrictors) (21)(22)(18). L'augment de la rigidesa de l'artèria pot causar una elevació de la pressió arterial que condueix al desenvolupament de mecanismes compensatoris per part del miocardi, com l'augment de la massa muscular del ventricle esquerra i la hipertròfia cardíaca (23). La fibrosi cardíaca és un procés reactiu que s'associa amb hipertròfia ventricular esquerra i que augmenta amb l'edat (24). S'ha demostrat que els ratolins envellits desenvolupen canvis estructurals en el teixit miocàrdic similars als observats en humans ancians (25)(26), incloent-hi la fibrosi, la remodelació de la matriu extracel·lular, així com la disminució de l'acoblament cel·lular al múscul cardíac.

A nivell funcional, hi ha canvis i respostes compensatòries que pateix el cor envellit que disminueixen la seva capacitat de resposta a una càrrega de treball més gran i disminueixen la seva capacitat de reserva, com per exemple, canvis en la freqüència cardíaca màxima, volum sistòlic final, volum diastòlic final, contractilitat, contracció sistòlica prolongada, relaxació diastòlica prolongada, senyalització simpàtica, etc (25)(26).

### 1.2.2. L'envelliment dels cardiomiòcits

Els cardiomiòcits són les cèl·lules contràctils que conformen el múscul cardíac. Tenen la capacitat d'excitar-se i conduir potencials d'acció a través de la seva membrana cel·lular (27)(27)(27). Els cardiomiòcits són cèl·lules post-mitòtiques terminalment diferenciades i malgrat els esforços invertits per demostrar l'existència d'una replicació activa en el seu estat adult, el consens és que la renovació de cardiomiòcits humans en l'edat adulta és extremadament baixa o nul·la i que la majoria de les cèl·lules cardíques que tenim en el moment del naixement romanen fins a la fi de les nostres vides (28)(18). A més, les proves experimentals indiquen que la mort apoptòtica intrínseca (citocrom c-dependent) és reprimida en els cardiomiòcits adults (29). Per tant, algunes de les característiques fenotípiques de l'envelliment dels cardiomiòcits poden reflectir el desenvolupament de canvis adaptatius progressius en les modificacions induïdes per l'edat en absència d'un programa actiu de suïcidi / reemplaçament de cèl·lules.

Durant l'envelliment es produeix un acúmul progressiu de dany molecular dins de les cèl·lules, que contribueix a la pèrdua de l'homeòstasi cel·lular i augmenta el risc de malaltia i mort. El grau de dany molecular depèn de processos estocàstics que es poden accelerar per factors ambientals i augmenta durant l'envelliment degut a la disminució de l'eficiència dels mecanismes de reparació cel·lular que estan genèticament controlats.

Alguns trets fisiopatològics prevalents dels cardiomiòcits senescents, com per exemple un cert grau de desacoblament entre la demanda i la producció energètica, poden comprometre a la capacitat de les cèl·lules a adaptar-se i a respondre adequadament a l'exercici i l'estrès (30)(31) i poden conduir a una disfunció. Per tot això, pot ser difícil establir el límit entre la salut i la malaltia del cor durant l'envelliment (32)(18). De fet, algunes de les característiques fenotípiques més prevalents en els cardiomiòcits vells, és a dir, les alteracions en l'homeòstasi del calci intracel·lular (33), la disminució de l'eficiència respiratòria mitocondrial (34) i l'augment del estrès oxidatiu (35) també s'han descrit en la insuficiència cardíaca (32)(18).

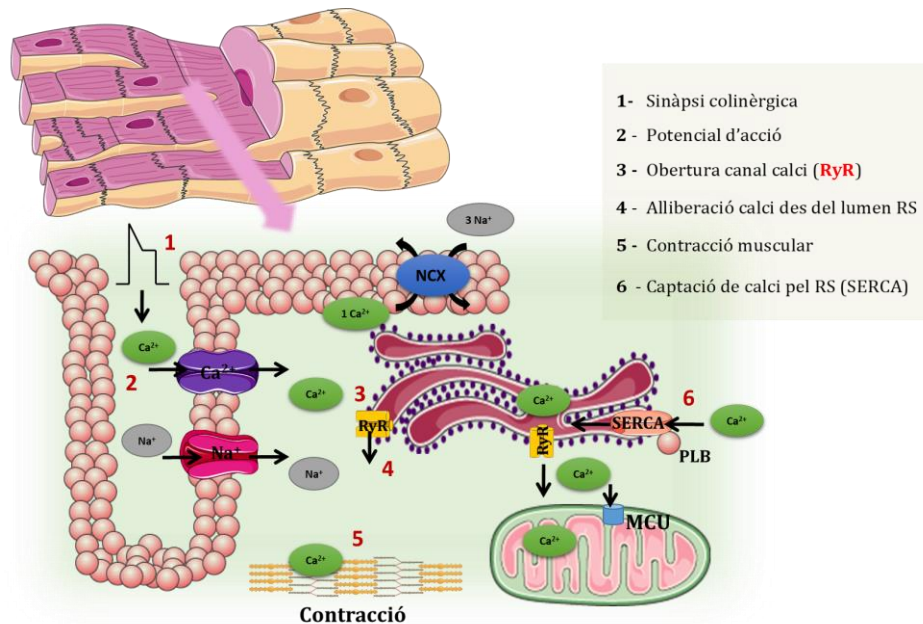
## 1.3. Reticle sarcoplàsmic i mitocondris en l'envelliment dels cardiomiòcits

A causa de l'activitat contràctil ininterrompuda i d'intensitat variable que desenvolupen els cardiomiòcits al llarg de tota la vida, el control del calci i la generació d'ATP són dos processos cel·lulars crítics que estan regulats de forma estricta. El **RS** i els **mitocondris** són els orgànuls responsables d'ajustar de forma continua l'activitat contràctil amb l'aport energètic i la demanda metabòlica en cada batec cardíac (36)(37)(38).

### 1.3.1. El reticle sarcoplàsmic

El **RS** és una estructura especialitzada del reticle endoplasmàtic present en els cardiomiòcits i les cèl·lules musculars esquelètiques. Forma un sistema de túbuls continus al voltant de les miofibril·les i es un dels principals responsables de la regulació de calci durant la contracció muscular. El RS és el reservori més important de calci intracel·lular en el múscul cardíac i participa de forma activa en el acoblament electromecànic entre l'excitació i la contracció. L'acoblament electromecànic comença quan un impuls elèctric o potencial d'acció que es desplaça per la membrana cel·lular obre els canals de tipus L, afavorint l'entrada de calci des de l'espai extracel·lular a l'interior de la cèl·lula. L'augment de calci intracel·lular promou l'obertura del receptor de rianodina (RyR) ubicat en la membrana de RS, estimulando l'alliberació de calci des del RS al citosol, un fenomen anomenat *calcium induced calcium release* (CICR) (39)(40). El calci interacciona amb la troponina T de les miofibril·les estimulant el desplaçament de la tropomiosina i donant lloc a l'escurçament de la fibra (contracció) a partir de

la unió de l'actina amb la miosina. Un cop el potencial d'acció de membrana retorna a valors basals o de repòs, el procés es reverteix, restaurant els nivells de calci citosòlic a través de la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (SERCA) a l'interior del RS en un procés que és dependent d'ATP (relaxació). La part remanent del calci que havia entrat pels canals L és eliminada a l'exterior de la cèl·lula per l'intercanviador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmàtica (41)(42). D'altra banda, l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el mitocondri es contraresta pels intercambiadors de calci mitocondrial  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (mNCX) i  $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (mHCX) (**Figura 6**) (43).



**Figura 6: Esquema que il·lustra el procés d'acoblament electromecànic (cicle cel·lular d'excitació-contracció).** En el punt 1, potencial d'acció, s'allarga en el temps tota la contracció. Una petita fracció de calci entra als cardiomiòcits a través dels canals de membrana de tipus L dependents de calci i es desencadena l'alliberació del calci contingut al reticle sarcoplàsmic (RS) activant els receptors de rianodina (RyR). El calci alliberat pel RS estimula les miofibril·les contràctils per dur a terme la contracció del múscul cardíac. Una part d'aquest calci es captat pels mitocondris a través del unitransportador mitocondrial de calci (MCU), el calci mitocondrial regula l'activitat del cicle de Krebs i la producció d'ATP mitocondrial. La concentració de calci citosòlic es normalitza en cada cicle mitjançant la recaptació de calci per part del RS a través de la SERCA ATPase i l'intercanviador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (NCX) de la membrana plasmàtica. Figura modificada a partir de Bers et al. (44).

L'edat avançada s'associa amb trastorns en el procés d'acoblament mecànic en els miòcits ventriculars que pot augmentar la propensió a les arrítmies cardíacques en la població envellida (25)(45). Entre les diverses proteïnes i transportadors del RS que poden ser candidats a ser afectats per l'edat, RyR i SERCA s'han proposat de manera consistent per a què hi tinguin un paper important (46).

El RyR és el canal iònic intracel·lular més gran conegut. Està format per una estructura homotetramèrica amb una massa molecular de més de 2,2 megadaltons. Existeixen 3 isoformes del RyR, de les quals la isoforma 2 (RyR2) és la més abundant al múscul cardíac. El RyR2 és una molècula de 564 kDa de massa formada per un tetràmer amb un alt contingut de cisteïnes (Cys) en la seva cadena polipeptídica: consta d'un total de 360 residus, dels quals 84 es troben en forma reduïda (grups sulfidril o tiol (-SH)) (47). Dins el RS, els canals RyR es troben molt a prop dels canals de calci de tipus L (LTCC) per facilitar el transport ràpid i coordinat de  $\text{Ca}^{2+}$

des del sarcolemma. El RyR també participa en el procés d'acoblament electromecànic facilitant l'intercanvi de calci entre el RS i els mitocondris (48)(49)(50). El 80 % de la seva massa molecular es troba al citosol, una ubicació que el fa particularment susceptible als productes dicarbonils que es generen en la cèl·lula (especialment Arg i Lys a la regió citosòlica) (51)(52)(53). En aquest sentit, és important indicar que el RyR interactua amb múltiples proteïnes per formar un gran complex proteic que regula la seva funció en condicions fisiològiques. En general, no s'han detectat canvis en els nivells d'expressió del RyR durant l'envelliment. No obstant això, com a grans complexos macromoleculars, RyR pot modular l'expressió i l'activitat de múltiples proteïnes accessòries que també participen en la regulació del calci, com la calmodulina (CaM), la calsequestrina (CSQ2), junctina i triadina (54). Aquesta interacció proteica també és fonamental per a la progressió de la disfunció cardíaca (55). La probabilitat de que els canals de RyR es mantinguin oberts és finita, la qual cosa condueix a petites fugues de calci des del RS durant la diàstole, conegut com a *calcium leak* (56). Algunes d'aquestes fugues es poden visualitzar com a espurnes de  $\text{Ca}^{2+}$  (*calcium sparks*) mentre que altres són invisibles a causa dels límits de detecció actuals. Treballs previs indiquen que la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  és elevada al cor durant l'envelliment (57)(58)(59) però els mecanismes responsables no s'han establert de forma definitiva.

Associat amb RyR, SERCA és la proteïna més abundant del RS cardíac. SERCA és una ATPasa de calci que transfereix el calci del citosol al lumen del RS a costa de la hidròlisi d'ATP, permetent una relaxació contràctil (diàstole). És responsable del segrest de la major part del calci citosòlic alliberat pel RyR en cada contracció, tot i que la quantitat total de calci que pren SERCA depèn de cada espècie animal. Així, per exemple, en els rosegadors, el SERCA recapta el 92 % del calci citosòlic i només el 8 % restant és extret per l'intercanviador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (56), mentre que en els humans l'intercanviador SERCA i  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  contribueixen al 76 % i el 24 % de normalització del calci, respectivament (60). L'afinitat del SERCA pel calci es controla principalment per la proteïna reguladora fosfolambà (PLB). Així, el SERCA és inhibit pel PLB. La fosforilació a Ser-16 per proteïna kinasa A (PKA) o per calmodulina kinasa II (CaMKII) a Thr-17 activa PLB. A més SERCA és altament sensible als canvis en l'estat metabòlic del citosol, incloent la relació ATP/ADP, el pH i el potencial redox (42), i pot interactuar amb una àmplia gamma de proteïnes incloent, fosfatasa 1 (PP1), calreticulina i sarcoplipina (61). Les dades experimentals sobre la seva expressió i funció durant l'envelliment són confuses i a vegades contradictòries (62). En insuficiència cardíaca, alguns estudis no han pogut demostrar canvis en la funció de SERCA (57)(33), mentre que altres descriuen una reducció de la captació de calci per la SERCA (63), així com una disminució del contingut de calci en el RS (64)(42). S'ha demostrat que l'expressió de proteïnes de SERCA disminueix amb l'edat (25). La disminució en el contingut de calci en el RS i la reducció de l'amplitud dels trànsits de calci també s'han descrit en cardiomiòcits auriculars humans envellits, afavorint l'aparició de disfuncions contràctils, com la fibril·lació auricular (65).

### 1.3.2. Els mitocondris

Els **mitocondris** són els òrgans cel·lulars encarregats de subministrar energia a la cèl·lula en forma d'ATP en un procés dependent de consum d'oxigen que s'anomena fosforilació oxidativa. La fosforilació oxidativa es basa en la generació d'un gradient electroquímic de  $\text{H}^+$  en la membrana interna del mitocondri durant el transport d'electrons a través dels enzims de la cadena respiratòria de la membrana interna mitocondrial. Aquest gradient és utilitzat per l'ATP sintasa mitocondrial per generar ATP. El cor és l'òrgan amb major consum energètic de l'organisme (30 kg d'ATP/dia) (66). Per aquest motiu, els cardiomiòcits són les cèl·lules que



contenen major número de mitocondris (7000 mitocondris/cèl·lula, 35 - 40 % del volum cel·lular).

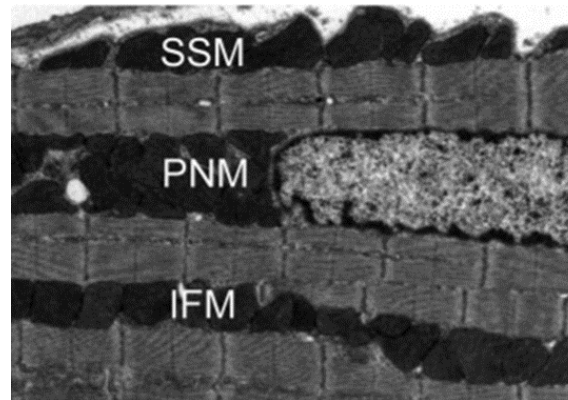
La microscòpia electrònica de transmissió ha permès evidenciar la presència de diferents poblacions mitocondrials dins els cardiomiòcits (**Figura 7**): 1) els mitocondris subsarcolemals (SS), en contacte amb el sarcolemma, amb baixa densitat electrònica en la matriu i crestes lamel·lifformes; 2), els mitocondris interfibril·lars (IF), distribuïts entre les miofibril·les d'actina-miosina, més allargats i amb alta densitat electrònica i crestes tubulars; i 3) els mitocondris perinuclears (PN), localitzats al voltant del nucli (67). Cada una d'aquestes poblacions mitocondrials té unes característiques bioquímiques pròpies i diferencials (67). Aquesta alta subespecialització dels mitocondris cardíacs indica que poden estar implicades en diferents vies de senyalització i poden exercir rols fisiològics específics en els cardiomiòcits (68).

Els mitocondris IF són els més abundants en les cèl·lules cardíques, representen al voltant del 80 % de la massa total de mitocondris (69). Aquesta subpoblació té una alta capacitat de captació i retenció de calci i es més resistent a experimentar l'obertura del por de transició mitocondrial (mPTP). EL mPTP es un augment bruscat de la permeabilitat de la membrana interna mitocondrial a ions i metabòlits fins a 1.5 kDa. Certes condicions patològiques a on hi ha un excessiu estrès oxidatiu o sobrecàrrega de calci mitocondrial poden induir l'obertura irreversible del mPTP (70). El mPTP és un canal no específic que permet la difusió de molècules de fins a 1500 da. La seva obertura permanent és incompatible amb la vida cel·lular perquè indueix: 1) entrada massiva de protons i dissipació irreversible del potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), impeding la fosforilació oxidativa i la síntesi d'ATP; 2) *calcium leak* i nucleòtids, entre altres molècules petites; 3) entrada d'aigua i soluts de massa molecular fins a 1500 Da provocant una dilatació de la matriu, desplegament de crestes mitocondrials i ruptura de la membrana mitocondrial externa. En condicions fisiològiques, la subpoblació de mitocondris IF està exposada a una major concentració de calci (71). Els mitocondris IF tenen una activitat respiratòria més elevada que suggereix una major activitat metabòlica (72). La proximitat dels mitocondris IF a les intenses exigències energètiques dels miofilaments també pot contribuir a diferències funcionals en el maneig de  $Ca^{2+}$  mitocondrial (73).

En canvi, els mitocondris SS tenen crestes lamel·lifformes i una morfologia més variable al estar restringits a la superfície de la cèl·lula en contacte amb el sarcolemma, s'ha suggerit que proporcionen l'ATP necessari pel funcionament dels transportadors iònics del sarcolemma però tenen probablement altres funcions reguladores no identificades (74).

Els mitocondris PN es concentren en clústers al voltant del nucli cel·lular i presenten una morfologia més rodona i més petita que la subpoblació de mitocondris IF. Aquests grups perinuclears estan densament empaquetats i mostren una autofluorescència més brillant com a resultat de la major concentració de NADH mitocondrial (73). Aquesta agrupació mitocondrial perinuclear pot servir per impulsar el metabolisme mitocondrial a generar ATP a prop de el nucli (75), segons un concepte prèviament proposat d'una xarxa integrada de fosfotransferència i canalització d'energia entre els mitocondris i el nucli (76). El paper fisiològic dels mitocondris perinuclears segueix sent un misteri, però sembla raonable especular que poden tenir un paper en la maquinària d'importació nuclear (77)(67).

Diversos estudis han vinculat el procés d'envelliment amb la disfunció mitocondrial, per mecanismes que encara no estan ben establerts. Així s'ha descrit una reducció del nombre de mitocondris actius, que pot ser deguda a una disminució de la biogènesi mitocondrial, o a una mitofàgia defectuosa que porta a l'acumulació de mitocondris danyats (78). També s'ha descrit alteracions en la funció dels complexos respiratoris i en l'eficiència de producció d'ATP durant l'envelliment (79), així com alteracions en la formació de supercomplexos respiratoris, entre d'altres.



**Figura 7: Micrografia electrònica de transmissió del miocardi de rata que il·lustra les diferents poblacions mitocondrials dins els cardiomiòcit.** Mitocondris subsarcoleimals (SSM); Mitocondris interfibril·lars (IFM); i mitocondris perinuclears (PNM). Figura procedent de Davidson (80).

Un paper fonamental dels mitocondris es el de participar en el control del calci cel·lular. Els mitocondris són, juntament amb el RS, els orgànuls cel·lulars amb major capacitat per acumular calci al seu interior, ajudant, d'aquesta forma, a mantenir la homeòstasi del calci citosòlic (81)(82). Una part del calci alliberat pel RyR des del RS és captat pel mitocondri a través del canal d'anions dependents de voltatge (VDAC), una porina que s'ubica en la membrana mitocondrial externa. El calci passa a la matriu mitocondrial a través del MCU situat en la membrana mitocondrial interna (83). Encara que el MCU presenta una baixa afinitat pel calci (de l'ordre de  $\mu\text{M}$ ), el calci passa activament a l'interior de la matriu degut a que existeix una gran densitat del transportador en membrana (10 - 40 per  $\mu\text{m}^2$ ) i a que el calci assoleix una concentració molt elevada en els microdominis cel·lulars formats per la interacció del RS i els mitocondris. En el citosol existeixen zones amb alta densitat de mitocondris propers al RS que es consideren punts calents de calci, a on el 90 % dels RyR estan físicament pròxims als mitocondris (entre 50-100 nm de distància entre ambdós) (84) estabilitzats per enllaços moleculars entre el RyR i VDAC (85)(86). El calci estimula la producció d'ATP mitocondrial mitjançant la regulació de l'activitat de tres deshidrogenases del cicle de Krebs: piruvat deshidrogenasa, isocitrat deshidrogenasa i  $\alpha$ -cetoglutarat deshidrogenasa (87). A través de la regulació del cicle de Krebs, el calci mitocondrial modula la generació de dos donants d'electrons (NADH i FADH) necessaris per a la síntesi d'ATP; també regula la generació de NADPH necessari per a la regeneració d'enzims antioxidants (TRX i GSH) (43)(88). El manteniment de l'homeòstasi de calci té un cost d'ATP important per als cardiomiòcits, sent SERCA i els transportadors iònics sarcolemals dependents d'ATP (és a dir, l'ATPasa de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ ) les proteïnes consumidores d'energia més grans (64). Per tant, la baixa o nul·la producció d'ATP pot provocar alteracions en el maneig de calci i en l'activitat contràctil (83)(89).

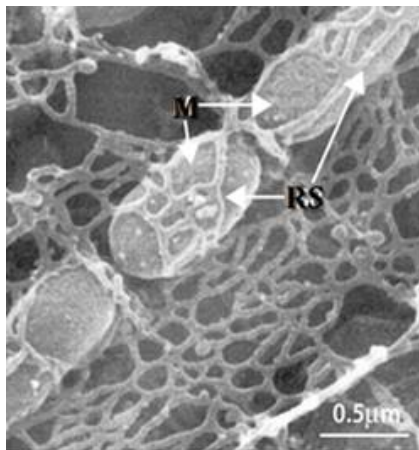
El nostre grup ha descrit que els mitocondris IF dels cor dels ratolins vells desenvolupen un dèficit en la seva capacitat per tolerar la sobrecàrrega de calci i com a conseqüència es tornen més susceptibles a desenvolupar mPTP durant el dany per isquèmia-reperfusió (30). També hem demostrat que els mitocondris són capaços de captar calci de forma activa durant la isquèmia abans de que es produeixi una despolarització total de la seva membrana (90). D'aquesta forma, els mitocondris poden contribuir a reduir la sobrecàrrega de calci citosòlic que es produeix durant la isquèmia-reperfusió reduint la taxa d'hipercontractura i la mort cel·lular. Tanmateix, en aquest laboratori també s'ha descrit que en cardiomiòcits de ratolins vells (>20 mesos) sotmesos a isquèmia-reperfusió, els mitocondris no capten calci amb la mateixa eficiència que

en cardiomiòcits de ratolins joves (30). Com a conseqüència d'això, els cardiomiòcits vells experimenten una major sobrecàrrega de calci citosòlic amb conseqüències deletèries sobre la supervivència cel·lular (major grau d'hipercontractura, major mPTP i major necrosi) (30).

### 1.3.3. Comunicació RS i mitocondris en l'homeòstasi del calci intracel·lular

El RS i els mitocondris estan funcionalment coordinats en el maneig del calci i la síntesi d'ATP, elements necessaris per la contracció muscular i l'ajust de la producció energètica amb la demanda mecànica de la cèl·lula (38). Aquesta coordinació és possible gràcies a l'estreta comunicació anatòmica entre aquests dos orgànuls. Les conseqüències de l'alteració de la comunicació entre aquests dos orgànuls són cada vegada més reconegudes en la fisiopatologia del cor, degut al seu impacte sobre la generació d'ATP, la regulació del calci i el manteniment de les defenses antioxidants (estrès oxidatiu).

La comunicació fisiològica entre el RS i els mitocondris va ser descrita per primera vegada per Copeland al 1959 (91). Trenta anys després d'aquest descobriment es va aïllar, per primera vegada, la fracció cel·lular coneguda com a membranes associades als mitocondris (MAMs) a partir de centrifugació diferencial i purificació amb Percoll (92). Alguns anys més tard, els estudis de Rizzuto van demostrar la existència de microdominis de calci al voltant de les regions subcel·lulars del RS i els mitocondris, amb importants conseqüències funcionals (93). La interacció entre ambdós orgànuls resulta en una simbiosi funcional, a on el RS proporciona el calci necessari per a l'ajust de la fosforilació oxidativa i la producció d'ATP en el mitocondri, i el mitocondri proporciona ATP al RS per activar la recaptació del calci mitjançant la SERCA després de la contracció cel·lular (43)(94)(38)(93) (**Figura 8**).



**Figura 8: Interacció entre els mitocondris i el RS.** Imatge obtinguda per microscòpia electrònica de rastreig d'una secció longitudinal ultrafina d'un cardiomiòcit de gos a on es mostra el reticle sarcoplasmàtic (RS) que s'estén com una xarxa establint contactes de gran proximitat amb els mitocondris (M). Figura modificada a partir de (95).

El nostre grup ha descrit una comunicació defectuosa entre els mitocondris i el RS en cardiomiòcits de cors senescents. Estudis recents demostren que la captació de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial depèn més dels microdominis anatòmics-funcionals establerts amb el RS que de la concentració de calci citosòlic. Hi ha evidències experimentals que indiquen que les alteracions en la comunicació entre el RS i els mitocondris poden tenir un paper causal en la insuficiència cardíaca (77).

S'ha suggerit que la interacció entre el RS i els mitocondris participa en els trànsits de  $\text{Ca}^{2+}$  i en la disfunció mitocondrial observada tant en cors diabètics com en la gènesi de determinades arrítmies, i pot tenir un paper important en el dany miocàrdic per isquèmia-reperfusió. Així, durant la reperfusió, la re-energització en presència de sobrecàrrega citosòlica de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca oscil·lacions de  $\text{Ca}^{2+}$  impulsades pel RS, que poden promoure l'obertura del mPTP (96). A més a més, aquest fenomen es bidireccional, ja que la obertura del mPTP pot alliberar calci al citosol i afavorir el desenvolupament d'hipercontractura i mort cel·lular (38). Es va demostrar una

interacció parcialment interrompuda de VDAC i RyR en cardiomiòcits ventriculars de cors envellits, aquest interacció alterada no pot explicar-se per una disminució de l'expressió d'aquestes proteïnes, perquè la quantitat de RyR i VDAC, segons la quantificació del marcatge immunofluorescent, la tècnica del Western blot i la proteòmica, va ser similar en ambdós grups d'edats. L'alteració en la proximitat anatòmica entre RS i els mitocondris, els defectes en l'alliberació de calci pel RyR o la intercomunicació entre el RS i els mitocondris són cada vegada més reconeguts com un factors importants en la fisiopatologia de diverses condicions en el cor, i amb conseqüències sobre la disponibilitat d'ATP, el calci citosòlic i l'estrès oxidatiu, tenint una repercussió negativa en l'homeòstasi del calci i simultàniament podent provocar una disfunció mitocondrial (96).

#### 1.4. Productes finals de glicació avançada

Els productes finals de glicació avançada (en anglès, advanced glycation end-products; AGE) són un grup heterogeni de compostos generats a través de la glicació no enzimàtica de proteïnes, lípids i àcids nucleics. Els AGE han estat implicats en molts trastorns vinculats amb l'edat i s'han relacionat amb l'estrès oxidatiu de l'envelliment (97)(51)(98). Els AGE són de naturalesa i origen endogen; però, també es poden adquirir a partir de fonts exògenes com: el fum del tabac i alguns aliments i begudes processats. Els canvis químics estructurals que donen lloc a aquests compostos es desenvolupen lentament durant dies o mesos, de manera que les proteïnes que tenen una vida mitjana llarga, com el col·lagen, són més susceptibles a ser modificades per l'exposició sostinguda als precursors d'AGE (99).

Els AGE exerceixen els seus efectes patògens mitjançant tres mecanismes moleculars principals: modificació de proteïnes extracel·lulars, modificació de proteïnes intracel·lulars i activació de cascades de senyalització mitjançant la unió als receptors de membrana dels AGE (RAGE). En l'àmbit mèdic aquest procés de glicació molecular és d'interès degut a la notòria associació entre els AGE i certes patologies cròniques com malalties vasculars, renals, diabetis, cataractes i malalties degeneratives (Parkinson, dipòsits de substàncies amiloides en la malaltia d'Alzheimer) (100)(101).

La glicació de les proteïnes extracel·lulars pot alterar l'estructura, la funció i les propietats del teixit, i pot desencadenar una resposta inflamatòria. El col·lagen, l'elastina i la laminina són proteïnes estructurals clau de la membrana i del teixit connectiu. Tenint en compte la seva llarga vida mitjana i la seva composició d'aminoàcids, són altament susceptibles a patir modificacions químiques que les converteixen en AGE. Les molècules de col·lagen glicat són resistents a la digestió proteolítica (23), i formen enllaços creuats amb altres proteïnes extracel·lulars, provocant una alteració de la matriu extracel·lular. En els vasos, aquest mecanisme provoca una disminució de la flexibilitat de les parets i un augment de la rigidesa vascular (102)(103)(104). La glicació de proteïnes extracel·lulars estructurals en la matriu del miocardi també augmenta la rigidesa del miocardi, contribuint a deteriorar la relaxació i la disfunció diastòlica (105). Les proteïnes circulants com l'albumina, hemoglobina, immunoglobulines i lipoproteïnes també poden ser diana de glicació, especialment en condicions d'hiperglucèmia, ja que la glucosa és un precursor important de la formació d'AGE.

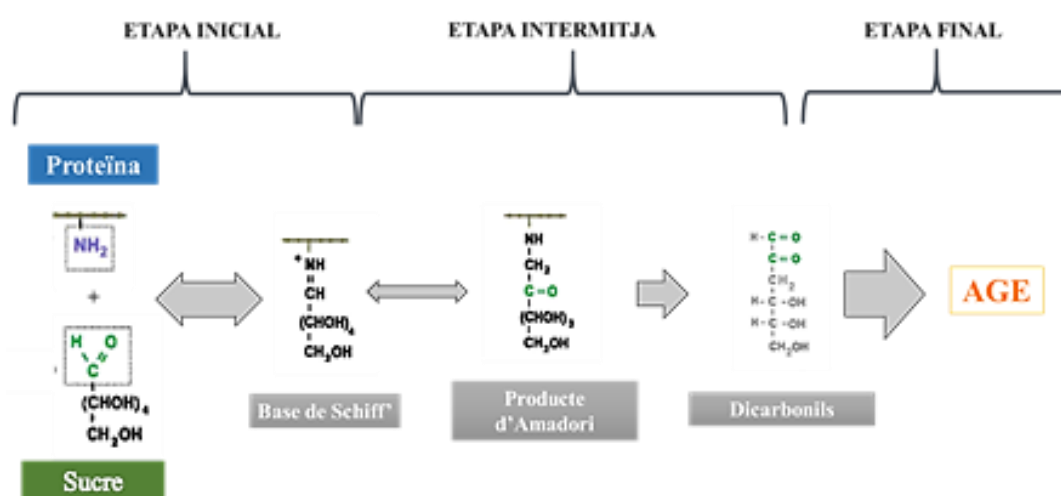
El RAGE és un receptor transmembrana de 45 kDa, un multiligand que pertany a la família de les immunoglobulines, que reconeix estructures tridimensionals enlloc de seqüències oligomèriques. La unió dels AGE a la proteïna comença la transcripció del factor proinflamatori (NF- $\kappa$ B) amb la resposta inflamatòria consegüent. Aquest receptor està format per un domini extracel·lular, un domini transmembrana i un domini citoplasmàtic curt que és essencial per a la transducció (106). Fins al moment no es compta amb assaigs clínics controlats que demostrin la

importància de sRAGE en humans; però, diversos estudis han assenyalat que nivells disminuïts s'associen a una major incidència d'esdeveniments cardiovasculars (107).

#### 1.4.1. Formació dels AGE

La glicació atén a la modificació irreversible i no enzimàtica de molècules (proteïnes, lípids, ADN) a partir d'una hexosa, pentosa o aldehids generats durant el metabolisme dels glúcids, peroxidació lipídica i autooxidació de sucres. Les formes químiques que se'n deriven poden donar lloc a estructures glicades entre-enllaçades (108).

Louis-Camille Maillard (109), va ser el primer en descriure la reacció entre un sucre i un grup amino (coneguda com reacció de Maillard). La reacció de Maillard engloba una sèrie de reaccions complexes que comprenen deshidratacions, reordenaments moleculars i formació d'aldehids altament reactius que, modificant altres molècules de forma irreversible, generen als AGE (110) (Figura 9).



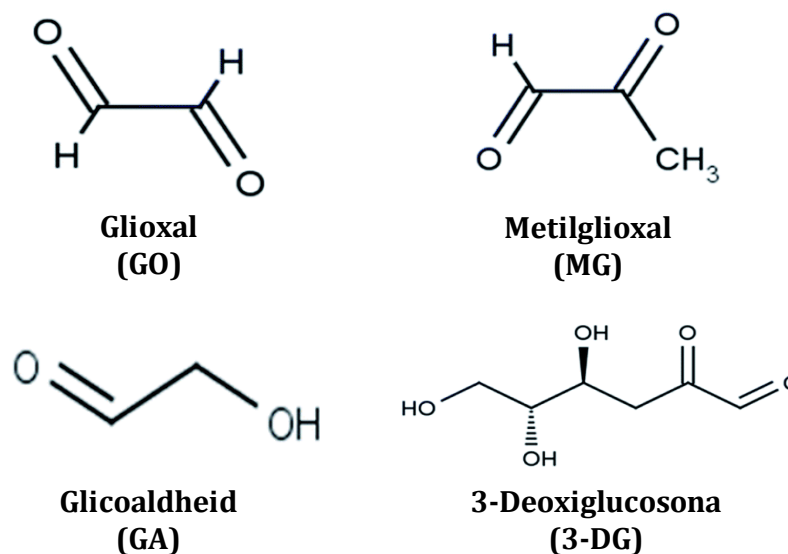
**Figura 9: Esquema del procés químic de formació dels AGE.** La formació canònica dels AGE es produeix en tres etapes. En la etapa inicial, els sucres reaccionen amb un grup amino lliure per formar la base de Schiff, que es transforma ràpidament en un producte més estable conegut com a producte d'Amadori. En la etapa intermèdia, el producte d'Amadori es degrada a diversos compostos dicarboxílics reactius. En la etapa final, es generen les formes glicades més avançades o AGE (compostos irreversiblement modificats). Figura modificada a partir de Singht, Bali, Singh i Jaggi, 2014 (111).

#### 1.4.2. Precursors, sistemes de detoxificació i tipus d'AGE

##### 1.4.2.1. Metilglioxal i Glioxal són importants precursors fisiològics d'AGE

Un pas crític per a la **formació** d'AGE és la generació d'intermediaris dicarboxílics (principalment metilglioxal (MG) i glioxal (GO)). Els dicarbonils són compostos molt tòxics i reactius que evolucionen lenta i irreversiblement cap a la formació d'AGE (108) (Figura 10). Els intermediaris dicarboxílics poden interaccionar amb els grups amino d'una proteïna, formant un enllaç covalent de tipus irreversible. Aquesta modificació pot afectar a l'estructura de la proteïna i en conseqüència alterar la seva funció biològica (112). S'ha proposat que la toxicitat del MG i el GO pot conduir a l'etiopatogènesi de malalties cardiovasculars, diabetis mellitus, malaltia de Parkinson i malaltia d'Alzheimer (113)(114). Els compostos dicarboxílics són unes 2000 vegades més reactius que la glucosa (115). Degut a la seva toxicitat, totes les cèl·lules de l'organisme presenten sistemes de detoxificació específics i molt eficients (la via de

detoxificació dependent de la glioxalasa) que permeten convertir els compostos dicarbonílics en metabòlits sense capacitat glicativa, que després s'excreten per l'orina (108).

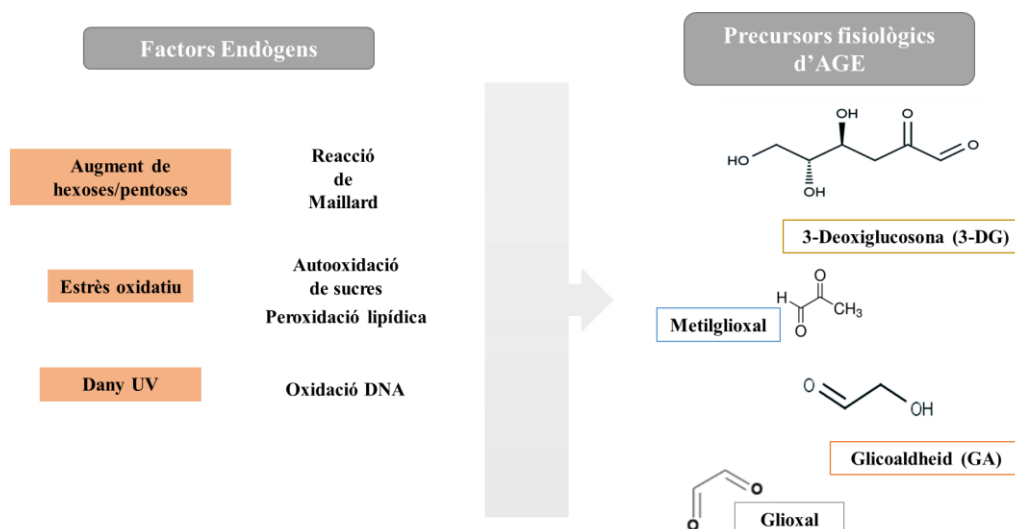


**Figura 10: Principals precursors d'AGE.** Figura modificada a partir de Rabbani i Thornalley, 2015 (108).

El MG és un producte omnipresent en el metabolisme cel·lular. Es genera fonamentalment a partir d'intermediaris de la glucòlisi per fragmentació espontània del gliceraldehid-3-fosfat i la fosfat de dihidroxiacetona. La taxa de formació de MG depèn de l'organisme, el teixit, el metabolisme cel·lular i les condicions fisiològiques. S'estima que el 0,1-0,4 % del flux glicolític resulta en la producció de MG (116) i que la taxa de formació de MG, gliceraldehid 3-fosfat (GAP), és de 0,1 mM per dia en teixits de rata (Richard, 1991). S'ha valorat que la concentració de MG en el fluid cerebrospinal de pacients és de 10 - 20  $\mu\text{M}$  (114), i la concentració de MG intracel·lular es troba en el rang baix de  $\mu\text{M}$  (117). És important destacar que, com que el MG és altament reactiu, la seva vida mitjana és curta en un entorn biològic i, per tant, en el moment i lloc de producció, les concentracions en punts concrets de l'organisme poden ser significativament més altes (116). Com a exemple de la potència en què el MG reacciona amb mostres biològiques, l'addició de 1  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ] MG al plasma humà ex vivo es capaç de produir una unió irreversible completa de MG a la proteïna plasmàtica en menys de 24 h a 37 °C (117). En conseqüència, fins a un 90 - 99 % de MG cel·lular està lligat a macromolècules, i l'avaluació de MG total (lliure + lligat) suggereix que es poden arribar a concentracions cel·lulars fins a 300  $\mu\text{M}$  (118)(119). Els nivells més elevats de MG es produeixen quan les concentracions dels seus precursors són elevades, com en la hiperglucèmia i la deficiència d'isomerasa triosafosfat (120). La reacció entre el MG i l'arginina dóna lloc a diversos tipus d'AGE, com l'argipirimidina i les hidroimidazolones (MG-H1, MG-H2). La reacció entre el MG i la lisina dóna lloc a N $\epsilon$ -carboxietil-lisina (CEL) (121).

El GO és el dialdehid més petit que s'origina endògenament a partir de l'autooxidació de sucres, oxidació de l'ADN i oxidació lipídica. Aquestes reaccions estan afavorides per l'estrès oxidatiu i esgotament de glutatió (122)(123). El GO reacciona amb la lisina produint N- $\epsilon$ -carboximetil-lisina (CML).

En la **Figura 11** s'hi resumeix les vies de formació endògena del MG, GO, 3-DG i GA.



**Figura 11: Factors endògens relacionats amb la formació dels precursors d'AGE: GO, MG, 3-DG i GA.** Figura modificada a partir de Kielhorn et al. 2004 (122).

#### 1.4.2.2. Detoxificació dels precursors d'AGE

La formació d'AGE està íntimament associada al metabolisme cel·lular i la seva producció és constant, de tal forma que la cèl·lula s'aprovisiona de sistemes per evitar-ne la seva formació i així, prevenir el dany molecular que generen. Hi ha un conjunt especialitzat d'enzims que prevenen la glicació de proteïnes en els sistemes fisiològics.

El sistema de glioxalasa (Glo) es va descobrir el 1913 com un sistema enzimàtic que catalitza la conversió del MG a lactat en els sistemes fisiològics (Dakin, H. D. and Dudley, H. W. 1913); El 1951 es va demostrar que hi havia dos passos seqüencials catalitzats per la glioxalasa 1 (Glo 1) i la glioxalasa 2 (Glo 2) (**Figura 12**) (125).

La Glo 1 es troba al citosol de la cèl·lula i la Glo 2 en la matriu mitocondrial. La reacció de detoxificació depenent de Glo, necessita de glutatió per la catàlisi dels substrats. Els substrats són el MG i el GO. S'ha demostrat que els productes terminals del metabolisme del MG pels sistema de la Glo són el D-lactat i el glicolat, respectivament (126) (**Figura 13**).

Altres enzims com les aldo-ceto reductases i l'aldehid deshidrogenasa, també participen, en menor grau, en la detoxificació de precursors de compostos dicarbonílics. L'activitat d'aquests enzims també ajuda a mantenir dins dels límits fisiològics les concentracions de dicarbonils reactius que es formen durant el metabolisme cel·lular i que poden actuar com a agents glicans endògens (108)(53).

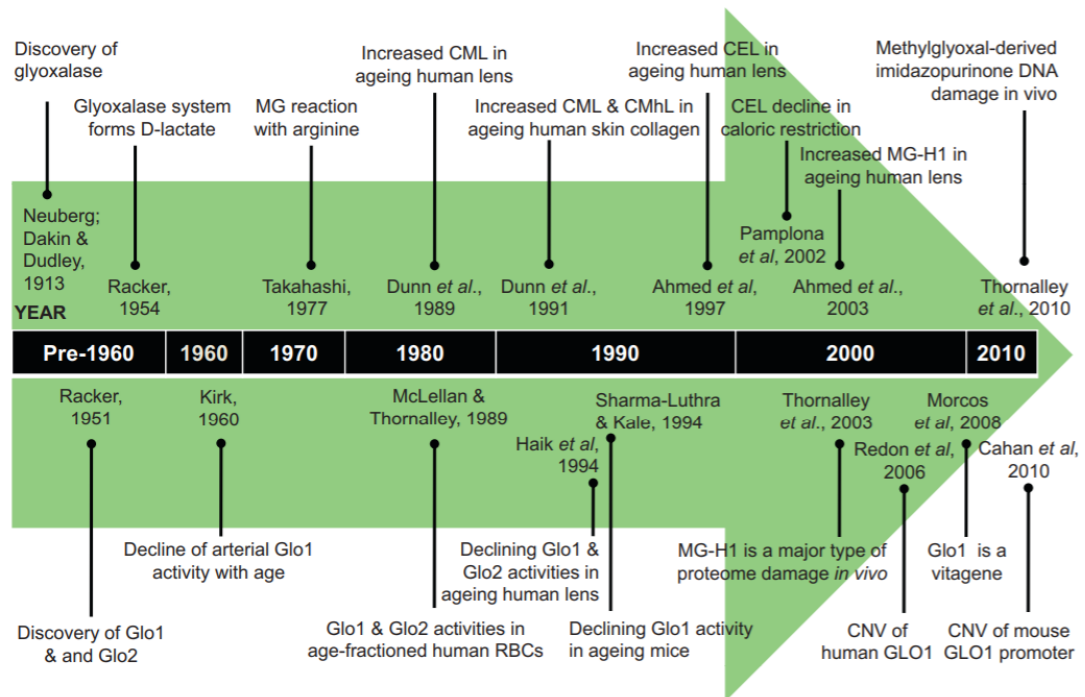


Figura 12: El desenvolupament històric del sistema de la glioxalasa en investigacions d'envelliment.

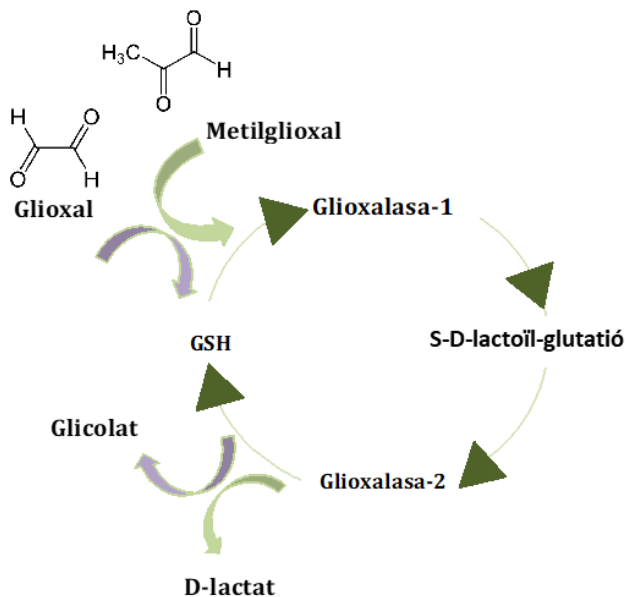


Figura 13: La via de la Glioxalasa.

La via de la glioxalasa comprèn dos enzims (Glo 1 i Glo 2) responsables de la transformació de MG i GO dependent de glutatió, que produeix D-lactat i glicolat, respectivament. El glutatió actua com a cofactor d'aquesta via. Figura modificada a partir de Xue et al.(126).

Tenint en compte les funcions en la formació i la citotoxicitat dels AGE, la Glo 1 i el MG s'han relacionat en les complicacions diabètiques (és a dir, les malalties micro i macro-vasculars), el càncer i l'envelliment (127)(128)(129)(130).

### 1.4.2.3. Paper del ROS en la generació d'AGE

Els ROS són molècules altament reactives amb un nombre imparell d'electrons, la qual cosa les habilita a interactuar amb altres molècules i formar així, més radicals lliures. Al mateix



temps existeixen mecanismes de protecció contra els ROS, que són els antioxidants enzimàtics, com l'enzim superòxid dismutasa (SOD) i no enzimàtics (131). Es diu que hi ha estrès oxidatiu, quan la producció de radicals lliures supera la capacitat antioxidant de l'organisme. El paper de l'estrès oxidatiu ha estat ben documentat en moltes patogènesis de malalties (132).

La principal font de ROS a les cèl·lules de mamífers és el degoteig d'electrons de la cadena respiratòria mitocondrial i la seva posterior transferència a oxigen molecular, donant lloc a la formació del anió superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ). Juntament amb el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i l'òxid nítric ( $\cdot NO$ ), el superòxid es considera un dels principals ROS primaris, que forma la varietat majoritària d'altres ROS que es troben en les cèl·lules.

La producció de ROS mitocondrial s'ha postulat per estar relacionada causalment amb el procés d'envelliment en el que es coneix com la teoria radical lliure de l'envelliment (133). Aquesta teoria es va postular per Denham Harman a mitjans del segle XX, quan es va descobrir que els radicals lliures d'oxigen, que es considerava que eren molt perjudicials i tòxics per les estructures biològiques, i que es formaven dintre dels organismes com a resposta a radiacions, intoxicacions per oxigen o, simplement, durant la respiració mitocondrial, és a dir, el metabolisme normal de les cèl·lules (133). Aquestes molècules tenen la capacitat de generar dany i estrès oxidatiu, fet que condueix al dany tissular i l'envelliment. A més, es va determinar que els mitocondris es el principal lloc de generació dels radicals lliures i les seves principals dianes (134), i que es produïen durant la respiració cel·lular, com el peròxid d'hidrogen. Aquests radicals lliures són destructius i ataquen a gran quantitat de molècules de la cèl·lula, però sobretot són perjudicials pel grau de mutacions que poden originar en el DNA (135)(136). Per sort, aquest dany es pot reparar, però encara així les estructures cel·lulars es deterioren progressivament, sobretot els mitocondris, on s'observa l'aparició de malalties relacionades amb l'envelliment (137). Aquest dany s'anomena dany oxidatiu, i produeix el que es coneix com estrès oxidatiu, que al seu torn, és causat per un desequilibri entre la producció de radicals lliures i la capacitat d'un sistema biològic de reparar el dany que produeixen, és a dir, la quantitat d'antioxidants (138).

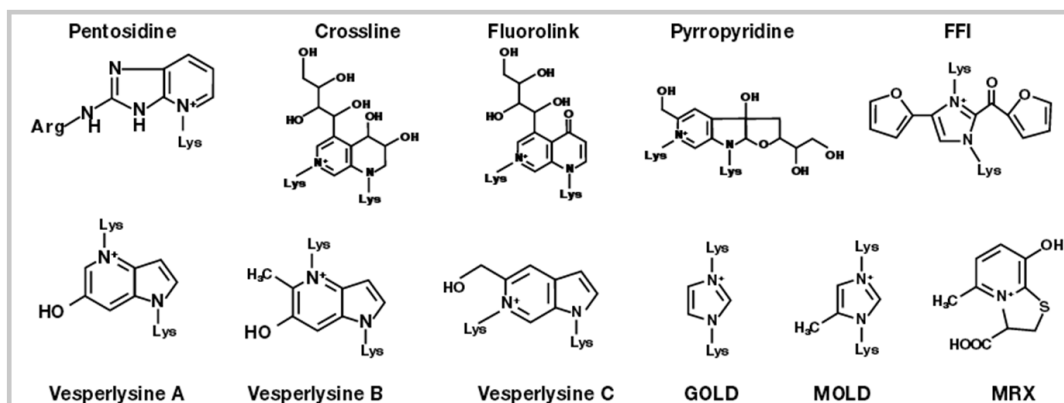
Tot i que les dades experimentals continuen sent controvertides, aquesta teoria ha demostrat no ser suficient per explicar la complexitat de l'envelliment biològic. Els ROS mitocondrials tenen un doble paper: d'una banda, participen en vies de senyalització que promouen ser cardioprotectors; d'altra banda, poden tenir efectes perjudicials en actuar sobre diverses dianes cel·lulars, és a dir, ADN mitocondrial, lípids i proteïnes, incloent els enzims dels complexos respiratoris. Els danys oxidatius dels complexos respiratoris poden deteriorar encara més la respiració mitocondrial i augmentar la producció de ROS en un cercle viciós, provocant finalment una disminució del nombre de mitocondris i un agreujament del dèficit energètic (139).

L'estrès oxidatiu indueix la peroxidació dels lípids i les reaccions de glicació, que condueixen a la formació de compostos altament reactius i electrofílics que ataquen als grups amino en les proteïnes causant modificacions covalents i donant lloc a la generació d'AGE (140). Estudis anteriors han demostrat que l'augment d'AGE pot ser causa de desenvolupament o factor mediador de moltes malalties sistèmiques i pot causar una àmplia gamma d'efectes patològics com induir citocines inflamatòries i augmentar l'estrès oxidatiu (141). S'espera que tant la reducció de glutatió com l'acumulació d'intermediaris dicarbonil augmentin amb l'estrès oxidatiu, afavorint reaccions de glicació intervingudes per ROS després d'una retroalimentació positiva (estrès glicooxidatiu) (113). Aquest estrès glicooxidatiu pot tenir tant efectes directes sobre les proteïnes i potenciar el dany glicatiu mediat per ROS. L'augment de ROS i AGE representen dos marcadors de l'estrès oxidatiu patognomònic i poden causar hiperinflamacions i danys permanents del teixit.

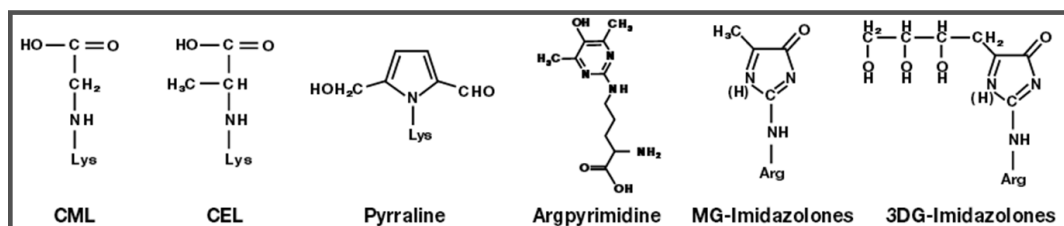
#### 1.4.2.4. Tipologia dels AGE

Els AGE constitueixen un grup heterogeni de compostos, i es classifiquen en referència a propietats físiques, com la fluorescència, i la seva capacitat d'entrellaçar a nivell intermolecular (Figura 14).

##### Fluorescents/Entrellaçants



##### No Fluorescents/No Entrellaçants



**Figura 14: Classificació dels AGE.** AGE fluorescents i entrellaçants; AGE no fluorescents i no entrellaçants. Figura modificada a partir de Wu et al., 2011 (142).

Així, atenent a la seva capacitat per fer enllaços intramoleculars, es classifiquen en AGE no entrellaçats (non-crosslinking AGE) i AGE entrellaçats (crosslinking AGE). Alguns AGE entrellaçats són fluorescents i es poden detectar amb espectroscòpia de fluorescència. Encara que no són els més abundants in vivo (representen un 1 % del total), resulten de gran utilitat en la pràctica clínica, ja que es poden detectar amb un transiluminador de fluorescència en la pell dels pacients. Entre els AGE no fluorescents i no entrellaçats de rellevància fisiològica destaquen la CML (proposat com a biomarcador de l'envelliment i diabetis), hidroimidazolones (MG-H1 i MG-H2), argpiridina (cristal·lí), pentosidina (sèrum diabetis, plaques d'ateroma), tetrahidroxipiridina i AGE de glucosa.

#### 1.4.3. Paper dels AGE en l'envelliment del cor i possibles conseqüències funcionals

Els AGE s'han estudiat en la fisiopatologia de diverses malalties relacionades amb l'envelliment, com el Parkinson, l'Alzheimer, les cataractes, la insuficiència renal crònica i la insuficiència cardíaca (143). El seu paper en l'envelliment del cor es poc conegut. S'ha suggerit que els AGE poden contribuir al desenvolupament de la insuficiència cardíaca alterant les proteïnes de la matriu extracel·lular. Tanmateix, es desconeix si es produeix un augment d'AGE intracel·lulars als cardiomiòcits i quines podrien ser les conseqüències funcionals d'aquest fenomen.

A mesura que envellim, el cor s'adapta pitjor a l'exercici i es torna més vulnerable a l'estrès i al dany per isquèmia. Els cardiomiòcits desenvolupen un desajust progressiu entre les

seves necessitats energètiques i la capacitat per generar energia i un augment dels estrès oxidatiu que facilita el desenvolupament d'insuficiència cardíaca i de disfunció contràtil. De fet, l'edat avançada es un factor de risc independentment del desenvolupament d'insuficiència cardíaca. Com que ha estat documentat un augment d'AGE en diversos òrgans i teixits, aquesta tesi ha investigat si la glicació avançada participa en l'envelliment del cor i les possibles conseqüències funcionals que això pugui tenir. L'objectiu final es identificar noves dianes terapèutiques involucrades en la fisiopatologia de l'envelliment cardíac i la seva vulnerabilitat a desenvolupar insuficiència cardíaca, una malaltia de gran impacte social i mèdic.



*Hipòtesi*

## ***2. Hipòtesi***

Durant l'envelliment es produeix un augment de les reaccions de glicació i un acúmul d'AGE en el teixit cardíac. L'augment de la glicació intracel·lular pot alterar la funció de proteïnes involucrades en l'eficiència energètica i/o el maneig de calci, afavorint el desenvolupament d'insuficiència funcional en els cardiomiòcits senescents.



# *Objectius*



### 3. Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi és investigar l'impacte de l'envelliment sobre la glicació de proteïnes intracel·lulars en els cardiomiòcits i estudiar les conseqüències funcionals que això pugui tenir sobre el RS i els mitocondris.

Per tal d'arribar a aquest objectiu principal s'han plantejat els objectius secundaris següents:

1. Avaluar els nivells globals d'AGE en teixit miocàrdic de ratolins joves (4-6 mesos) i vells ( $\geq 20$  mesos) i pacients joves ( $< 75$  anys) i ancians ( $\geq 75$  anys) mitjançant tècniques independents i complementàries.
2. Quantificar l'efecte de l'envelliment sobre l'eficiència de la via de detoxificació depenent de glioxalasa dels principals precursors d'AGE (MG i GO) en el teixit miocàrdic murí i humà.
3. Determinar si el potencial augment de glicació durant l'envelliment afecta específicament al *pool* de proteïnes intracel·lulars dels cardiomiòcits.
4. Identificar si les proteïnes intracel·lulars involucrades en la comunicació entre el RS i els mitocondris, són diana de glicació durant l'envelliment en el miocardi de ratolins vells i pacients ancians, i avaluar el possible impacte funcional de la glicació d'aquestes proteïnes i la funció dels mitocondris en el miocardi murí i humà.



# *Materials i mètodes*

## 4. Materials i mètodes

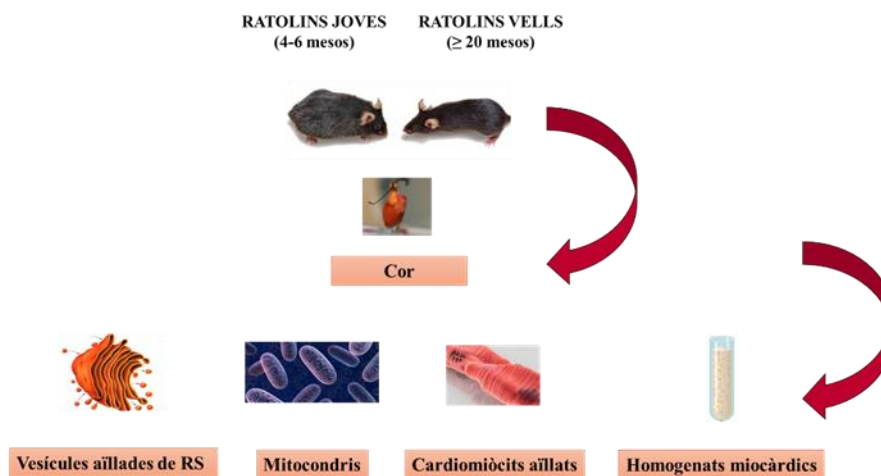
### 4.1. Declaració ètica i disseny experimental

#### Model murí

Tots els procediments experimentals que han requerit l'ús de teixit animal han complert les exigències de la legislació vigent europea sobre experimentació animal (directiva EU 2010/63EU), la legislació espanyola 2007/526 / CE sobre protecció d'animals amb finalitats científiques i han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'Institut de Recerca del Vall Hebron (VHIR) de Barcelona, Espanya.

En aquesta tesi s'han utilitzat mostres de miocardi de ratolins joves (4-6 mesos) i vells ( $\geq 20$  mesos) de la soca C57BL/6N per l'obtenció d'homogenats miocàrdics, vesícules aïllades de RS, cardiomiòcits aïllats i mitocondris (**Figura 15**).

Els ratolins, procedents dels laboratoris Charles River, Cerdanyola, Espanya, es van mantenir en una instal·lació autoritzada de nivell 2 per a animals d'investigació a l'estabulari de l'Institut de Recerca del Vall Hebron (VHIR). L'estabulació es va fer a una temperatura constant de 22 °C, una humitat relativa del  $65 \pm 3$  % i un fotoperíode de 12 h de llum i 12 h de foscor. Es va estabular cinc animals per gàbia amb lliure accés a l'aigua i al pinso. En tots els casos, el teixit es va obtenir després de l'eutanàsia amb sobredosi anestèsica amb 150 mg/Kg de pentobarbital sòdic via intraperitoneal.



**Figura 15:** Mostres biològiques utilitzades per fer les determinacions en el model murí.

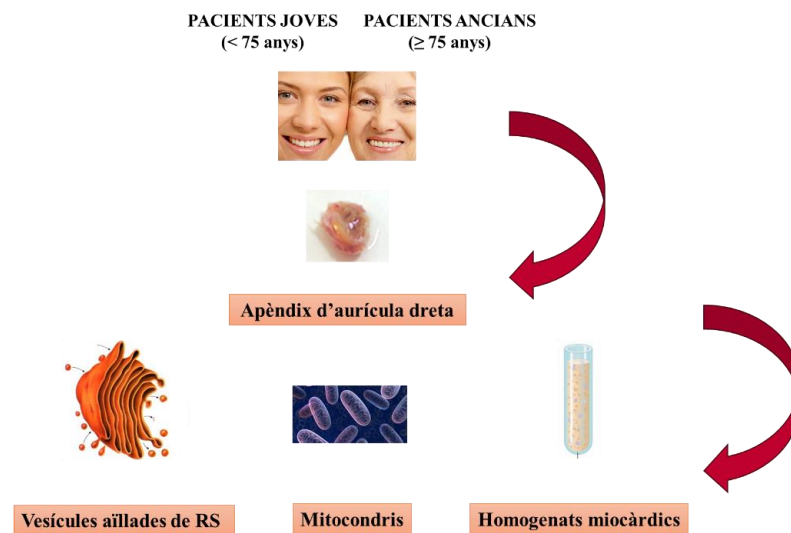
---

**Model humà**


---

Les mostres de miocardi humà van ser de pacients de  $\geq 18$  anys i havent signat un consentiment informat. El protocol d'estudi ha estat aprovat pel Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron de Barcelona, Espanya, i ha estat elaborat seguint els requisits ètics de la investigació biomèdica de la Declaració d'Hèlsinki.

Les mostres de miocardi humà procedeixen de l'apèndix de l'aurícula dreta d'un total de 178 pacients, 109 pacients joves ( $< 75$  anys) i 69 pacients ancians ( $\geq 75$  anys) sotmesos a cirurgia cardíaca amb circulació extracorpòria al Servei de Cirurgia Cardíaca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron de Barcelona, Espanya (**Figura 16**). Aquestes mostres es van utilitzar per l'obtenció d'homogenats miocàrdics, vesícules aïllades de RS i mitocondris aïllats. Els pacients amb història clínica d'insuficiència cardíaca d'aurícula dreta amb dilatació auricular o insuficiència cardíaca del ventricle dret o hipertensió severa de l'artèria pulmonar (pressió pulmonar sistòlica  $\geq 30$  mmHg) van ser exclosos de l'estudi. Les mostres obtingudes al quiròfan es van traslladar immerses en solució salina freda i transportades en gel al laboratori de Cardiologia Experimental del VHIR i es van usar immediatament per realitzar l'aïllament de mitocondris o, van ser congelades en nitrogen líquid i guardades a  $-80$  °C per determinacions posteriors.



**Figura 16:** Mostres biològiques utilitzades per fer les determinacions en el model humà.

## 4.2. Model murí

### 4.2.1. Estudis amb homogenat de teixit miocàrdic de ratolins

#### 4.2.1.1 Quantificació del contingut global d'AGE en el miocardi

El contingut d'AGE en el miocardi s'ha quantificat per dos tècniques independents: anàlisi massiva per proteòmica diferencial i Western blot.

#### 4.2.1.2. Anàlisi massiva de proteòmica diferencial per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) acoblada a espectrometria de masses

La proteòmica diferencial quantitativa és una tècnica de química analítica que permet determinar canvis en l'abundància de pèptids relativa entre varis grups a analitzar, així com identificar modificacions post-transduccionals a nivell de seqüència peptídica amb l'ajut de la utilització d'etiquetes isobàriques de massa en tàndem (tandem mass tags (TMT) de la Thermo Fisher) (144).

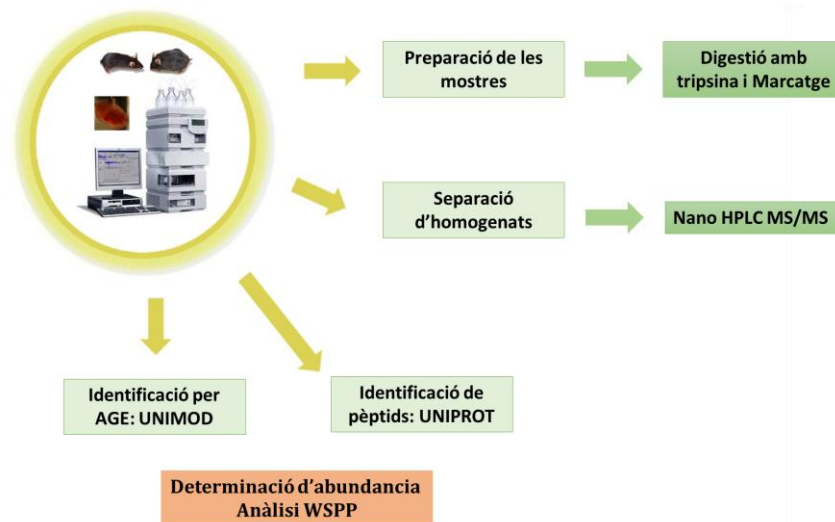
Per poder avaluar de forma massiva l'efecte de l'envelliment sobre l'abundància de proteïnes miocàrdiques modificades per AGE es va realitzar l'anàlisi massiva per proteòmica diferencial. Aquesta anàlisi permet identificar els pèptids de les proteïnes a partir del seu espectre de masses, així com el tipus de glicació i l'abundància relativa dels pèptids glicats en el cor dels ratolins vells respecte els joves. L'anàlisi massiva de proteòmica de proteïnes miocàrdiques es va duu a terme en el laboratori de Proteòmica Cardiovascular del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), ambdós pertanyen al Centro de Investigación Biomédica en red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, Espanya, dirigit pel Dr. Jesús Vázquez.

L'anàlisi es va efectuar a partir d'homogenats procedents de 4 cors de ratolins joves d'entre 4-6 mesos i 4 cors de ratolins vells de  $\geq 20$  mesos d'edat. Per l'obtenció dels homogenats de teixit miocàrdic, els cors es van homogeneïtzar utilitzant unes boles de ceràmica (MagNa Lyser Green Beads apparatus, Roche, Germany). Posteriorment, 100  $\mu\text{g}$  dels homogenats es van tractar amb iodoacetamida (50 mmol/L) dissolta en tampó HEPES a pH 8,5 per tal de bloquejar grups sulfhídric i digerir després les proteïnes amb tripsina (sequencing grade trypsin, Promega) utilitzant una relació de 1:40 (1 part d'enzim per 40 de massa d'extracte) per tal d'obtenir els pèptids. Una vegada obtinguts els pèptids, aquests es van marcar amb etiquetes isobàriques de 10-plex (TMT 10 plex<sup>TM</sup>, Thermo Fisher) per tal de poder diferenciar pèptids diferents amb la mateixa massa durant la fragmentació MS/MS en tàndem. Seguidament, la barreja de pèptids marcats es van fraccionar en cinc parts a partir de una cromatografia en fase reversa a pH bàsic. Cada una de les 5 fraccions de forma independent es van resoldre per nano\_HPLC-MS/MS (espectre de masses FUSION, Thermo Scientific) per tal de separar els pèptids i obtenir el seu espectre de masses.

La identificació dels pèptids es va realitzar mitjançant l'algoritme SEQUEST HT integrat en Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Finnigan). Es van comparar els resultats dels espectres de masses (MS/MS) amb una base de dades de ratolí (UniProtKB/Swiss-Prot) per poder saber a quina proteïna corresponia cadascun del pèptids. El tipus de modificació per AGE es va identificar a través de la base de dades Unimod ([www.unimod.org](http://www.unimod.org)). Les modificacions per AGE trobades van ser les següents: 2-ammoni-6-[4-(hidroximetil)-3-oxidopiridini-1-il]-hexanoat (hidroximetilOP) a nivell de Lys, hidroxifenilgloxal (1HPG) a nivell d'Arg, bis-hidroxifenilgloxal (2HPG) a nivell d'Arg, hidroimidazolona derivada de MG (MG-H1) i derivada del gloxal (G-H1) a nivell d'Arg, malondialdehid (MDA54) a nivell de Lys i carboximetilació a nivell de Lys i Trp.

L'abundància dels pèptids es va calcular segons el mètode SEQUEST descrit per a Martínez-Bartolomé, S. (145) i a partir del valor de probabilitat FDR (False Discovery Rate) es van establir els canvis amb significació estadística. La determinació de l'abundància de pèptids modificats es va realitzar a partir del mòdul estadístic WSPP (Weighted Scan-Peptide-Protein) (Martínez-Acedo et al. 2012). Com a input, el WSPP utilitza una llista de quantificacions en la forma de log<sub>2</sub>-ratios (a on ratio correspon a la relació entre mostra problema respecte al control) dels seus pesos estadístics. A partir d'aquests valors, WSPP genera un algoritme (Xp) basat en el grau de dispersió de cada valor obtingut respecte a la seva mitjana. La xarxa d'associació funcional de proteïnes amb glicació es va construir utilitzant el web STRING (Protein Interaction Networks; [www.string-db.org](http://www.string-db.org)) i es va representar gràficament amb Cytoscape ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org)) (Figura 17).

**Composició del tampó d'homogeneïtzació:** Tris-HCl a 50 mmol/L a pH 8,5, EDTA a 1 mmol/L, SDS al 1,5 %.



**Figura 17:** Esquema de l'anàlisi massiva de canvis d'abundància i modificacions per glicació utilitzant HPLC acoblada a espectrometria de masses.

#### 4.2.1.3. Quantificació del contingut global d'AGE (CML) en el miocardi murí per Western-blot

La quantificació del contingut global d'AGE (CML) en el miocardi es va realitzar mitjançant l'anàlisi per Western blot.

El cor es va rentar amb solució salina freda i homogeneïtzar amb politró (Heidolph Diax 600) a 20500 rpm en 2 mL de tampó d'aïllament a 4 °C. Els homogenats es van bullir a 95 °C durant 5 minuts amb tampó de càrrega Laemmli (2x). Les mostres van ser carregades en un gel d'acrilamida al 10 % a 120 V (90 mA). La transferència de les proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa (Amersham Hybond-ECL, GE Healthcare) es va realitzar durant 1 hora a 90 mA constants a 4 °C utilitzant el tampó de transferència. Després de la transferència, les membranes es van tenyir amb solució de vermell Ponceau [Ponceau S 0,1 % (v/v), àcid acètic 5 % (v/v)] fins a visualitzar les bandes de proteïnes per comprovar l'eficiència de la transferència. També es van rentar les membranes amb aigua destil·lada i es van incubar en agitació durant 1 hora a temperatura ambient i en solució de bloqueig. Es va incubar les membranes tota la nit en càmera freda amb l'anticòs policlonal de conill anti-CML a una dilució 1:1000 en solució TBS-T amb 5 % llet en pols i anticòs policlonal de ratolí anti-GAPDH, utilitzat com a control de càrrega, a una dilució 1:2500 en solució TBS-T amb 3 % BSA. Es va incubar les membranes amb

anticossos secundaris: anticòs policlonal anti-conill-HRP a una dilució 1:10000 i l'anticòs policlonal anti-ratolí-HRP a una dilució 1:15000 durant 1 hora a TA i en agitació suau.

Es van detectar les proteïnes mitjançant el reactiu de quimioluminescència Supersignal West Dura Extended Duration Substrate. Es va detectar la intensitat del senyal de quimioluminescència amb el detector LAS-4000 (Fujifilm). La densitat de les bandes obtingudes es va quantificar mitjançant el programa Science Lab-2001 Image Gauge, versió V4.0 (Fujifilm).

**Composició del tampó d'aïllament:** Tris-Base a 10 mmol/L a pH 7,9, EGTA a 0,1 mmol/L, manitol a 225 mmol/L, sacarosa a 75 mmol/L, HEPES a 10 mmol/L, còctel d'inhibidors de proteases (IP) al 1 %, PMSF al 1 %, fluorur sòdic (NaF) al 1 % i ortovanadat sòdic ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) al 0,5 %.

**Composició del tampó de transferència:** Tris a 25 mmol/L, glicina a 192 mmol/L pH 8 i metanol al 20 %.

**Composició de la solució de bloqueig:** llet en pols al 5 % en solució TBS-T (Tris-HCl a 20 mmol/L a pH 7,6, NaCl a 140 mmol/L i Tween-20 al 0,1 %).

#### 4.2.2. Determinació de l'activitat de la via de detoxificació depenent de la Glo 1 de precursors d'AGE

Per investigar l'efecte de l'envelliment sobre l'eficiència de la detoxificació dels precursors d'AGE es va quantificar l'activitat de la Glo 1 del teixit miocàrdic, el contingut de glutatió total i el contingut de D-lactat.

##### 4.2.2.1. Determinació de l'activitat de la Glo 1

L'activitat Glo 1 es va determinar utilitzant el protocol modificat de Shinohara et al., 1998 (147). Aquest protocol es basa en la detecció espectrofotomètrica durant 250 segons dels canvis d'absorbància a 240 nm com a conseqüència de la generació de S-D-lactoil-glutatió, el metabòlit que es forma en la reacció catalitzada per Glo 1 a partir de MG. La lectura es va fer usant un espectrofotòmetre de cubeta (Shimazu). Per determinar l'activitat Glo 1 els trossos de teixit miocàrdic de ratolí es van rentar i homogeneïtzar en un tampó salí utilitzant un politró a 20500 rpm. El teixit homogenat es va centrifugar a 14000 xg durant 5 minuts a 4 °C. Així, una alíquota d'uns 20 µL (5-10 µg de proteïna) d'homogenat total de miocardi es va afegir a una cubeta de quars amb 700 µL de tampó fosfat. Als 30 segons de lectura, es va afegir 0,5 mmol/L de MG a 50 mmol/L per poder iniciar la catàlisi i formació del S-D-lactoil-glutatió.

A partir de la equació de Beer-Lambert i coneixent el coeficient d'extinció milimolar del S-D-lactoil-glutatió a 240 nm ( $3,37 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$ ) es pot calcular la concentració de Glo 1, expressada com µmols S-D-lactoil-glutatió /g teixit × minut.

**Composició del tampó salí:** KCl a 100 mmol/L, MOPS a 50 mmol/L, EGTA a 1 mM a pH 7,4.

**Composició del tampó fosfat:** Tampó fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 50 mmol/L pH 7,5 i GSH a 0,5 mmol/L.

##### 4.2.2.2. Nivells d'expressió miocàrdica de la Glo 1

Per investigar l'efecte de l'envelliment sobre el grau d'expressió de Glo 1, es va preparar els homogenats a partir del teixit cardíac immers en 2 mL de tampó d'homogeneïtzació. El teixit cardíac es va homogeneïtzar amb politró a 20500 rpm i seguidament es va centrifugar a 14000 xg durant 5 minuts a 4 °C. Seguidament, la concentració de proteïna de l'extracte resultant (sobrenedant) es va determinar pel mètode de Bradford. Per resoldre les proteïnes, es va tractar els homogenats (5-10 µg) amb tampó de càrrega Laemmli (2x), es va bullir els homogenats a 95 °C, 5 minuts i es va usar un gel al 15 % d'acrilamida a 120V (90 mA) durant 2 hores. Es va realitzar la transferència de les proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa (Amersham Hybond-



ECL, GE Healthcare) en el tampó de transferència, durant 1 hora a 90 mA constants a 4 °C. Després de la transferència, es va tenyir les membranes amb solució de vermell Ponceau [Ponceau S 0,1 % (v/v), àcid acètic 5 % (v/v)] fins a visualitzar les curses de proteïnes per comprovar-ne l'eficàcia. Es va rentar les membranes amb aigua destil·lada i es va incubar (es va incubar amb què?) en agitació durant 1 hora a temperatura ambient i en solució de bloqueig. A continuació es van incubar tota la nit en càmera freda amb anticòs policlonal de ratolí anti-Glo 1 a una dilució 1:500 en solució TBS-T amb 5 % llet en pols i anticòs policlonal de ratolí anti-GAPDH, utilitzat com a control de càrrega, a una dilució 1:2500 en solució TBS-T amb 3 % BSA. Es va incubar amb l'anticòs secundari policlonal anti-ratolí-HRP a una dilució 1:15000 durant 1 hora a TA i en agitació suau. Es van detectar les proteïnes mitjançant el reactiu de quimioluminiscència Supersignal West Dura Extended Duration Substrate. Es va detectar la intensitat del senyal de quimioluminiscència amb el detector LAS-4000 (Fujifilm). La densitat de les bandes obtingudes es va quantificar mitjançant el programa Science Lab-2001 Image Gauge, versió V4.0 (Fujifilm).

**Composició del tampó d'homogeneïtzació:** HEPES a 10 mmol/L pH 7,9, KCl a 10 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mmol/L, EDTA a 1 mmol/L, Nonidet™ P-40 (NP40) 0,6 %, Ditiotretitol (DTT) a 0,5 mmol/L i PMSF a 0,2 mmol/L.

**Composició del tampó de transferència:** Tris a 25 mmol/L, glicina a 192 mmol/L pH 8 i metanol a 20 %.

**Composició de la solució de bloqueig:** Llet en pols 5 % en solució TBS-T (Tris-HCl a 20 mmol/L a pH 7,6, NaCl a 140 mmol/L i Tween-20 a 10,1 %).

#### 4.2.2.3. Contingut de Glutatió total (GSH)

El glutatió total (GSH) és el cofactor de la via de la Glo i un potent antioxidant cel·lular. Es va investigar si l'envelliment s'associa a canvis en el contingut de glutatió total (GSH total), en homogenats de teixit miocàrdic. Per a la determinació els nivells de GSH total en el miocardi es va preparar els homogenats de la mateixa manera que el protocol usat per a la determinació de l'activitat Glo 1.

El contingut de GSH total es va determinar utilitzant el protocol descrit per Fernández-Sanz C. et al., 2014 (148) basat en els canvis en el color del reactiu d'Ellman (DTNB) ((5,5'-ditiobis- (àcid 2-nitrobenzoico)), substància química utilitzada per quantificar el nombre o la concentració de grups tiol en una mostra. A conseqüència de la reducció del DTNB pel grup sulfhídric del glutatió en presència de la glutatió reductasa (GR) es forma TNB (2-nitro-5-thiobenzoat), un producte que pot absorbir llum a 412 nm (**Figura 18**) (149).



**Figura 18: Cicle d'oxid-reducció del glutatió a partir de la reducció del DTNB mitjançant la glutatió reductasa.** Modificada a partir de Lu, 2013 (150). Em diu que aquesta figura no mostra el mecanisme de quantificació de glutatió

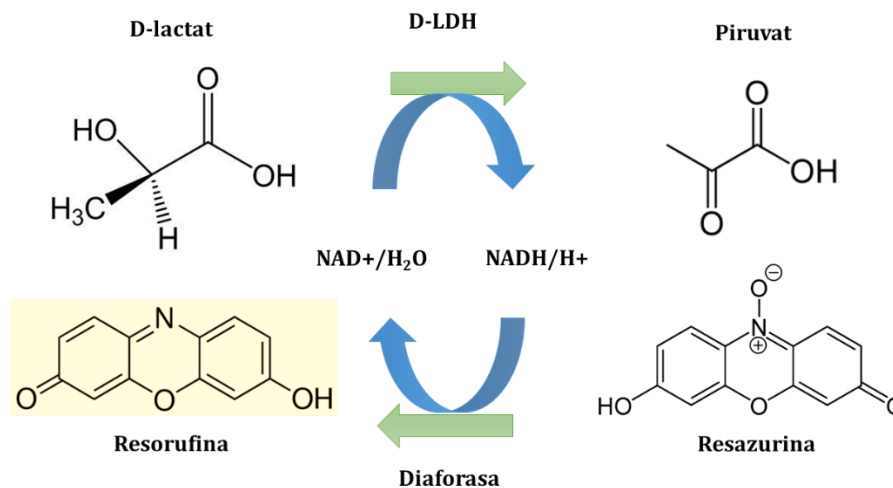
Es va dispensar una alíquota d'aproximadament 25-50 µg de proteïna a una placa de 96 pous amb 150 µL d'una solució tamponada amb DTNB i la GR. Es va enregistrar el canvi d'absorbància a 405 nm durant 5 minuts usant un lector de places (Multiskan, Labsystem), en lectures cada 30 s. La concentració de glutatió present en la mostra es va calcular a partir d'una corba estàndard de GSH en el rang de 1,25 a 20 µmol GSH/L. La concentració de GSH total va ser expressada en µmol GSHTotal/g de teixit.

**Composició de la solució tamponada:** tampó fosfat ( $K_2HPO_4$  i  $KH_2PO_4$ ) a 0,1 mol/L a pH 7, EDTA a 1 mmol/L, DTNB a 68 µg/mL, Glutatió Reductasa a 270 mU/mL i NADPH a 32 µg/mL.

#### 4.2.2.4. Contingut de D-lactat

El D-lactat és el metabòlit final de la via de la Glo 1. Per a la determinació del contingut de D-lactat es van preparar els homogenats de la mateixa manera que el protocol usat per a la determinació de l'activitat Glo 1. El contingut de D-lactat es va determinar utilitzant el mètode descrit per Shapiro et al., 2010 (151). Es va dispensar una alíquota d'entre 10-20 µg de proteïna en 180 µL d'una solució tamponada de resazurina i complementada amb diaforasa (0,2 unitats), D-LDH (1,4 unitats) i NAD a 0,5 mmol/L. Es van incubar les mostres durant 30 minuts a TA i es va llegir la fluorescència de la resazurina reduïda (resorufina) a 590 nm utilitzant un fluorímetre de plaques (GeminiXS, Molecular Devices) (**Figura 19**). La concentració de D-lactat es va estimar a partir d'una corba estàndard en el rang d'entre 0 a 5 mmol/L D-lactat. Els resultats van ser expressats en µmol/L de D-lactat/g de teixit miocàrdic.

**Composició de la solució tamponada:** Tris-HCl a 75 mmol/L a pH 8,9, KCl a 100 mmol/L, Tritó-X 100 al 0,004 %, L-lactat a 0,1 mmols/L, resazurina a 0,1 mmol/L.



**Figura 19: Reacció catalitzada per D-LDH:** La D-LDH catalitza la transformació D-lactat a piruvat reduint el NAD a NADH. Per l'acció de la diaforasa, la resazurina es redueix donant un producte fluorescent (resorufina).

### 4.2.3. Estudis en cardiomiòcits aïllats de ratolí

#### 4.2.3.1. Aïllament de cardiomiòcits

Els cardiomiòcits de ventricle de cor de ratolí es van aïllar per perfusió retrògrada en un sistema de perfusió de tipus Langendorff. Aquest mètode es basa en la digestió del cor canulat utilitzant una solució amb col·lagenasa i en absència de calci per facilitar la dissociació cel·lular (90). El cor és canulat per l'aorta ascendent usant una cànula i es perfon durant 15 minuts amb un tampó de Krebs modificat a 37 °C amb col·lagenasa (Collagenase NB 8 Broad Range from Clostridium histolyticum). El cor digerit es va trossejar i es va incubar durant 10 minuts addicionals amb el mateix tampó de Krebs suplementat amb la col·lagenasa. El teixit digerit es va filtrar utilitzant una malla de niló de 200 µm de diàmetre de por i el líquid filtrat es va centrifugar a 25 xg durant 3 minuts a 25 °C. El pellet resultant es va resuspendre en el tampó de Krebs complementat amb CaCl<sub>2</sub> a 125 µmol/L i es va centrifugar a 25 xg durant 2 minuts a 25 °C. Aquest últim pas es va repetir augmentant progressivament la concentració de calci extracel·lular fins a arribar a la concentració final i fisiològica de CaCl<sub>2</sub> a 1mmol/L. Es va resuspendre el pellet final en medi de cultiu M199 complementat amb 4 % de sèrum fetal boví a 37 °C. Es va sembrar les cèl·lules en plaques de vidre pretractades amb laminina o plaques de plàstic de 96 pous pretractades amb M199 + 4 % de sèrum fetal boví. Es va considerar que les preparacions eren adequades quan el rendiment final de cardiomiòcits amb forma de bastó era major del 50 % del total cel·lular.

**Composició del tampó de Krebs modificat:** NaCl a 110 mmol/L, HEPES a 10 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> a 1,2 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 a mmol/L, KCl a 2,6 mmol/L, 2,3-butanedione monoxime (BDM) a 10 mmol/L, glucosa a 11 mmol/L i col·lagenasa 8N al 0,03 % a pH 7,4.

#### 4.2.3.2. Contingut del calci lliure en la matriu mitocondrial en cardiomiòcits aïllats

La quantificació de calci mitocondrial en cardiomiòcits aïllats en repòs (en condicions basals) es va fer seguint el protocol descrit en l'article de Fernandez-Sanz C. et al., (148).

Els cardiomiòcits aïllats adherits a plaques Will-Co es van marcar amb 5 µmol/L de rhod-2 en forma d'èster (rhod-2-AM, cell-permeant) utilitzant un protocol d'incubació del marcador fluorescent de fred-calor, que consistí en 60 minuts a 4 °C seguit de 30 minuts a 37 °C. El rhod-2 és un marcador fluorescent sensible al calci, que s'uneix al calci lliure present en l'interior de la matriu mitocondrial amb una constant de dissociació (Kd) de 0,57 µmol/L. El protocol de fred-calor afavoreix que el marcador es centri preferentment dins els mitocondris, disminuint el senyal citosòlic i augmentant l'especificitat del senyal fluorescent. La detecció de la fluorescència es va realitzar utilitzant un microscopi confocal Olympus IX70 (VoxCell Scan, Visitech, UK) amb un làser Ar/Kr (Yokogawa CSU10, Nipkow spinning disk) a 561 nm d'excitació i 590 nm d'emissió.

El valor de la fluorescència basal en cardiomiòcits de ratolí jove i vell es va considerar com una mesura indirecta del contingut de calci mitocondrial en condicions de repòs.

#### 4.2.3.3. Determinació de *calcium leak* des del RS en cardiomiòcits

Per investigar les conseqüències funcionals de l'envelliment sobre el maneig de calci per part del RS a través del RyR, es va analitzar la fuga espontània de calci del RS mitjançant microscòpia confocal de fluorescència en cardiomiòcits permeabilitzats.

Els cardiomiòcits aïllats de ratolins joves i vells es van incubar amb 10 µmol/L fluo-5N en forma d'èster (fluo-5N-AM, cell-permeant) durant 2 hores a 37 °C amb solució control. El fluo-5N és un marcador fluorescent sensible al calci, que s'uneix al calci lliure amb una Kd de 90 µmol/L. A continuació es va permeabilitzar la membrana plasmàtica amb saponina al 0,005

% durant 2 minuts a 37 °C, dissolta en una solució tamponada que simulava la composició intracel·lular. La permeabilització de la membrana cel·lular elimina la contribució del calci citosòlic al senyal fluorescent.

Els canvis de fluorescència del fluo-5N deguts a la fuga espontània del calci des del RS es van monitoritzar per microscòpia confocal (excitació a 488 nm i emissió a 520 nm, microscopi confocal Olympus IX70 tant en condicions basals (durant 30 segons a 37 °C) com després d'afegir tapsigargina a 10 µmol/L, per tal d'inhibir la recaptació de calci a través de la SERCA. En aquestes condicions, la disminució de fluorescència al llarg del temps es pot atribuir a la fuga espontània de calci des del RS. En un subgrup de cèl·lules la cinètica del calci es va quantificar en presència d'un inhibidor del RyR (RuR a 25 µmol/L), per tal d'estimar l'especificitat de la resposta.

**Composició de la solució control:** NaCl a 140 mmol/L, KCl a 3,6 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> a 1,2 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> a 1 mmol/L, HEPES a 20 mmol/L a pH 7,4.

**Composició de la solució tamponada “intracel·lular”:** MgCl<sub>2</sub> a 5 mmol/L, HEPES a 10 mmol/L, sacarosa a 250 mmol/L, Tris a 25 mmol/L a pH 7,2, EGTA a 0,5 mmol/L, succinat a 5 mmol/L, ATP a 2 mmol/L.

#### 4.2.3.4. Contingut d'AGE de MG en els cardiomiòcits aïllats de ratolins

Per investigar si l'envelliment s'associa a un augment d'AGE intracel·lulars es va quantificar el contingut d'AGE de MG en cardiomiòcits aïllats de ratolins joves i vells mitjançant immunocitoquímica.

Els cardiomiòcits adherits en plaques Will-Co es van fixar amb paraformaldèhid al 4 % durant 5 minuts a TA i es van permeabilitzar amb 0,25 % de Tritó-X100 durant 5 minuts. Posteriorment, els cardiomiòcits es van tractar amb una solució de bloqueig durant 1 hora a TA. Per a realitzar l'immunomarcatge, les cèl·lules es van incubar amb l'anticòs primari anti-MG a una dilució 1:50 (Cell Biolabs STA-011) durant tota la nit. Després de rentar amb PBS-Tween al 0,05 % es va afegir l'anticòs secundari conjugat amb Alexa546 (Invitrogen A1103) a una dilució 1:1000 durant 1 hora a TA. Els nuclis es van marcar amb 5 µg/mL Hoeschst-33342 durant 20 minuts a TA.

Es va determinar el marcatge fluorescent d'AGE intracel·lulars utilitzant un microscopi confocal espectral (Olympus Spectral Confocal Microscopy FV1000), ubicat en el servei de microscòpia confocal de la Unitat d'Alta Tecnologia (UAT) del VHIR. L'adquisició de les imatges es va fer amb làser 546 nm per l'Alexa 546 i 350 nm per Hoeschst-33342, per detectar proteïnes glicades i nuclis, respectivament, a 60X i amb una resolució de la meitat de 187 nm/vòxel (94 nm/vòxel; un vòxel = píxel amb profunditat). La intensitat de la fluorescència corresponent al marcatge per MG es va quantificar utilitzant el programa Image J. Els resultats s'han expressat com a unitats arbitràries de fluorescència (u.a.).

**Composició solució de bloqueig:** PBS-Tween-20 (0,05 %) amb BSA al 1 % i sèrum fetal boví al 10 %.

#### 4.2.3.5. Quantificació del grau de colocalització entre AGE i RyR

Per investigar si el RyR és una diana de glicació en els cardiomiòcits es va quantificar el grau de colocalització de la immunofluorescència entre els anticossos per AGE i per RyR en cardiomiòcits aïllats de ratolins joves i vells.

Els cardiomiòcits es van permeabilitzar i fixar amb acetona a - 20 °C durant 5 minuts en plaques Will-Co. A continuació es van tractar amb una solució de bloqueig durant 1 hora a TA. Per realitzar l'immunomarcatge, els cardiomiòcits es van incubar simultàniament amb l'anticòs anti-RyR, a una dilució 1:50, i l'anticòs anti-AGE de glucosa, a una dilució 1:100, durant tota

la nit. Després de rentar amb PBS-Tween al 0,05 % es van afegir els anticossos secundaris corresponents, anti-conill-Alexa 488 a una dilució 1:1000 i anti-ratolí-Alexa 561 a una dilució 1:1000 durant 1 hora a TA. Es va determinar el grau de colocalització entre els anticossos anti-RyR i anti-AGE a partir de les imatges obtingudes utilitzant un microscopi confocal espectral. La fluorescència es va obtenir utilitzant les línies de làser de 488 nm i 568 nm .

Es van analitzar les intensitats de cada fluorocrom de forma separada (RyR-vermell i AGE-verd) i es va calcular el grau de colocalització entre els dos marcadors de forma automàtica després de l'extracció del marcatge inespecífic (background) mitjançant el software Olympus Fluoview FV1000 4.1 El grau de colocalització es va valorar a partir de la imatge de punts col·localitzants del citofluograma i es va calcular el percentatge de punts de l'àrea de colocalització respecte el total de vòxels (imatge de l'àrea).

**Composició solució de bloqueig:** PBS amb BSA al 1 % i sèrum fetal boví al 10 %.

#### 4.2.4. Estudis amb vesícules aïllades de RS

##### 4.2.4.1. Aïllament de vesícules de RS

Per obtenir vesícules aïllades de RS es va utilitzar la tècnica descrita per Grunwald i Meissner (152), basada en l'aïllament de la fracció microsomal per centrifugació diferencial.

Un cop sacrificat l'animal, es va extreure el cor i es va rentar amb sèrum fisiològic fred per tal d'eliminar l'excés de sang. El cor es va tallar amb tisores i es va homogeneïtzar amb Potter-tefló a 300 rpm (Potter-Elvehjem, B-Braun-Biotech S.A) amb un tampó MOPS salí. L'homogenat es va centrifugar a 800 xg durant 5 minuts a 4 °C per a separar el pellet. El sobrenedant va correspondre a la fracció microsomal enriquida de vesícules de RS. Es va estimar el contingut de proteïna en la fracció enriquida de vesícules a partir del mètode Bradford.

**Composició del tampó MOPS salí:** KCl a 100 mmol/L, MOPS a 50 mmol/L a pH 7,4.

##### 4.2.4.2. Determinació de *calcium leak* en vesícules aïllades de RS

La determinació del *calcium leak* en vesícules aïllades de RS es va realitzar per fluorimetria en un tampó d'assaig després d'afegir 1-2 mg/mL de vesícules.

Es van enregistrar els canvis de fluorescència del fluorocrom fluo-4-salt a 520 nm utilitzant un lector de plaques en presència de 2 µmol/L de calci lliure. El fluo-4 és un marcador fluorescent sensible al calci, que s'uneix al calci lliure amb una Kd de 335 nm.

El senyal de fluorescència en el tampó d'assaig va disminuir progressivament durant 15 minuts indicatiu de captació de calci per part de les vesícules de RS, fins arribar a un plateau (mínim de senyal fluorescent). Passats els 15 minuts, en què es produeix el màxim de captació pel RS, es va afegir tapsigargina a una concentració de 10 µmol/L, per tal d'inhibir la recaptació de calci per la SERCA ATPasa. L'augment gradual del senyal fluorescent al tampó d'assaig és indicatiu d'alliberació neta de calci a través del RyR. En un subgrup de vesícules es va afegir tetracaïna (100 µmol/L), un inhibidor del RyR, com a control d'especificitat de resposta.

El càlcul de la concentració de calci a partir dels canvis de fluorescència es va fer a partir d'una corba patró de CaCl<sub>2</sub> en el rang d'entre 0-5 µmol/L. Els resultats de captació i alliberació de calci per part de les vesícules de RS es van expressar com nmols Ca/mg proteïna.

**Composició del tampó d'assaig:** KCl a 100 mmol/L, imidazol a 20 mmol/L, MOPS a 20 mmol/L a pH 7,4, fosfocreatina a 10 mmol/L, creatina quinasa a 15 U/ml i ATP a 0,1 mmol/L i fluo-4 a 1µmol/L en

forma de sal obtinguda a partir de la lisi alcalina de l'èster de fluo-4-AM (lisi alcalina d'una solució metanòlica de fluo-4-AM).

#### 4.2.4.3. Determinació del grau de glicació del RyR en les vesícules de RS de ratolins

Per poder corroborar si l'envelliment afavoreix la glicació del RyR, es va desenvolupar un ELISA de tipus sandvitx capaç d'identificar el tipus específic de glicació. Aquest tipus d'ELISA captura l'antigen sobre una base d'anticòs específic (anticòs de captura) i esbrina quin tipus de modificació per glicació té a partir d'un anticòs de detecció (**Figura 20**).

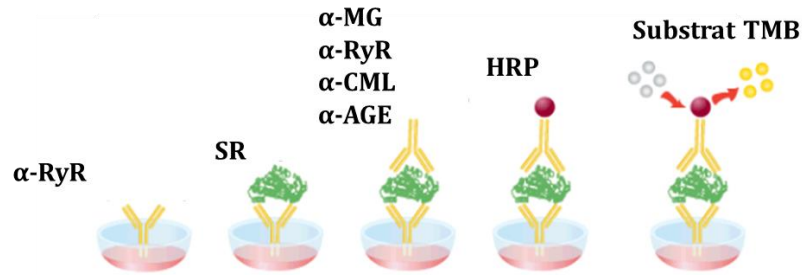
L'aïllament de les vesícules de RS per a la determinació del grau de glicació es va realitzar homogeneïtzant el teixit cardíac utilitzant un politró a 20500 rpm en tampó carbonat a pH 9,5 complementat amb IP. Es van centrifugar les mostres a 21000 xg durant 5 minuts a 4 °C i el pellet generat es va tractar amb una solució tamponada amb CHAPS al 0.1 %. De forma paral·lela, es va sensibilitzar una placa de 96 pous amb l'anticòs de captura, un anticòs monoclonal de ratolí anti-RyR a una dilució 1:1000 (ab2868, abcam) diluït en PBS durant tota la nit en càmera freda. La placa es va bloquejar amb Roti®-Block (medi de bloqueig absent de proteïna) en PBS- Tween20 al 0,05 % durant 1 hora a TA. Per tal d'unir el RyR present en les mostres a l'anticòs de captura adherit als pous de la placa, es van dispensar 100 µL de vesícules de RS en els pous corresponents i es van incubar durant tota la nit a 4 °C. A continuació, en pous independents es van afegir els anticossos primaris següents diluïts en solució de bloqueig: anti-RyR (ab196355, abcam) amb un epítip diferent al de captura, per tal de verificar la presència del RyR en el pou, a una dilució 1:1000, anti-AGE de glucosa a una dilució 1:1500, anti-MG a una dilució 1:2500 i anti-CML a una dilució 1:2500, per detectar diferents tipus d'AGE presents en el RyR. Després de 4 hores d'incubació a 37 °C, es van afegir els anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa de rave (HRP) als pous corresponents: policlonal anti-conill-HRP a una dilució 1:10000 i policlonal anti-ratolí-HRP a una dilució 1:15000 durant 1 hora a TA.

Per a la detecció colorimètrica es va dispensar 200 µL de tampó de citrat-fosfat a pH 5,6 complementat amb tetrametilbencidina (TMB) 10 mg/mL i 50 µg/mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durant aproximadament 30 minuts a TA per tal de desenvolupar color. Finalment es va afegir la solució d'aturada (50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2N) i es va llegir l'absorbància a 450 nm. Es va incloure un pou com a control negatiu en el qual es va ometre l'anticòs primari. Aquest control permet detectar la reactivitat inespecífica deguda a la presència de l'anticòs secundari. El valor d'absorbància (unitats de densitat òptica, D.O.) del control negatiu corresponent es va sostreure en cada reactivitat testada, obtenint un valor de D.O. neta i específic per cada anticòs primari. Les dades es van expressar com a D.O./0,1 mg proteïna.

**Composició solució tamponada:** Tris-HCl a 25 mmol/L a pH 7,4 i NaCl a 150 mmol/L amb detergent CHAPS ((3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate) al 0,1 %.

**Composició del tampó carbonat:** Tampó carbonat a 50 mmol/L a pH 9,5 complementat amb IP.

**Composició del tampó citrat-fosfat:** Fosfat sòdic a 0,2 mol/L, àcid cítric a 0,1 mol/L pH 5,6.



**Figura 20: Esquema dels passos de l'ELISA de tipus sandvitx per identificar la glicació del RyR.** La placa es tractada amb un anticòs de captura anti-RyR, un tampó de bloqueig és afegit per bloquejar la proteïna que s'unirà a la placa. S'afegeix la mostra (RS) i qualsevol antigen present ( $\alpha$ -MG,  $\alpha$ -RyR,  $\alpha$ -CML i  $\alpha$ -AGE) és unit mitjançant l'anticòs de captura. S'afegeix a la placa ultraestrepavidina-HRP unint-se als anticossos per la seva detecció. El substrat TMB és afegit a la placa i convertit, mitjançant HRP, a una forma detectable.

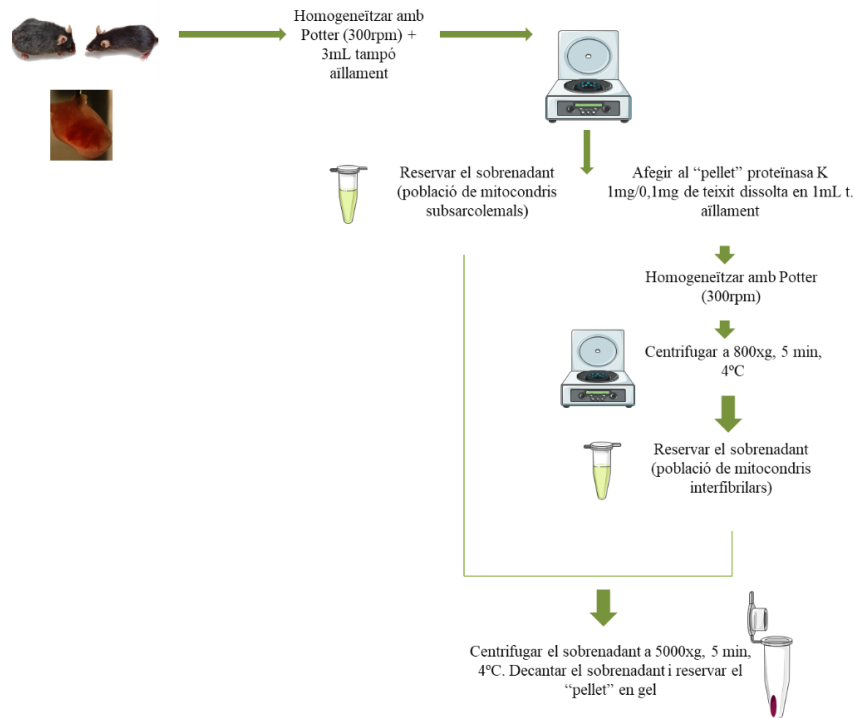
#### 4.2.5. Estudis amb mitocondris aïllats de ratolins

##### 4.2.5.1. Aïllament de mitocondris cardíacs subsarcolemals i interfibril·lars

Per aïllar els mitocondris cardíacs de ratolí es va usar la tècnica descrita per Fernandez-Sanz C. et al., (148). Un cop sacrificat l'animal, es va extreure el cor i es va rentar amb sèrum fisiològic fred per tal d'eliminar l'excés de sang. El cor es va tallar amb tisores i es va homogeneïtzar amb Potter-tefló a 300 rpm en tampó sacarosa-BSA al 1 %. L'homogenat es va centrifugar a 800 xg durant 5 minuts a 4 °C. Es van obtenir dos fraccions, un sobrenedant i un pellet (**Figura 21**). El sobrenedant obtingut es va reservar en gel, per a l'obtenció dels mitocondris SS, mentrestant el pellet (que contingué els mitocondris IF) es va tractar durant 2-3 minuts amb una solució tamponada de KCl complementat amb proteïnasa K (PK), a una proporció de de 1-2 mg de PK per cada 0,1 g de teixit fresc. Aquest material digerit es va centrifugar de nou a 800 xg durant 5 minuts a 4 °C i el sobrenedant es va reservar. Seguidament, els dos tipus de sobrenedant reservats es van centrifugar a 5000 xg durant 5 minuts a 4 °C per a obtenir uns pellets que van correspondre a una fracció enriquida de mitocondris SS i una fracció enriquida de mitocondris IF, respectivament.

**Composició del tampó sacarosa:** Sacarosa a 290 mmol/L, KCl a 100 mmol/L, MOPS a 50 mmol/L a pH7,4, EGTA a 1 mM.

**Composició de solució tamponada KCl:** KCl a 100 mmol/L, MOPS a 50 mmol/L a pH7,4, EGTA a 1mM, BSA al 1 %.



**Figura 21: Representació esquemàtica del protocol per a l'aïllament de les dues subpoblacions de mitocondris SS i IF a partir de la centrifugació diferencial del teixit miocàrdic de ratolí.**

#### 4.2.5.2. Mesura del rendiment mitocondrial i l'activitat citrat sintasa

El rendiment mitocondrial correspon a la quantitat relativa de proteïna mitocondrial (mesurada pel mètode Bradford) respecte al pes total del cor.

La quantificació de proteïnes es va realitzar mitjançant el mètode Bradford (153). Es va elegir aquest mètode per la seva gran sensibilitat i rapidesa. Aquest mètode es basa en la mesura de l'absorbància del producte de la reacció entre el colorant Blau de Coomassie Brillant (reactiu Bradford) i la proteïna present en la mostra. Per quantificar la proteïna total de les preparacions mitocondrials, es va solubilitzar una alíquota de mitocondris SS i IF amb deoxicolat sòdic al 0,2 % i es va incubar amb el reactiu Bradford (diluint 1/5 en aigua). Es va quantificar el canvi d'absorbància a 595 nm amb un lector de plaques (Labsystems, Multiskan) i es va calcular la concentració de proteïna a partir d'una corba patró estàndard de BSA en el rang 0 - 200 µg/mL. El rendiment mitocondrial es va expressar com a mg de proteïna mitocondrial/g miocardi.

L'activitat citrat sintasa (CS) es va determinar segons el mètode descrit per Srere i Brooks (154). La CS és un enzim exclusiu de la matriu mitocondrial i s'utilitza com a marcador de la quantitat de mitocondris que hi ha per unitat de proteïna de les preparacions de les mostres obtingudes. Els mitocondris (50 µg) es van tractar amb al 0,1 % Tritó X100 - Tris-HCl a 0,1 mol/L pH 8 per tal de solubilitzar les membranes i exposar l'enzim al medi. Una alíquota de la mostra solubilitzada (aproximadament 1-2 µg de proteïna) es va dissoldre en una solució tamponada de Tris-HCl a 0,1 mol/L a pH8 amb acetil-CoA 0,3 a mmol/L, oxalacetat 0,5 a mmol/L i DTNB a 0,1 mmol/L. La CS present en la mostra redueix el DTNB donant TNB que té capacitat per absorbir llum a 405nm. A partir del coeficient d'extinció molar del TNB, es va calcular la concentració de CS segons l'equació de Beer-Lambert. L'activitat enzimàtica es va expressar com unitats de CS (UCS = µmols TNB/min) normalitzades per mg de proteïna (UCS/mg proteïna).

En la **Figura 22** es mostra un esquema de la reacció enzimàtica.





**Figura 22:** Esquema de la reacció enzimàtica catalitzada per la CS. La CS catalitza la condensació de acetil-CoA amb l'oxalacetat per formar citrat.

#### 4.2.5.3. Quantificació del contingut de calci mitocondrial

El contingut de calci total mitocondrial es va determinar utilitzant una modificació del mètode descrit per a Santulli et al., (155). Els mitocondris aïllats es va diluir amb 25  $\mu\text{L}$  de HCl 1N per tal de lliurar la partícula i dissoldre les sals de calci de la matriu mitocondrial. Després de 2 minuts d'incubació a TA, el pH es va corregir a pH a 6,8 amb l'ajut d'una solució tamponada de fosfat sòdic a pH 8. Es va quantificar la concentració de calci en solució utilitzant la sal hexapotàsica del fluorocrom sensible al calci CaG5N a 3,75  $\mu\text{mol/L}$ , un fluorocrom específic per detectar calci (Calcium Green™ 5N Hexapotasium Salt). La llum fluorescent a 525nm corresponent al fluorocrom unit al calci es va detectar utilitzant un fluorímetre de plaques (GeminiXS, Molecular Devices). La concentració de calci es va estimar a partir d'una corba estàndard de  $\text{CaCl}_2$  en el rang entre 0-60  $\mu\text{mol/L}$ . El contingut de calci mitocondrial va ser expressat en nmols Ca/mg de proteïna.

#### 4.2.5.4. Consum d'oxigen en mitocondris de ratolins

La mesura del consum d'oxigen mitocondrial es va realitzar en mitocondris SS i IF utilitzant un oxímetre (Oxygraph, Hansatech Instruments, Regne Unit), proveït d'un elèctrode ió selectiu (tipus Clark) per l'oxigen adaptat en una càmera de metacrilat per a albergar la mostra. L'elèctrode està constituït per un càtode de platí polaritzat a - 0,7 Volts i un ànode de plata, actuant com electròlit, banyat en una solució saturada de clorur potàssic (~ 3 M). El càtode de platí es recobreix amb una membrana fina de tefló semipermeable que permet la difusió de l'oxigen a través i protegeix del contacte amb agents químics pertorbadors i l'aigua. En aquestes condicions, el senyal que resulta de la reducció de l'oxigen en el càtode de platí és directament proporcional a la quantitat d' oxigen dissolta en el medi en la càmera de metacrilat.

Per fer la mesura del consum d'oxigen mitocondrial, es va dispensar 0,15 mg de mitocondris aïllats dins la càmera en presència de 0,5 mL d'una solució salina tamponada. Els canvis en la concentració d'oxigen en solució deguts a la respiració mitocondrial, detectats com a senyal elèctric, s'enregistren al llarg del temps. La fosforilació oxidativa és un procés metabòlic pel qual els mitocondris són capaços de generar gradient electroquímic de forma dinàmica a través dels complexos de la cadena de transport d'electrons ubicats en la membrana interna mitocondrial, energia que després es dissiparà a través de la ATP sintasa per tal de generar ATP. Aquest procés consumeix oxigen, el qual és reduït a aigua a nivell del complex 4 de la cadena de transport d'electrons. És possible monitoritzar el consum d'oxigen mitocondrial associat a la síntesi d'ATP en mitocondris aïllats usant l'oxímetre, i constitueix una mesura per avaluar l'activitat mitocondrial.

Així durant la respiració mitocondrial *in vitro* es poden diferenciar 3 fases:

Fase E2 correspon al consum d'oxigen en presència de substrats del cicle de Krebs que generen equivalents reduïts en forma de NADH o bé FADH<sub>2</sub> oxidats pel complex 1 i complex 2 de la cadena de transport d'electrons, respectivament.

Fase E3 correspon al consum d'oxigen després d'afegir ADP. En aquesta fase es produirà ATP amb la conseqüent pèrdua de potencial de membrana mitocondrial, induint l'acceleració del consum d'oxigen per tal de restablir el gradient de protons a nivell de membrana interna mitocondrial.

Fase E4 correspon al consum d'oxigen un cop consumit tot l'ADP, obtenint valors similars a la fase E2.

Els substrats usats per a monitoritzar la respiració mitocondrial han estat:

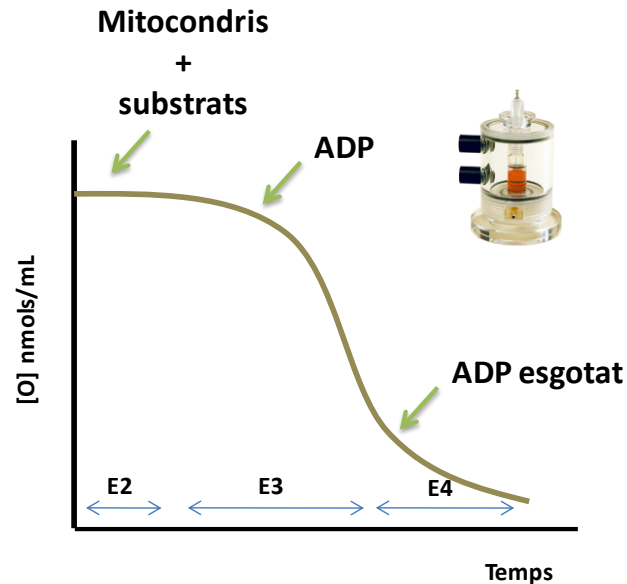
Fase 2 (E2): Malat 2,5 mmol/L i Glutamat 5 mmol/L per generar NADH (respiració mediada pel complex 1). Succinat 6mmol/L per obtenir FADH<sub>2</sub>. (respiració mediada pel complex 2). S'inhibeix el complex 1 amb rotenona a 1,25 µmol/L.

Fase 3 (E3): ADP 0,25 mmol/L.

Es van calcular les taxes de consum d'oxigen per cada una de les fases de la respiració mitocondrial i es va expressar com a nmol O<sub>2</sub>/minut × UCS o bé nmol O<sub>2</sub>/minut × mg proteïna.

La **Figura 23** mostra les fases del consum d'oxigen mitocondrial enregistrades pel software de l'oxímetre.

**Composició de la solució salina tamponada:** KCl a 100 mmol/L, MOPS a 50 mmol/L pH 7,4, EGTA a 1 mmol/L i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 5 mmol/L i MgCl<sub>2</sub> a 1 mmol/L i BSA a 1mg/mL.



**Figura 23:** Registre obtingut del les diferents fases de consum d'oxigen mitocondrial obtingudes amb l'oxímetre Oxigraph.

### 4.3. Model humà

#### 4.3.1. Estudis amb homogenat de teixit miocàrdic de pacients

Els homogenats de teixit miocàrdic de pacients es van utilitzar per analitzar el contingut global de proteïnes modificades per AGE, l'activitat Glo 1, els nivells de glutatió i el contingut de D-lactat. Es van homogeneïtzar entre 50-100 mg de teixit auricular cardíac en un politró a 20500 rpm amb tampó d'homogeneïtzació. L'extracte resultant es va centrifugar a 14000 xg durant 5 minuts a 4 °C. Es va descartar el pellet i es va reservar el sobrenedant.

El contingut de proteïna total es va determinar segons el mètode Bradford.

**Composició del tampó d'homogeneïtzació:** KCl a 100 mmol/L, MOPS a 50 mmol/L, EGTA a 1 mmol/L a pH 7,4.

##### 4.3.1.1. Quantificació del contingut global d'AGE en miocardi humà

La quantificació del contingut global de proteïnes modificades per AGE (CML) en el teixit miocàrdic de pacients es va realitzar mitjançant un ELISA de tipus competitiu. En l'ELISA competitiu desenvolupat, l'antigen present en la mostra competeix amb l'analit prèviament adherit en placa (BSA-CML) per unir-se a l'anticòs.

##### Preparació de l'estàndard CML-BSA

Es va preparar l'estàndard de CML-BSA seguint el protocol descrit per a Buongiorno (156) per detectar modificacions per AGE a nivell de lisina. Es va incubar BSA amb àcid glioxílic a 0,3 mol/L dissolt en solució tamponada de fosfat 0,2 mol/L pH 8 i en presència del reductor borohidru de bori ( $\text{NaBH}_4$ ) a 0,9 mol/L. Després de 10 minuts d'incubació a 37 °C, l'excés de reductor i d'àcid glioxílic, es va eliminar utilitzant una columna d'exclusió molecular (10 kDa) (Vivaspin 500 Sigma Z614025).

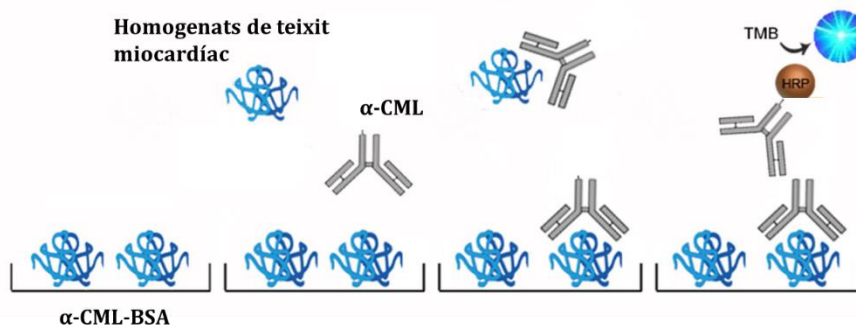
### Desenvolupament de l'ELISA competitiu

Es va incubar una placa de 96 pous amb CML-BSA a una concentració de 10 µg/pou durant tota la nit, a 37 °C. A continuació, es va rentar amb PBS i es van tractar els pous amb solució de bloqueig durant 1 hora a TA (**Figura 24**). Es va preparar una corba patró en un rang entre 0 - 40 µg CML-BSA/mL en solució de bloqueig. Es van dispensar 50 µL de cada punt de la corba i de cada mostra en els pous corresponents. En cada pou es van afegir 50 µL de l'anticòs policlonal de conill anti-CML a una dilució 1:2500, dissolt en solució de bloqueig i es va deixar incubant en agitació durant 1 hora a TA. Per a la detecció, es va utilitzar un anticòs secundari anti-conill-conjugat amb HRP a una dilució 1:5000, dissolt en solució de bloqueig i es va incubar durant 1 hora a TA. Es va retirar l'excés d'anticòs secundari i es van dispensar 100 µL d'una solució de cromogen de TMB 1 mg/mL dissolt en tampó citrat-fosfat a pH 5,6 (10 mL) i peròxid d'hidrogen (10 µL al 30 %). El color es va desenvolupar durant 5 minuts i la reacció es va aturar afegint 100 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N en cada pou. Es va llegir l'absorbància a 450nm amb un lector de plaques (Labsystems Multiskan SA). Es va calcular la concentració de CML present en els homogenats de miocardi de pacients a partir de la corba patró.

Les concentracions es van expressar com a µg CML-BSA/g de miocardi.

**Composició solució de bloqueig:** (Roti® Block-PBS-Tween20 al 0,05 % a pH 7,4).

**Composició del tampó citrat-fosfat:** fosfat sòdic a 0,2 mol/L, àcid cítric a 0,1 mol/L pH 5,6.



**Figura 24: Esquema del protocol de l'ELISA de tipus competitiu utilitzat per a detectar glicació en proteïnes (CML) en el miocardi de pacients.** L'antigen de la mostra competeix amb un antigen de referència per a la unió a una quantitat específica d'anticossos marcats. L'antigen de referència (α-CML-BSA) està pre-recobert en una placa multi-pou. La mostra es pre-incubada amb anticossos etiquetats (α-CML) i s'afegeix als pous. El substrat TMB es afegit a la placa i convertit mitjançant HRPO a una forma detectable. Depenent de la quantitat d'antigen a la mostra, es disposaran d'anticossos més o menys lliures per unir-se a l'antigen de referència. Això significa que com més antigen hi ha a la mostra, es detectarà menys antigen de referència i més feble serà el senyal. L'antigen etiquetat i l'antigen de la mostra (no etiquetats) competeixen per unir-se a l'anticòs primari. Com més baixa és la quantitat d'antigen a la mostra, més forta és el senyal.

#### **4.3.1.2. Determinació de l'activitat Glo 1, contingut de glutatió i D-lactat en homogenat de teixit miocàrdic de pacients**

L'activitat Glo 1, els nivells de glutatió i la producció de D-lactat es van quantificar en homogenats de miocardi humana utilitzant els mateixos protocols descrits per a ratolins (apartat 4.2.1. Estudis amb homogenat de teixit miocàrdic de ratolins. 4.2.2.1. Determinació de

l'activitat Glo 1 (pàg. 55); 4.2.2.2. Nivells d'expressió miocàrdica de la Glo 1 (pàg. 55); 4.2.2.3. Contingut de Glutatió total (GSH) (pàg. 56); 4.2.2.4. Contingut de D-lactat (pàg. 57).

#### 4.3.2. Estudis amb vesícules aïllades de RS de pacients

##### 4.3.2.1. Aïllament de vesícules de RS

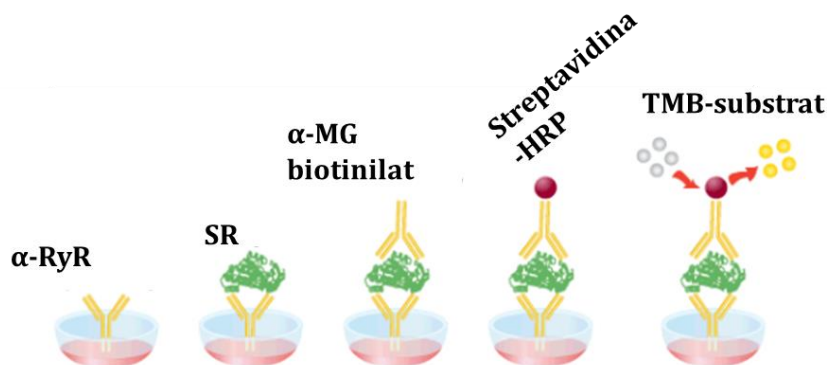
Per obtenir les vesícules aïllades de RS es va utilitzar la mateixa tècnica descrita anteriorment en el model murí (pàg. 60).

##### 4.3.2.2. Determinació del grau de glicació del RyR en vesícules humanes de RS

Per avaluar l'efecte de l'envelliment sobre el grau de glicació del RyR en el miocardi humà es va desenvolupar un ELISA de tipus sandvitx. Es van preparar les vesícules de RS seguint el protocol descrit per la determinació del grau de glicació del RyR en ratolins (pàg. 61, apartat 4.2.4.3.).

Es va sensibilitzar una placa de 96 pous amb l'anticòs de captura del RyR que correspongué a l'anticòs monoclonal de ratolí anti-RyR (ab196355, abcam) diluït 1:100 en PBS durant tota la nit en càmera freda. A continuació, es va bloquejar amb solució de bloqueig durant 1 hora a TA. Per tal d'unir el RyR present en les mostres a l'anticòs de captura adherit als pous de la placa, es van dispensar 100  $\mu$ L de vesícules de RS en els pous corresponents i es van incubar durant tota la nit a 4 °C. A continuació, en pous independents es van afegir els anticossos primaris següents diluïts en solució de bloqueig: anti-RyR (ab2868, Abcam) d'epítip diferent al de captura, per tal de verificar la captura de RyR a una dilució 1:1000, anti-MG a una dilució 1:2500 i anti-CML a una dilució 1:2500 per detectar diferents tipus d'AGE presents en el RyR, tant a nivell d'arginina i, AGE a nivell de lisina, respectivament. Després de 4 hores d'incubació a 37 °C, es van afegir els anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa de rave (HRP) als pous corresponents (policlonal anti-conill-HRP a una dilució 1:10000 i policlonal anti-ratolí-HRP a una dilució 1:5000 durant 1 hora a TA.

Per a la detecció colorimètrica es va dispensar 200  $\mu$ L de tampó de citrat-fosfat a pH 5,6 complementat amb TMB 10 mg/mL i 50  $\mu$ g/mL d' $H_2O_2$ , durant aproximadament 30 minuts a temperatura ambient per tal de desenvolupar color. Finalment es va afegir la solució d'aturada (50  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  a 2N) i es va llegir l'absorbància a 450 nm. Es va incloure un pou com a control negatiu en el qual es va ometre l'anticòs primari. Aquest control permet detectar la reactivitat inespecífica deguda a la presència de l'anticòs secundari. Es van corregir els resultats de densitat òptica sotraient el valor d'absorbància obtingut en el control negatiu corresponent i es van expressar els resultats com a DO/0,1 mg proteïna (Figura 25).



**Figura 25:** Esquema del protocol de l'ELISA sandvitx utilitzat per detectar glicació del RyR amb anti-MG biotinitat en el miocardi de pacients. Un dels anticossos ( $\alpha$ -RyR) recobreix la superfície de la placa multi-pou i s'utilitza com a anticòs de captura per facilitar la immobilització de l'antigen (RS).

L'altre anticòs ( $\alpha$ -MG biotinitat) es conjuga i facilita la detecció de l'antigen. S'afegeix a la placa ultraestreptavidina-HRP unint-se als anticossos per la seva detecció. El substrat TMB es afegit a la placa i convertit mitjançant HRP a una forma detectable.

**Composició solució de bloqueig:** (Roti<sup>®</sup>-Block-PBS-Tween20 al 0,05 % a pH 7,4).

### **Biotinilització de l'anticòs MG**

Per augmentar la sensibilitat de l'ELISA de tipus sandvitx a nivell de MG es va biotinilar l'anticòs MG (HM5014 Hycult), seguint les recomanacions comercials. Es van dissoldre 5  $\mu$ g d'anticòs MG en PBS i es van incubar amb 100  $\mu$ L de biotina 1mM 30 minuts a TA. L'excés de biotina es va eliminar utilitzant columnes d'exclusió de pes molecular de 10 kDa (Vivaspin 500 Sigma Z614025). Per comprovar que la reactivitat de l'anticòs no està afectada per a la biotinilització, es va realitzar un ELISA directe utilitzant 10  $\mu$ g de MG-BSA per sensibilitzar la placa i incubant l'anticòs biotinitat a la mateixa concentració que la usada en l'ELISA de tipus sandvitx i revelat amb ultraestreptavidina-HRP i TMB.

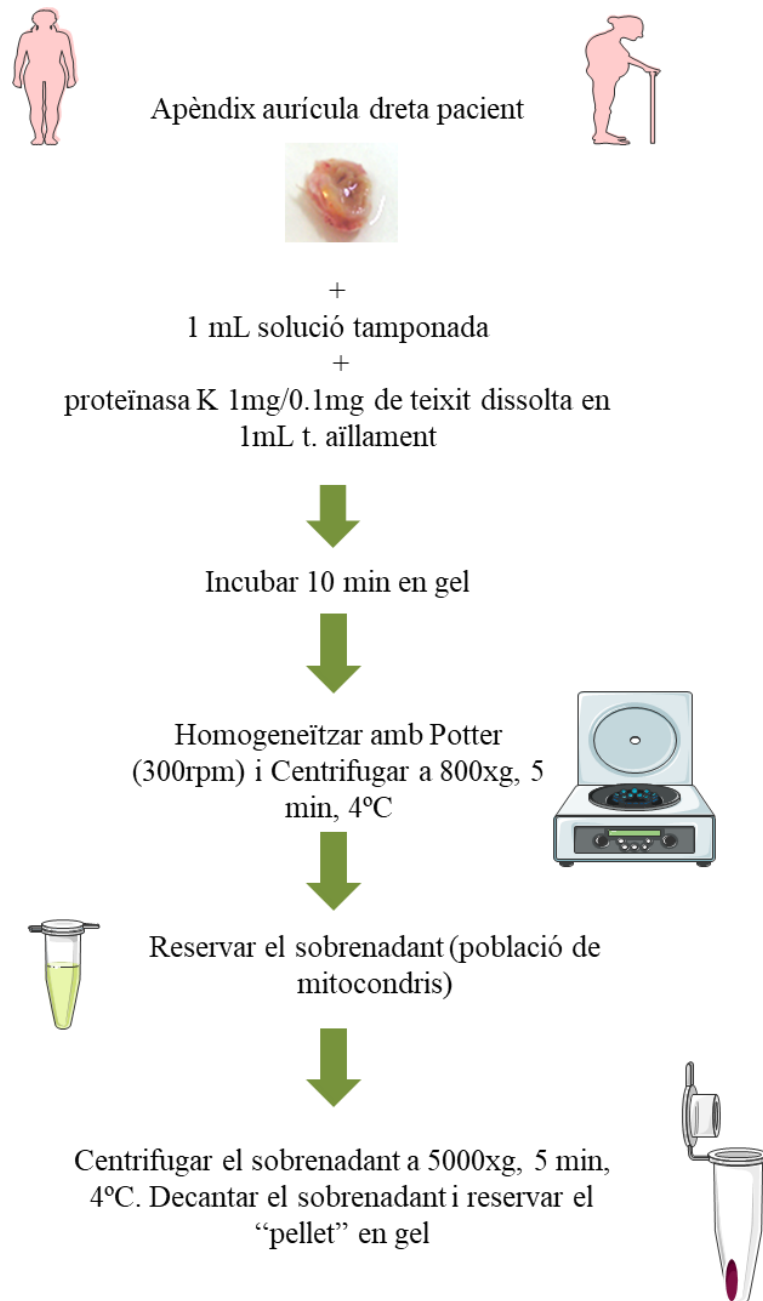
En ambdós tipus d'ELISA es van incloure pous com a controls negatiu en el quals es va ometre l'anticòs primari. Aquest control permet detectar la reactivitat inespecífica deguda a la presència de l'anticòs secundari o la ultraestreptavidina-HRP. Estudis amb mitocondris aïllats de pacients

#### **4.3.3. Aïllament de mitocondris**

L'aïllament dels mitocondris a partir de l'apèndix de l'aurícula dreta de pacients es va realitzar utilitzant la tècnica descrita per Hassouna et al., (157), basada en la digestió de la matriu extracel·lular amb proteïnasa K i posterior aïllament dels mitocondris per centrifugació diferencial.

Es va rentar el teixit miocàrdic amb sèrum fisiològic fred, per eliminar l'excés de sang. Es va tallar amb tisores i es va incubar durant 10 minuts en una solució tamponada de KCl amb proteïnasa K (1-2 mg de proteïnasa K/0,1 g de teixit fresc) en gel. A continuació es va homogeneïtzar amb Potter-tefló a 300 rpm i es va centrifugar a 800 xg durant 5 minuts a 4 °C. El pellet es va descartar i es va centrifugar el sobrenedant a 5000 xg durant 5 minuts a 4 °C per sedimentar els mitocondris (**Figura 26**).

**Composició de solució tamponada KCl:** KCl a 100 mmol/L, MOPS a 50 mmol/L a pH7,4, EGTA a 1mM, BSA al 1 %.



**Figura 26: Esquema de l'aïllament de mitocondris a partir d'aurícula de pacients.**

#### 4.3.3.1. Quantificació del contingut de calci mitocondrial

El contingut de calci en els mitocondris de pacients es va quantificar seguint el protocol descrit en l'apartat 4.2.5.3. del model murí (pàg. 64). El contingut de calci mitocondrial va ser expressat en nmols Ca/g de teixit i nmols de Ca/ CS.

#### 4.3.3.2. Consum d'oxigen en mitocondris de pacients

Per determinar si l'envelliment afecta la funció respiratòria mitocondrial dels pacients es va seguir el protocol descrit en l'apartat, 4.2.5.4. (pàg. 64). En pacients la taxa de QO (consum d'oxigen) es va expressar com a nmols O<sub>2</sub>/minuts × g teixit.

#### 4.3.4. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística de totes les dades, tret dels resultats generats per l'anàlisi de proteòmica diferencial, es va realitzar amb el programa informàtic SPSS (vs. 17). Les variables quantitatives es van presentar com a mitjana i error estàndard de la mitjana (ESM). Les variables categòriques es van expressar com a proporcions i reflecteixen el percentatge en cada grup analitzat. La comparació de mitjanes en les variables quantitatives es va realitzar mitjançant el test t-Student en el cas de no vulnerabilitat del supòsit de normalitat. En cas contrari, els valors es presenten com a mediana i rang interquartil i es va utilitzar el test d'U-Mann Whitney. La comparació entre proporcions es va realitzar mitjançant la prova de Chi-quadrat.

Es van considerar diferències estadísticament significatives quan es va obtenir un valor de  $p < 0,05$ .





# *Resultats*

## 5. Resultats

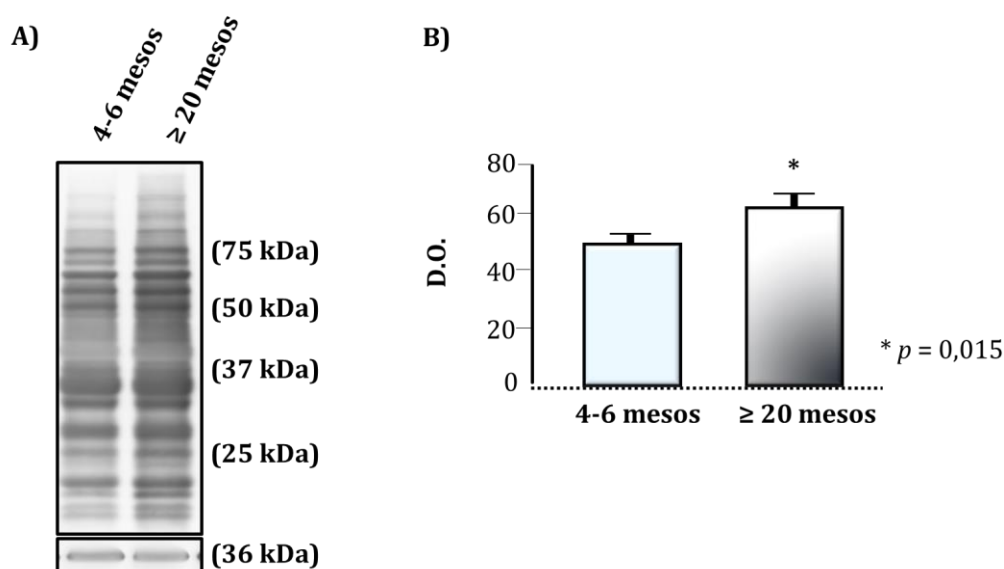
### 5.1. Model murí

#### 5.1.1. Acumulació d'AGE en el miocardi

Per investigar si l'envelliment augmenta l'acumul d'AGE en el miocardi dels ratolins es va realitzar Western blot i anàlisi massiva de proteòmica per HPLC acoblada a espectrometria de masses de les proteïnes cardíques glicades.

En l'anàlisi per Western blot es van detectar per quimioluminescència les bandes corresponents a proteïnes glicades i es va mesurar la densitat de les bandes obtingudes mitjançant el programa Image J. La **figura 27-A** mostra el resultat del patró representatiu de bandes obtingut per Western blot a partir del miocardi dels ratolins joves i en els ratolins vells.

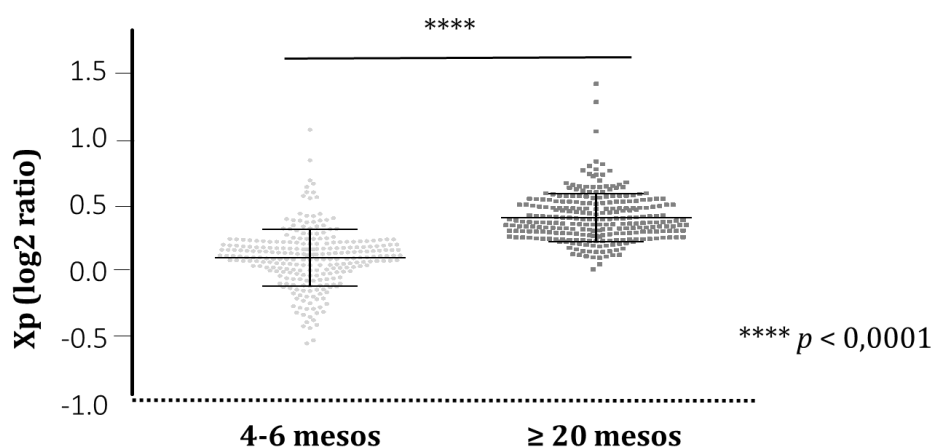
La quantificació total de les bandes va mostrar un augment estadísticament significatiu ( $p = 0,015$ ) de la densitat de les bandes en els homogenats del miocardi de ratolins vells respecte els homogenats del miocardi dels ratolins joves ( $45 \pm 0,2$  u.D.O. en joves respecte  $60 \pm 0,2$  u. D.O. en vells) (**Figura 27-B**).



**Figura 27: Quantificació de l'expressió de proteïnes modificades per AGE (CML) en el miocardi de ratolins joves i vells.** A) Western blot representatiu de l'expressió total de proteïnes modificades per AGE (anti-CML) normalitzada per GAPDH com a control de càrrega (36 kDa) en extractes miocàrdics de ratolí. B) Valors de la quantificació de CML normalitzats per GAPDH (CML/GAPDH) que indiquen, l'augment de l'acumul d'AGE en el miocardi dels ratolins de  $\geq 20$  mesos. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 4$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

L'anàlisi massiva de proteòmica dels homogenats de cor va identificar un total de 268 pèptids modificats per glicació, corresponents a 100 proteïnes. La majoria de glicacions identificades van ser a nivell de lisina (K) en forma de CML (en un 64 %) i, en un 3,8 % com a derivats del glicolaldehid (hidroximetil-OP). El 20 % de les glicacions van correspondre a modificacions per carboximetilació a nivell de triptòfan (W); en un 6,2 % la modificació va ser produïda per malonaldehid (MD54) i el 6 % restant va correspondre a modificacions a nivell d'arginina (R) en forma de MGH1, hidroximidazolidina, G-H1, Arg1HPG i Arg2HPG.

L'anàlisi quantitativa WSPP (Weighted Scan-Peptide-Protein) va permetre determinar un augment estadísticament significatiu ( $p = 0,0001$ ) dels pèptids glicats (Xp) en el teixit miocàrdic dels ratolins vells (**Figura 28**).



**Figura 28:** Canvis d'abundància en pèptids glicats (Xp) obtinguts a partir de l'anàlisi massiva de proteòmica per HPLC acoblada a espectrometria de masses en el miocardi dels ratolins. Gràfic de dispersió dels valors de Xp obtinguts a partir de l'anàlisi massiva per proteòmica segons l'edat del ratolí on es mostra un augment estadísticament significatiu dels pèptids glicats en el teixit miocàrdic dels ratolins de  $\geq 20$  mesos. On Xp és un indicador d'abundància i indica el grau de dispersió de cada pèptid identificat respecte a la mitjana obtinguda del grup control. Dades obtingudes a partir d'un total de  $n = 4$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

Els resultats obtinguts per Western blot i l'anàlisi massiva de proteòmica per HPLC acoblada a espectrometria de masses demostren que el contingut de proteïnes glicades en el miocardi dels ratolins vells es superior al contingut de proteïnes glicades en el miocardi dels ratolins joves.

#### 5.1.2. Deficiència de la via de detoxificació dependent de glioxalasa de precursors d'AGE durant l'envelliment

La principal via de detoxificació de dicarbonils és la via de la glioxalasa. Aquesta via consta de dues reaccions acoblades en cadena, en les que hi participen dos enzims: la glioxalasa-1 (Glo 1) i la glioxalasa 2 (Glo 2). El pas limitant de la via es troba a nivell de Glo 1, sent el glutatió el cofactor de l'enzim. El MG i el GO, són substrats de la via i, el D-lactat i glicolat són els productes finals, respectivament.

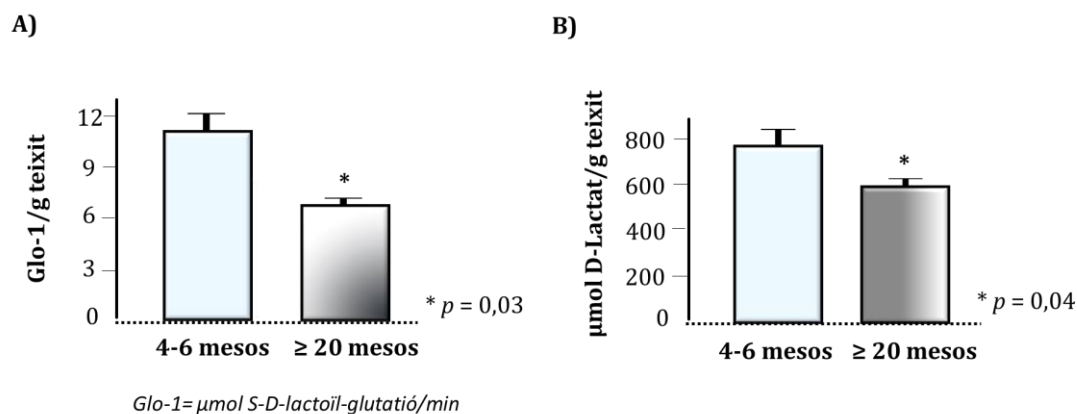
Per investigar si l'augment observat d'AGE en el miocardi senescent és secundari a una disfunció en la via de detoxificació de dicarbonils, es van realitzar mesures d'activitat i d'expressió de Glo 1 i es va determinar el contingut miocàrdic de D-lactat i de glutatió total en mostres miocàrdiques de ratolins joves i vells.

##### 5.1.2.1. Disminució de l'activitat Glo 1 i el contingut de D-lactat en el miocardi durant l'envelliment

Es va determinar l'activitat Glo 1 a partir de la quantificació espectrofotomètrica de la formació del S-D-lactoil-glutatió en homogenats miocàrdics de ratolins joves i vells. La taxa de producció del metabòlit S-D-lactoil-glutatió ( $\mu\text{mol S-D-lactoil-glutatió}/\text{minuts} \times \text{g teixit}$ ), va ser significativament inferior ( $p = 0,03$ ) en el miocardi dels ratolins vells respecte als ratolins joves

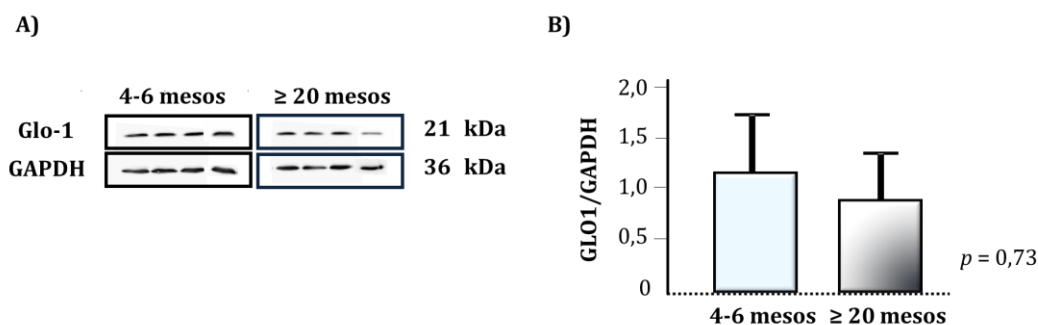
( $10,5 \pm 0,2 \mu\text{mols/minuts} \times \text{g teixit}$  en ratolins joves respecte  $6,5 \pm 0,2 \mu\text{mols/minuts} \times \text{g teixit}$  en els ratolins vells) (**Figura 29-A**).

El contingut de D-lactat en el teixit miocàrdic (producte final de la via de detoxificació de la glicoxalasa) es va determinar fluorimètricament a partir de la reducció de la resazurina. La concentració de D-lactat ( $\mu\text{mol D-lactat/g teixit}$ ) va ser significativament inferior ( $p = 0,04$ ) en els extractes miocàrdics de ratolins vells respecte els ratolins joves ( $748 \pm 61 \mu\text{mol D-lactat/g teixit}$  en joves respecte  $562 \pm 31 \mu\text{mol D-lactat/g teixit}$  en vells) (**Figura 29-B**).



**Figura 29: Activitat Glo 1 i contingut de D-lactat en el miocardi de ratolins.** **A)** L'activitat Glo 1 calculada a partir dels  $\mu\text{mol S-D-lactat}/\text{minuts} \times \text{g teixit}$ , es troba reduïda en els extractes miocàrdics de ratolins de  $\geq 20$  mesos ( $p = 0,03$ ). Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 4$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells. **B)** El contingut de D-lactat va ser inferior en els extractes miocàrdics de ratolins vells respecte els joves. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 5$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

Per comprovar si la disminució d'activitat Glo 1 observada en el miocardi senescent dels ratolins és deguda a una disminució de l'expressió de la proteïna, es va quantificar l'expressió de Glo 1 per Western blot. L'anàlisi per Western blot no va identificar canvis significatius associats a l'edat ( $p = 0,73$ ) en l'expressió de Glo 1 (normalitzada per GAPDH) ( $1,1 \pm 0,5$  u.D.O en joves respecte  $0,8 \pm 0,4$  u.D.O. en vells) (**Figura 30**).



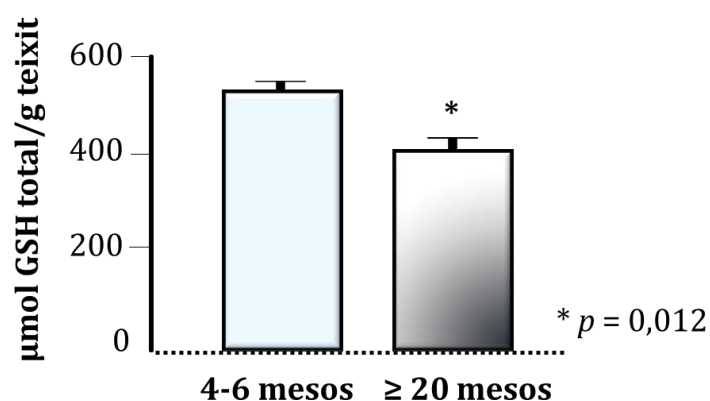
**Figura 30: Quantificació de l'expressió de Glo 1 en el miocardi de ratolins.** A) Western blot de l'expressió total Glo 1 (21 kDa) normalitzada per GAPDH (36 kDa) com a control de càrrega, en 4 extractes miocàrdics independents per cada grup d'edat. B) Quantificació corresponent al quocient entre els valors d'expressió de Glo 1 normalitzada per GAPDH (Glo 1/GAPDH). Els resultats indiquen que no hi ha canvis de l'expressió de Glo 1 associats a l'edat. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 4$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

#### 5.1.2.2. Contingut de glutatió en el miocardi envellit

El glutatió reduït s'oxida durant la producció de S-D-lactoil-glutatió i es regenera en forma reduïda per l'acció de Glo 2. Per tant, la disponibilitat de glutatió reduït afecta la velocitat de la reacció depenent de la Glo 1 en el teixit miocàrdic.

El contingut de GSH total (cofactor de la Glo 1) en el teixit miocàrdic es va determinar per canvis d'absorbància a 450 nm secundaris a la producció de TNB de forma proporcional a la concentració de l'enzim en la mostra.

El contingut de GSH total ( $\mu\text{mol}$  GSH total/g teixit) va ser significativament inferior ( $p = 0,012$ ) en els extractes miocàrdics de ratolins vells respecte els ratolins joves ( $540 \pm 15 \mu\text{mol}$  GSH total/g teixit en ratolins joves respecte  $420 \pm 21 \mu\text{mol}$  GSH total/g teixit en ratolins vells) (Figura 31).



**Figura 31: Contingut de GSH total en extractes miocàrdics de ratolins.** Els nivells de glutatió total (GSH total/g teixit) calculats a partir dels valors d'absorbància a 450nm del TNB, es troben reduïts en el miocardi de ratolins de  $\geq 20$  mesos. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 5$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

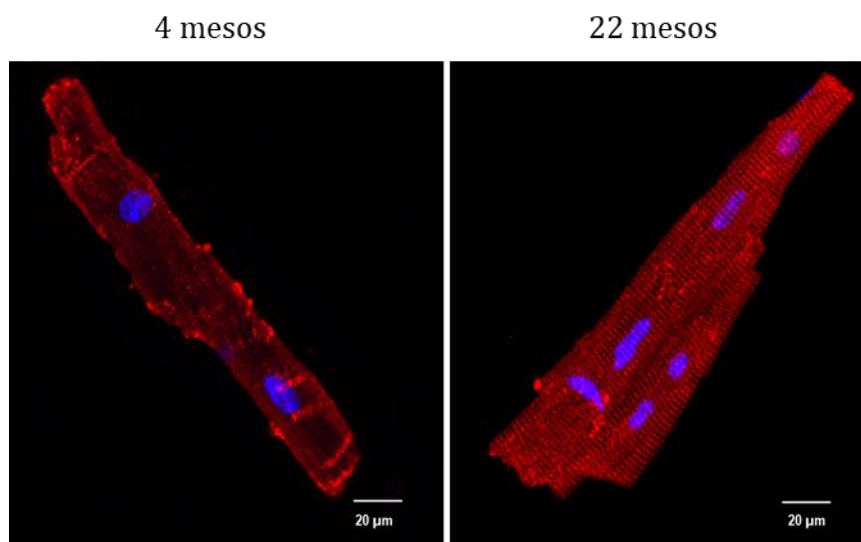
### 5.1.3. Augment del contingut d'AGE intracel·lulars i glicació del RyR en el miocardi

Per investigar si el dèficit de detoxificació de precursors d'AGE pot provocar un augment del contingut intracel·lular de proteïnes glicades i, específicament, del grau de glicació del RyR, es va quantificar la càrrega d'AGE intracel·lulars en cardiomiòcits aïllats utilitzant immunofluorescència i, ELISA de tipus sandvitx, i es van identificar específicament les proteïnes intracel·lulars que són diana de glicació amb anàlisi massiva de proteòmica per HPLC acoblada a espectrometria de masses.

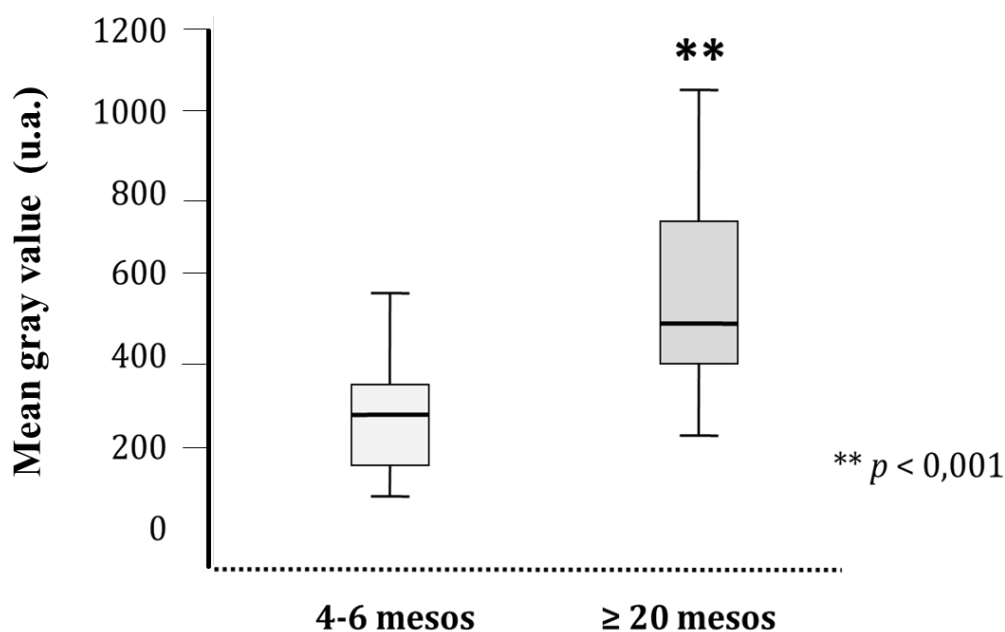
#### 5.1.3.1. Contingut de proteïnes glicades en cardiomiòcits senescents

La quantificació de les proteïnes glicades es va realitzar per immunomarcatge utilitzant microscòpia confocal en cardiomiòcits aïllats de ratolins joves i vells, mitjançant la utilització d'un anticòs anti-MG.

El contingut intracel·lular de proteïnes glicades per MG en els cardiomiòcits de ratolins vells (mitjana: 503,56 (rang interquartil 357,48)) va ser major que l'obtingut en els cardiomiòcits joves (mitjana: 306,98 (rang interquartil 97,78)) ( $p < 0,001$ ) (**Figura 32** i **Figura 33**).



**Figura 32: Immunofluorescència d'AGE intracel·lulars en cardiomiòcits de ratolí.** Imatges representatives, obtingudes per microscòpia confocal a X60, de múltiples plans en Z de dos cardiomiòcits aïllats de cor de ratolí jove i vell, marcats amb un anticòs dirigit a proteïnes modificades per MG. L'immunomarcatge fluorescent ha detectat un augment significatiu de la quantitat de proteïnes glicades en cardiomiòcits de ratolins de  $\geq 20$  mesos respecte als animals joves. En vermell es mostren les proteïnes que han estat modificades per MG, els nuclis es representen en blau (Hoechst).



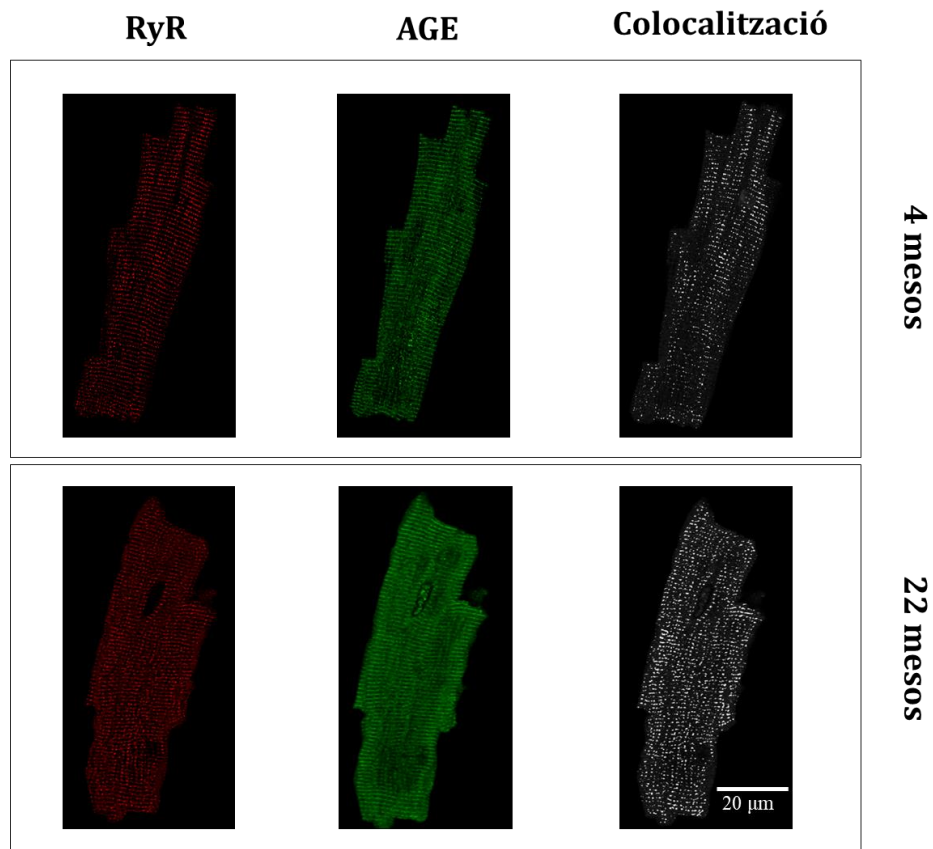
**Figura 33: Contingut intracel·lular d'AGE en cardiomiòcits de ratolí.** Els diagrames de caixes representen la quantificació del *Mean gray value* (u.a.) (la suma dels valors de gris de tots els píxels de la selecció dividits pel nombre de píxels) generat a partir de l'anàlisi de les imatges obtingudes per Image J, on s'observa que el contingut intracel·lular de proteïnes glicades per MG es major en els cardiomiòcits dels ratolins vells. Valor obtinguts a partir d'un total de n = 24-34 cardiomiòcits per grup, utilitzant 6 cors (\*\* p < 0,001).

#### 5.1.3.2. L'envelliment s'associa a un major grau de colocalització entre AGE i RyR

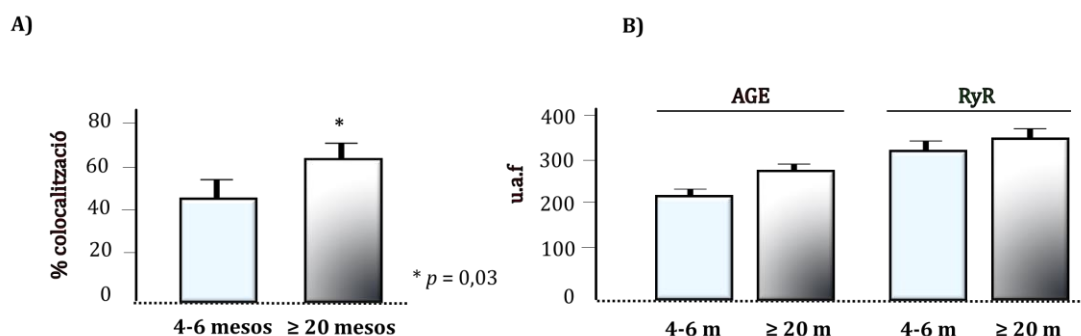
Per investigar si el RyR estava més glicat durant l'envelliment es va realitzar un anàlisi d'immunofluorescència i es va quantificar el grau de colocalització, mitjançant la utilització simultània d'un anticòs anti-AGE i un anticòs anti-RyR, en cardiomiòcits aïllats de ratolins joves i vells.

El grau de colocalització entre RyR (vermell) i AGE (verd) en els cardiomiòcits aïllats es va considerar una forma indirecta de mesurar el grau de glicació del RyR (**Figura 34** i **Figura 35**). Els resultats demostren que la quantitat de punts colocalitzants del citofluorograma va ser major en cardiomiòcits de ratolins vells que en cardiomiòcits de ratolins joves.





**Figura 34: Identificació de zones colocalitzants entre RyR i AGE de glucosa en cardiomiòcits de ratolí.** Imatges representatives de 2 cardiomiòcits aïllats (una secció òptica) de ratolins joves i vells, marcats simultàniament amb anticossos per anti-RyR (vermell) i anti-AGE de glucosa (verd). Les zones colocalitzants (columna de la dreta) venen representades en blanc i es van obtenir a partir de les imatges generades per un microscopi confocal espectral. La fluorescència es va obtenir utilitzant les línies de làser 488 nm i, 568 nm.



**Figura 35: Percentatge de colocalització entre RyR i AGE.** **A)** El percentatge de colocalització entre els anticossos dirigits a AGE i RyR va ser major en cardiomiòcits de ratolins de  $\geq 20$  mesos respecte al percentatge de colocalització, d'aquests dos anticossos, en els cardiomiòcits dels ratolins joves. **B)** Representació dels valors de fluorescència total de RyR i AGE (u.a.f.) en els cardiomiòcits de ratolins per cada grup d'edat. Aquests resultats indiquen les unitat arbitràries de fluorescència per cada anticòs, AGE i RyR, detectades en els cardiomiòcits de ratolins joves i vells, on es s'observa que la RyR es mostra invariable en els dos grups d'edat, a diferència dels AGE, on tendeixen a ser majors en els ratolins vells. No s'observa una diferència estadísticament significativa ja que no es mostren els punts colocalitzants entre els dos anticossos. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  ESM i han estat obtingudes a partir de 25-30 talls en z per cada cèl·lula en un total de 20-25 cardiomiòcits per grup obtinguts de  $n = 4$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

#### 5.1.3.3. Determinació per ELISA del grau de glicació del RyR en vesícules aïllades de RS

Per confirmar que el RyR es troba més glicat durant l'envelliment es va determinar el seu grau de glicació mitjançant un ELISA de tipus sandvitx a partir de vesícules aïllades de RS (solubilitzades amb CHAPS) obtingudes de ratolins joves i vells. Degut a les limitacions tècniques imposades per la baixa especificitat del anticossos, es van utilitzar 3 anticossos diferents anti-AGE, anti-CML i anti-MG. Per confirmar que la proteïna que estàvem estudiant era RyR es va utilitzar un anticòs anti-RyR.

El resultat de l'ELISA sandvitx va mostrar majors valors d'absorbància en les vesícules de RS de ratolins vells ( $p = 0,014$ ), per AGE de glucosa (anti-AGE) (**Taula 2**). Per CML (anti-CML) els valors d'absorbància van ser iguals ( $p = 0,472$ ), mentre que no detectables (ND) per l'anticòs anti-MG. L'especificitat de la determinació es va comprovar a partir de la positivat del senyal obtingut amb l'anticòs anti-RyR tant en vesícules procedents de ratolins joves com vells, sense observar diferències estadísticament significatives ( $p = 0,788$ ).

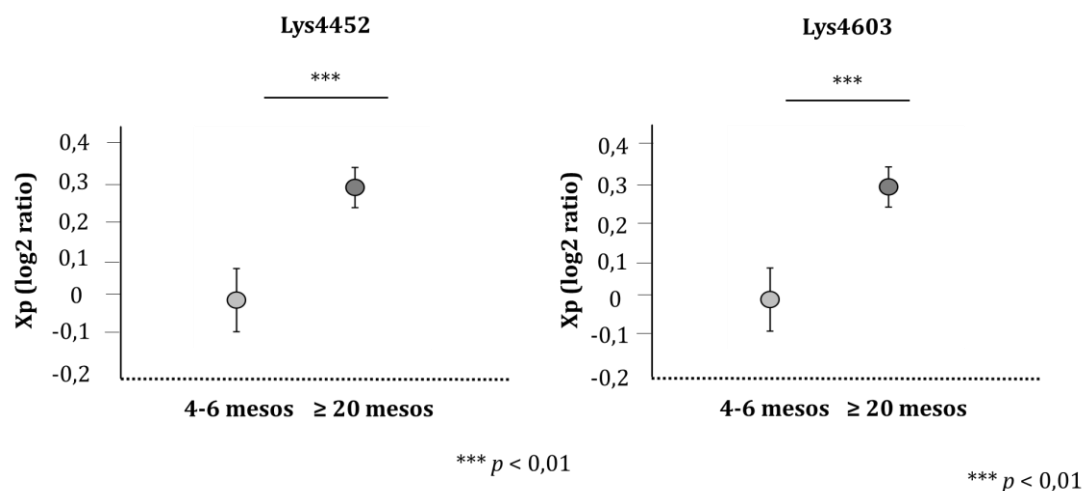
|                    | 4-6 mesos     | ≥ 20 mesos    | valor <i>p</i> |
|--------------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>RyR</b>         | 0,122 ± 0,005 | 0,120 ± 0,014 | 0,788          |
| <b>AGE glucosa</b> | 0,064 ± 0,002 | 0,074 ± 0,002 | <b>0,014</b>   |
| <b>CML</b>         | 0,100 ± 0,011 | 0,112 ± 0,012 | 0,472          |
| <b>MG</b>          | ND            | ND            |                |

**Taula 2:** Glicació del RyR detectada en un ELISA de tipus sandvitx. Valors absorbància (u.a. / 0,1 mg proteïna) obtinguts amb diferents anticossos per detectar AGE (CML, AGE glucosa i MG) a partir d'un ELISA tipus sandvitx després d'immunocapturar el RyR de les vesícules de RS de ratolins joves i ratolins vells. Els valors corresponents a RyR confirmen la immunocaptura del RyR i són iguals en els dos grups de ratolins testats. Els ratolins vells van mostrar un augment d'AGE de glucosa ( $p = 0,014$ ). Per CML no es van observar diferències i no es va detectar (ND) AGE de MG. Les dades estan expressades com a mitjana ± ESM i han estat obtingudes a partir de  $n = 5$  ratolins joves i  $n = 6$  ratolins vells.

#### 5.1.3.4. Identificació de pèptids glicats del RyR mitjançant proteòmica

Degut a que la immunofluorescència i l'ELISA van detectar un augment de la glicació del RyR durant l'envelliment, es va analitzar per proteòmica, el tipus i número de pèptids glicats del RyR. La proteòmica és una tècnica independent que permet evitar els problemes derivats de la baixa especificitat dels anticossos.

L'anàlisi massiva per proteòmica a partir de l'espectre de masses i usant la base de dades Unimod, va identificar dos pèptids glicats per hidroximetil-OP a nivell de lisina (K) en la posició 4452 i 4603 de la seqüència peptídica del RyR. La taxa  $X_p$  ( $\log_2$  ratio) va mostrar un increment de 0,3 vegades en els ratolins vells respecte els ratolins joves per ambdós pèptids ( $p < 0,01$ ) (Figura 36).



**Figura 36:** Canvis en l'abundància dels pèptids glicats per hidroximetil d'OP corresponents al RyR identificats per espectrometria de masses. Canvis d'abundància de pèptids glicats per a hidroximetil-OP del RyR identificats per anàlisi per HPLC acoblada a espectrometria de masses. Els valors de  $X_p$  corresponen al  $\log_2$  ratio obtingut d'abundància del pèptid glicat respecte a la mitjana dels valors d'abundància obtinguts en els homogenats procedents de ratolins joves. Els ratolins vells mostren un augment de glicació per hidroximetil-OP del RyR, tant en posició Lys4452 com Lys4603 respecte als

ratolins joves. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  ESM de  $X_p \pm$  ESM d'un total de  $n = 4$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

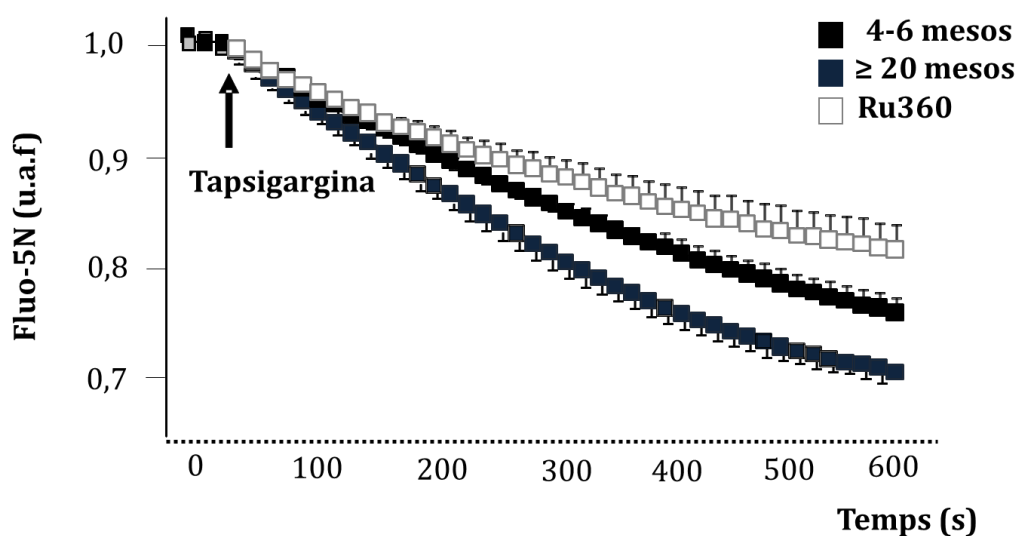
Aquests resultats estableixen de forma sòlida i independent que RyR està entre les proteïnes que contenen pèptids modificats per AGE, els quals es van trobar augmentats en el miocardi dels ratolins vells. Específicament, es van trobar nivells elevats en els pèptids que contenen hidroximetil-OP a nivell de lisina (K) en la posició 4452 i 4603 de la seqüència peptídica del RyR.

#### 5.1.4. Disfunció del RyR durant l'envelliment

Per investigar les possibles conseqüències funcionals associades a la glicació del RyR, es va avaluar el *calcium leak* des del RyR del RS en cardiomiòcits aïllats i en vesícules aïllades de RS de teixit miocàrdic de ratolins joves i vells.

Per quantificar el *calcium leak* en cardiomiòcits es va utilitzar cardiomiòcits de ratolins joves i ratolins vells marcats amb fluo-5N (fluorocrom que mostra una afinitat més baixa pel calci que el fluo-4) i permeabilitzats amb saponina per tal de monitoritzar el senyal fluorescent procedent del RS. L'alliberació de calci del RyR en cardiomiòcits aïllats de ratolí es va detectar com una pèrdua de fluorescència en presència de tapsigargina (per inhibir la seva recaptació) mesurada al llarg del temps a partir de les imatges obtingudes amb un sistema de microscòpia confocal.

Els cardiomiòcits de ratolins vells van mostrar un *calcium leak* més pronunciat (major caiguda de la fluorescència en presència de tapsigargina) respecte els cardiomiòcits de ratolins joves (Figura 37).

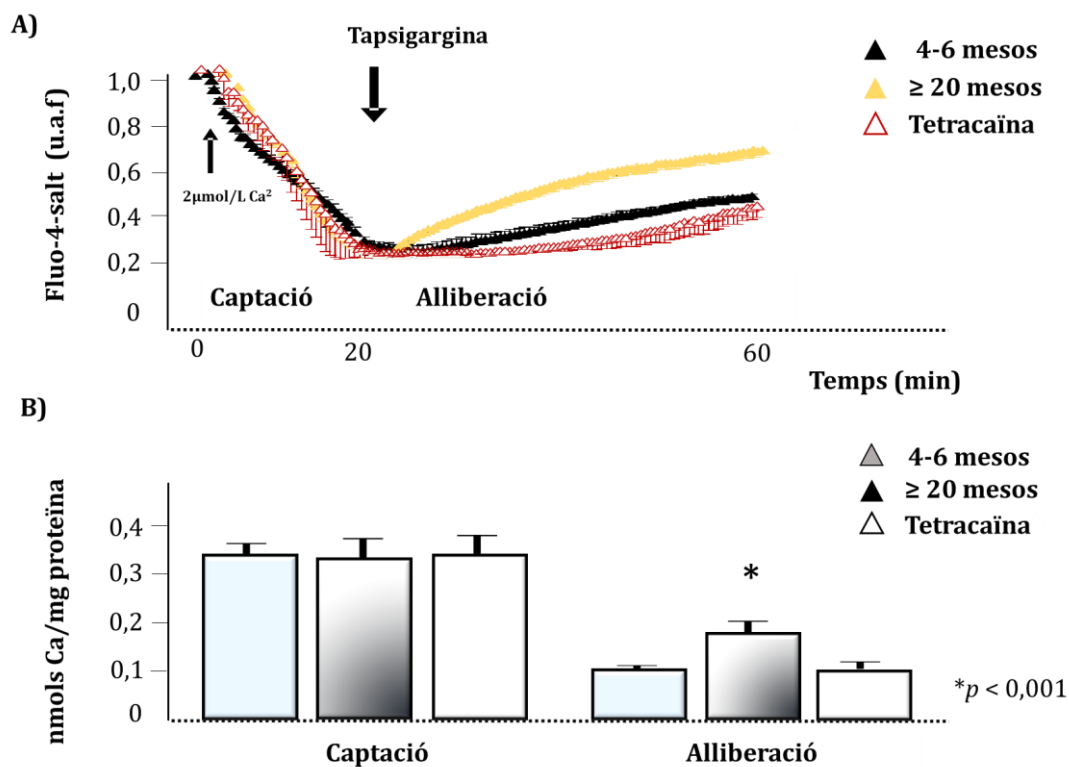


**Figura 37: Efecte de l'envelliment en el *calcium leak* dependent del RyR en cardiomiòcits aïllats.** Disminució de la fluorescència del fluo-5 després de l'addició de  $10 \mu\text{mol/L}$  de tapsigargina (inhibidor de la SERCA) en cardiomiòcits permeabilitzats. L'addició de  $25 \mu\text{mol/L}$  de RuR360 (inhibidor del RyR) en un subconjunt de cèl·lules va fer disminuir aquesta caiguda de fluorescència, el que confirma que correspon a *calcium leak* dependent del RyR. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  ESM i han estat obtingudes a partir d'un total de 18-20 cèl·lules per cada grup d'edat procedents de cors,  $n = 6$  de ratolí jove i  $n = 4$  de ratolí vell.

Per tal de confirmar els resultats de *calcium leak* obtinguts en cardiomiòcits, es va quantificar la cinètica de captació i alliberació de calci en vesícules aïllades de RS de ratolí. En

les vesícules aïllades de RS de ratolí la cinètica de calci no està alterada per la possible contribució dels mitocondris o altres elements cel·lulars. Les vesícules aïllades de RS es van resuspendre en un tampó que contenia la sal del fluorocrom fluo-4 en presència de  $\sim 2 \mu\text{mol/L}$  de  $\text{CaCl}_2$  en solució. En el fluo-4 en forma de sal, obtingut a partir de la lisi alcalina de l'èster de fluo-4-AM, s'anul·len les càrregues de la molècula de tal manera que la molècula pugui estar de manera lliure en el medi.

Es va detectar una baixada del senyal del fluo-4 en el tampó d'assaig durant 20 minuts fins a arribar al límit de detecció. Aquesta disminució del senyal va ser deguda a causa de l'entrada de calci dins les vesícules de RS mitjançant la SERCA. La velocitat de captació per part de la SERCA va ser similar en vesícules de RS de ratolins joves i en vesícules de RS de ratolins vells (**Figura 38**). Seguidament, l'addició de tapsigargina va permetre quantificar l'alliberació neta de calci dependent del RyR des del RS al llarg del temps, en el tampó d'assaig, detectat com un augment del senyal fluorescent. L'addició de  $100 \mu\text{mol/L}$  tetracaïna (inhibidor del RyR) en algunes rèpliques va poder permetre avaluar l'especificitat del senyal, ja que es va associar a una menor alliberació de calci. La fuga espontània de calci o *calcium leak* mesurada a partir d'una corba patró de  $\text{CaCl}_2$  en el rang d'entre  $0\text{-}5 \mu\text{mol/L}$  va ser major en les vesícules de RS obtingudes de ratolins vells respecte als ratolins joves (**Figura 38**).



**Figura 38: Efecte de l'envelliment sobre la captació i alliberació de calci en vesícules aïllades de RS.** A) Monitorització de la captació de calci i posterior alliberació (*calcium leak*) en vesícules aïllades de RS de ratolí. El *calcium leak* dependent de RyR des del RS i alliberat al medi es va detectar a partir de l'augment de la fluorescència de la sal de fluo-4 (unitats arbitràries de fluorescència) després de l'addició de  $10 \mu\text{mol/L}$  de tapsigargina (inhibidor de la SERCA). Abans d'afegir la tapsigargina, les vesícules de RS es van exposar a un calci de  $\sim 2 \mu\text{mol/L}$  per estimular la captació de calci mitjançant la SERCA. L'addició de  $100 \mu\text{mol/L}$  de tetracaïna (inhibidor del RyR) en un subconjunt de cèl·lules va fer disminuir l'augment de fluorescència, el que confirma que correspon a *calcium leak* dependent del RyR. B) Quantificació de la captació i alliberació de calci total en vesícules aïllades de RS en els diferents grups

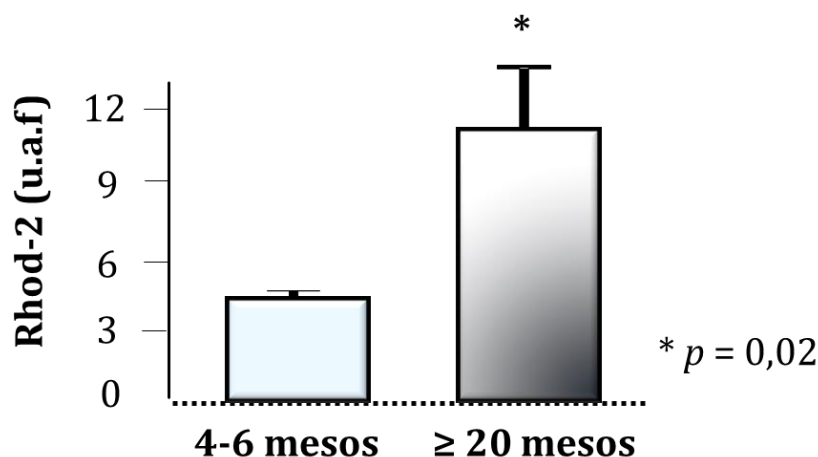
d'edat. La captació de calci dependent de SERCA va ser la mateixa tant en els ratolins joves com en els ratolins vells, a diferència de l'alliberació de calci dependent del RyR on el *calcium leak* va ser major en les vesícules aïllades de RS de ratolí de  $\geq 20$  mesos respecte als ratolins joves, expressat com a nmols Ca/mg proteïna i calculat a partir d'una corba patró de  $\text{CaCl}_2$  en el rang d'entre 0-5  $\mu\text{mol/L}$ . La barra de tetracaïna correspon a la mitjana dels dos grups d'edat. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  ESM i han estat obtingudes a partir de 12-14 cardiomiòcits per grup.

### 5.1.5. Efecte de l'edat avançada sobre la funció mitocondrial

#### 5.1.5.1. L'augment del *calcium leak* dependent del RyR s'associa a un augment del contingut de calci mitocondrial

Per investigar si el *calcium leak* del RS pot afectar el contingut de calci mitocondrial, es van avaluar els nivells de calci lliure i calci total mitocondrial utilitzant cardiomiòcits i mitocondris cardíacs aïllats de ratolí, respectivament.

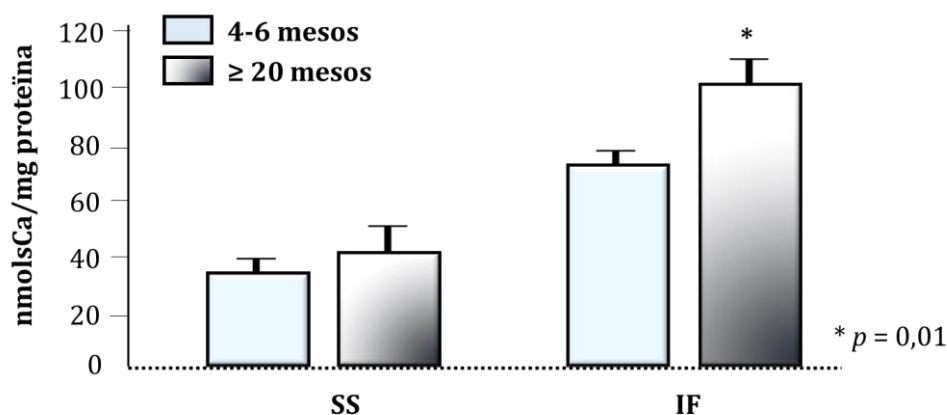
Els nivells de calci lliure es van detectar en cardiomiòcits aïllats marcats amb rhod-2-AM, un marcador específic de calci permeable a les membranes i que s'acumula als mitocondris. La fluorescència mitocondrial de rhod-2 (u.a.f.) va ser significativament més elevada en els cardiomiòcits de ratolins vells ( $11,5 \pm 0,4$  u.a.f.) que en els cardiomiòcits de ratolins joves ( $4,6 \pm 0,1$  u.a.f.) (**Figura 39**), suggerint uns nivells de calci lliure més elevats en la matriu mitocondrial dels animals vells.



**Figura 39:** Efecte de l'envelliment sobre la quantitat de calci lliure en els mitocondris dels cardiomiòcits de ratolins. Els cardiomiòcits aïllats de ratolins vells van mostrar nivells de fluorescència de rhod-2 més elevats que els ratolins joves. Aquests resultats indiquen que l'envelliment s'associa a un augment del calci lliure en els mitocondris dels cardiomiòcits de ratolins de  $\geq 20$  mesos. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  ESM i han estat obtingudes a partir d'un total de  $n = 4$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

Per quantificar el contingut total de calci mitocondrial, els mitocondris aïllats es van tractar amb HCl. Aquesta maniobra serveix per solubilitzar les sals de calci que poden estar precipitades a la matriu mitocondrial. El calci solubilitzat es va quantificar a través del fluorocrom CaG5N, específic de calci, i usant una corba estàndard de  $\text{CaCl}_2$ . El contingut de calci total va ser major en mitocondris IF de ratolins vells ( $110 \pm 25$  nmol Ca/mg proteïna) que en mitocondris IF de ratolins joves ( $80 \pm 13$  nmol Ca/mg proteïna  $p = 0,01$ ). No es van observar diferències estadísticament significatives en el contingut de calci dels mitocondris SS entre els

dos grups d'edat ( $32 \pm 5$  nmol Ca/mg de proteïna en joves i  $44 \pm 7$  nmol Ca/mg de proteïna en vells  $p = 0,657$ ) (Figura 40).



**Figura 40: Contingut de calci mitocondrial total en els mitocondris SS i IF.** L'envelliment es va associar a un augment del contingut total de calci en els mitocondris IF. En canvi, no es van veure diferències degudes a l'edat en la subpoblació de mitocondris SS. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 4$  ratolins joves i  $n = 4$  ratolins vells.

Aquests resultats indiquen que l'envelliment s'associa a un augment significatiu del contingut de calci que afecta únicament a la subpoblació de mitocondris IF.

#### 5.1.5.2. Efecte de l'envelliment sobre els mitocondris i el consum d'oxigen

Per conèixer si l'envelliment afecta al contingut total de mitocondris en el miocardi i a la funció mitocondrial es va determinar el rendiment mitocondrial (RM, mg proteïna/g teixit), activitat CS (UCS/mg proteïna) i consum d'oxigen per gram de teixit en mitocondris aïllats de ratolins joves i vells.

El contingut total de mitocondris en el teixit cardíac va ser igual en els ratolins joves i els vells, tal i com es dedueix a partir de les dades del rendiment mitocondrial i de l'activitat CS (Taula 3).

| RM (mg/g teixit) | 4-6 mesos      | ≥ 20 mesos    | valor $p$ |
|------------------|----------------|---------------|-----------|
| SS               | $10,2 \pm 1,0$ | $9,9 \pm 1,0$ | 0,858     |
| IF               | $10,7 \pm 1,2$ | $8,1 \pm 0,9$ | 0,109     |

| UCS/mg | 4-6 mesos     | ≥ 20 mesos    | valor $p$ |
|--------|---------------|---------------|-----------|
| SS     | $3,0 \pm 0,4$ | $3,2 \pm 0,3$ | 0,645     |
| IF     | $3,3 \pm 1,2$ | $3,7 \pm 0,3$ | 0,423     |

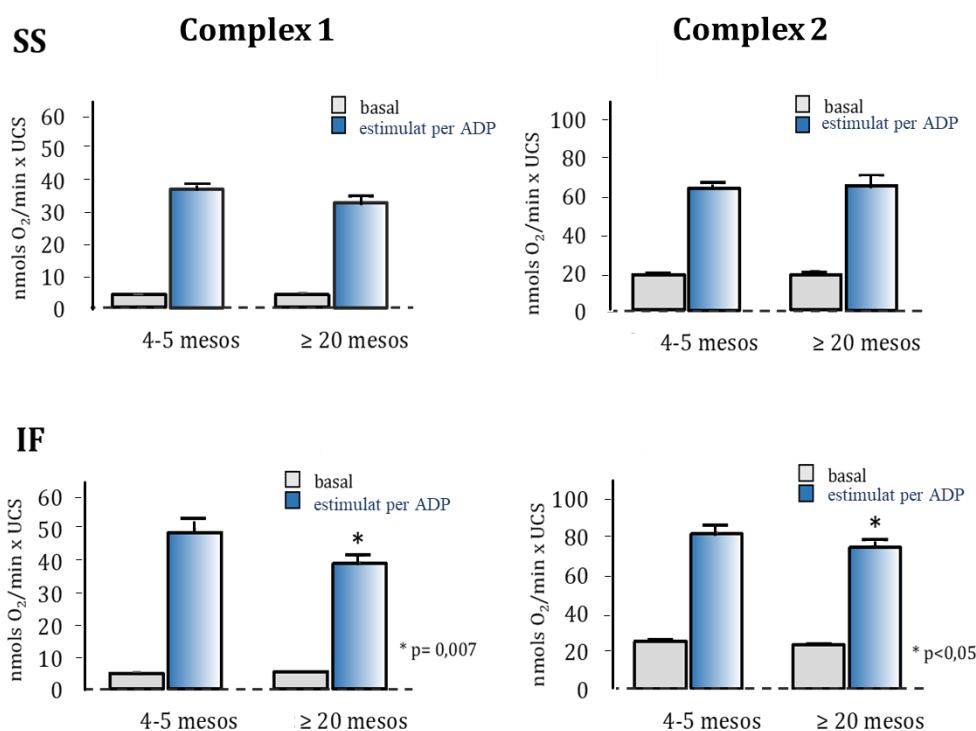
**Taula 3: Determinació del rendiment mitocondrial i de l'activitat CS en el teixit miocàrdic.** Rendiment mitocondrial (RM), expressat com a mg de proteïna mitocondrial/ g teixit fresc i activitat CS, expressada com a UCS/mg (UCS =  $\mu$ mol TNB/min) en mitocondris SS i IF de teixit miocàrdic de ratolí. Les dades estan expressades com a mitjana  $\pm$  ESM i han estat obtingudes a partir d'un total de  $n = 5$  ratolins joves i  $n = 10$  ratolins vells.

Aquests resultats demostren que l'augment en el contingut de calci en la subpoblació de mitocondris IF no va estar acompanyat per una clara disminució en la quantitat de mitocondris en el miocardi de ratolins vells (rendiment mitocondrial: 8.1 [vells] vs 10.7 [joves],  $p = ns$ ; CSU / mg: 3.3 [vells] vs 3.7 [joves],  $p = ns$ ).

La funció mitocondrial de ratolins joves i vells es va avaluar en mitocondris cardíacs SS i IF a partir del consum d'oxigen en condicions basals, és a dir en presència de substrats del cicle de Krebs, i després d'estimular amb ADP (consum màxim), utilitzant substrats del complex 1 (malat-glutamat) o complex 2 (succinat-rotenona).

La respiració mitocondrial en la subpoblació de mitocondris cardíacs SS va ser igual en ambdós grups d'edat, tant en l'estat basal (fase 2) com després d'estimular amb ADP (fase 3) en presència de substrats pel complex 1 i del complex 2.

En la subpoblació de mitocondris cardíacs IF no es van observar diferències en el consum d'oxigen basal entre els ratolins joves i els ratolins vells. En canvi, sí que hi van haver diferències en el consum d'oxigen màxim (després de l'estimulació amb ADP) entre els dos grups d'edat. Així, la taxa màxima de consum d'oxigen va ser menor en els mitocondris IF dels ratolins vells tant en presència de substrats de complex 1 ( $39,0 \pm 1,9$  nmolsO<sub>2</sub>/minuts × UCS en ratolins vells respecte  $48,5 \pm 2,8$  nmolsO<sub>2</sub>/minuts × UCS en ratolins joves;  $p = 0,007$ ) com en presència de substrats del complex 2 ( $73,8 \pm 2,1$  nmolsO<sub>2</sub>/minuts × UCS en ratolins vells respecte  $80,9 \pm 2,0$  nmolsO<sub>2</sub>/minuts × UCS en ratolins joves;  $p = 0,038$ ) (**Figura 41**).



**Figura 41: Efecte de l'envelliment sobre la respiració mitocondrial en mitocondris SS i IF.** Taxes de consum d'oxigen expressades com a nmolsO<sub>2</sub>/min x UCS en l'estat basal i en presència d'ADP usant substrats del complex 1 i complex 2 en mitocondris cardíacs SS i IF de ratolins joves i vells. El consum d'oxigen en condicions basals no es troba afectat per l'envelliment. En canvi, l'envelliment produeix una disminució del consum d'oxigen depenent d'ADP en els mitocondris IF. Aquesta disminució s'observa tant en presència de substrats pel complex 1 com pel complex 2. Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n=5 ratolins joves i n = 10 ratolins vells.



Aquests resultats indiquen una reducció de la capacitat màxima del consum d'oxigen en presència d'ADP en la subpoblació de mitocondris cardíacs IF de ratolins vells.

## 5.2. Model humà

El model experimental humà que s'ha utilitzat en aquesta tesi és teixit de l'apèndix de l'aurícula, que s'ha extret durant la intervenció quirúrgica per recanvi valvular o by-pass coronari en pacients operats al servir de cirurgia cardíaca de l'Hospital Vall d'Hebron.

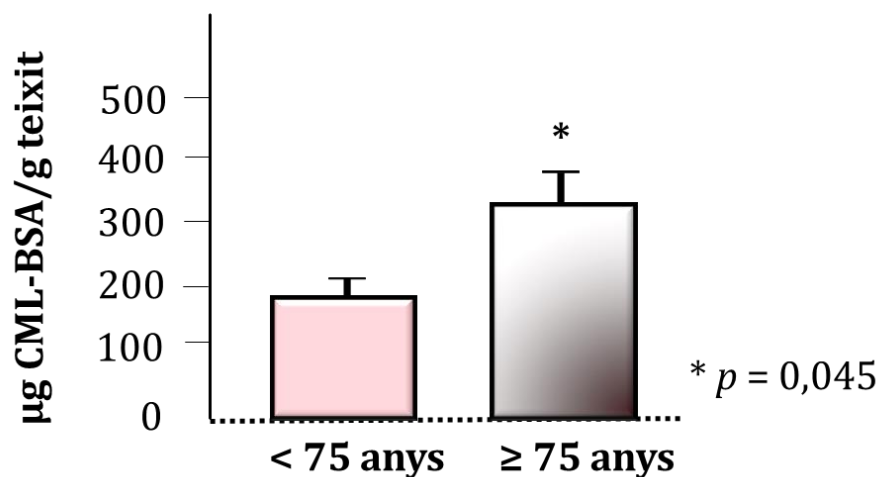
En totes les determinacions realitzades en teixit miocàrdic humà, les mostres han estat escollides de tal forma que la representació d'altres variables, com per exemple la diabetis, la insuficiència cardíaca, la hipertensió, la hiperlipèmia i fumador actiu, es mantenia sense significació estadística en ambdós grups d'edat (joves < 75 anys; ancians  $\geq$  75 anys).

### 5.2.1. Efecte de l'envelliment sobre l'acumulació d'AGE en el miocardi i la glicació del RyR

Per investigar si l'envelliment augmenta l'acumulació d'AGE en el teixit miocàrdic humà es van desenvolupar dos tipus d'ELISA: un ELISA de tipus competitiu per determinar el contingut global de proteïnes glicades per CML i un ELISA de tipus sandvitx per investigar específicament el grau de glicació del RyR.

#### 5.2.1.1. Acumulació d'AGE en el miocardi

Per l'ELISA competitiu es va utilitzar un anticòs que reconeix les proteïnes modificades per CML (anti-CML-BSA). El resultat generat per espectrofotometria en el miocardi de pacients va mostrar un augment estadísticament significatiu ( $p = 0,045$ ) de la quantitat global de proteïnes, modificades per CML, en el miocardi de pacients de  $\geq 75$  anys ( $341 \pm 63 \mu\text{g CML-BSA/g teixit}$ ) respecte al miocardi de pacients més joves ( $193 \pm 24 \mu\text{g CML-BSA/g}$ ) (**Figura 42**).



**Figura 42: Detecció de proteïnes modificades per AGE (CML) en el teixit miocàrdic humà.** Nivells d'AGE detectats per l'anticòs anti-CML en un ELISA de tipus competitiu i quantificats a partir d'una corba estàndard. Els resultats indiquen un augment significatiu d'AGE de CML en el miocardi de pacients ancians ( $p = 0,045$ ). Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 26$  pacients joves i  $n = 15$  ancians.

En la **taula 4** s'observen les principals variables demogràfiques i clíniques dels pacients escollits per la determinació de proteïnes modificades per AGE (CML).

| Edat<br>n=número de pacients | < 75 anys<br>26 | ≥ 75 anys<br>15 | p valor |
|------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| Edat (anys) (SEM)            | 63 (8)          | 79 (3)          | <0,0001 |
| Homes n (%)                  | 19 (73,1)       | 7 (46,7)        | 0,108   |
| Insuficiència cardíaca n (%) | 17 (65,4)       | 11 (73,3)       | 0,743   |
| Diabetis n (%)               | 12 (46,1)       | 4 (26,7)        | 0,322   |
| Hipertensió n (%)            | 18 (69,2)       | 11 (73,3)       | 0,781   |
| Hiperlipidèmia n (%)         | 16 (61,5)       | 8 (53,3)        | 0,745   |
| Fumador actiu n (%)          | 4 (15,4)        | 2 (13,3)        | 1       |

**Taula 4: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc dels pacients escollits per la quantificació dels nivells d'AGE en el miocardi.** Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 26 pacients joves i n = 15 pacients ancians.

#### 5.2.1.2. Glicació del RyR en el miocardi durant l'envelliment

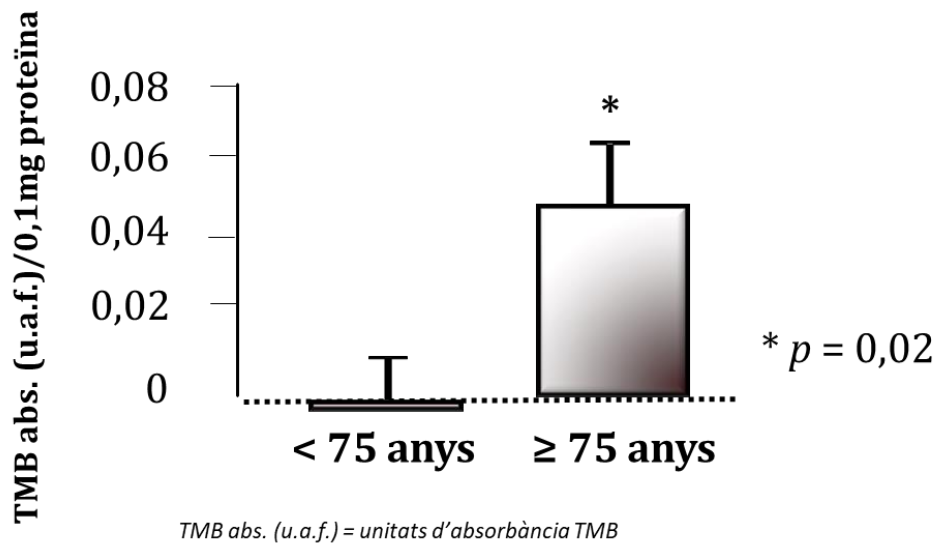
Per investigar si l'envelliment s'associa a un augment del grau de glicació del RyR en el teixit miocàrdic de pacients es va desenvolupar un ELISA sandvitx basat en la utilització d'anticossos que reconeixen proteïnes modificades per CML (anti-CML) i MG (anti-MG), utilitzant simultàniament un anticòs anti-RyR per tal d'immunocapturar el RyR en vesícules aïllades de RS.

El resultat generat per espectrofotometria va mostrar la presència de RyR en vesícules de RS de pacients joves (0,420 u.a. ± 0,020) i en vesícules de RS de pacients vells (0,430 u.a. ± 0,039), sense que es detectessin diferències estadísticament significatives en els valors d'absorbància. La quantitat de glicació detectada amb l'anticòs anti-CML va ser igual en ambdós grups d'edat (0,496 u.a. ± 0,016 en pacients joves i 0,486 u.a. ± 0,040 en pacients vells,  $p = 0,896$ ). Tanmateix, l'anticòs anti-MG no va tenir suficient sensibilitat i no va donar una senyal detectable per espectrofotometria.

Degut a la rellevància del MG com a precursor d'AGE intracel·lular, es va biotinilar l'anticòs anti-MG per tal d'augmentar la sensibilitat de la tècnica. Per comprovar la sensibilitat i especificitat de l'anticòs un cop biotinitat, és va testar utilitzant un ELISA de tipus indirecte sensibilitzant la placa amb MG-BSA. L'anticòs anti-MG biotinitat va mostrar reactivitat específica per l'antigen, obtenint un valor d'absorbància a 450 nm de 0,568 u.a., mentre que el control negatiu (reactivitat inespecífica deguda a l'anticòs secundari) va ser 0,051 u.a. d'absorbància.

Un cop verificada la bona reactivitat de l'anticòs anti-MG biotinitat, es va repetir el sandvitx per identificar la glicació de RyR per MG. El resultat obtingut va mostrar un augment dels valors d'absorbància en les vesícules de RS de pacients ancians ( $0,046 \pm 0,015$  respecte a  $0,001 \pm 0,012$  en les vesícules de RS de pacients joves,  $p = 0,022$ ).

Aquests resultats indiquen un major grau de glicació del RyR per MG (**Figura 43**).



**Figura 43: Grau de glicació del RyR avaluada per un ELISA sandvitx.** Glicació del RyR detectat per l'anticòs anti-MG biotinitat en un ELISA de tipus sandvitx realitzat amb vesícules aïllades de RS de pacients. Es va obtenir un augment d'absorbància en les vesícules de pacients ancians ( $p = 0,02$ ) indicatiu d'un augment del grau de glicació del RyR per MG. Els valors corresponen a la mitjana d'unitats d'absorbància del TMB/0,1mg proteïna. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 13$  pacients joves i  $n = 9$  ancians.

En la **taula 5** s'observen les principals variables demogràfiques i clíniques dels pacients escollits per la determinació del grau de glicació del RyR.

| <b>Edat<br/>n=número de pacients</b> | <b>&lt; 75 anys<br/>13</b> | <b>≥ 75 anys<br/>9</b> | <b>p valor</b> |
|--------------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------|
| <b>Edat (anys) (SEM)</b>             | 60 (11)                    | 78 (2)                 | <0,0001        |
| <b>Homes n (%)</b>                   | 11 (84,6)                  | 6 (66,6)               | 0,609          |
| <b>Insuficiència cardíaca n (%)</b>  | 6 (46,1)                   | 5 (55,5)               | 1              |
| <b>Diabetis n (%)</b>                | 1 (7,7)                    | 2 (22,2)               | 0,544          |
| <b>Hipertensió n (%)</b>             | 7 (53,8)                   | 6 (66,6)               | 0,674          |
| <b>Hiperlipidèmia n (%)</b>          | 8 (61,5)                   | 4 (44,4)               | 0,666          |
| <b>Fumador actiu n (%)</b>           | 2 (15,3)                   | 0 (0)                  | 0,494          |

**Taula 5: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc dels pacients escollits per la quantificació de la glicació del RyR en el miocardi.** Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 13 pacients joves i n = 9 pacients ancians.

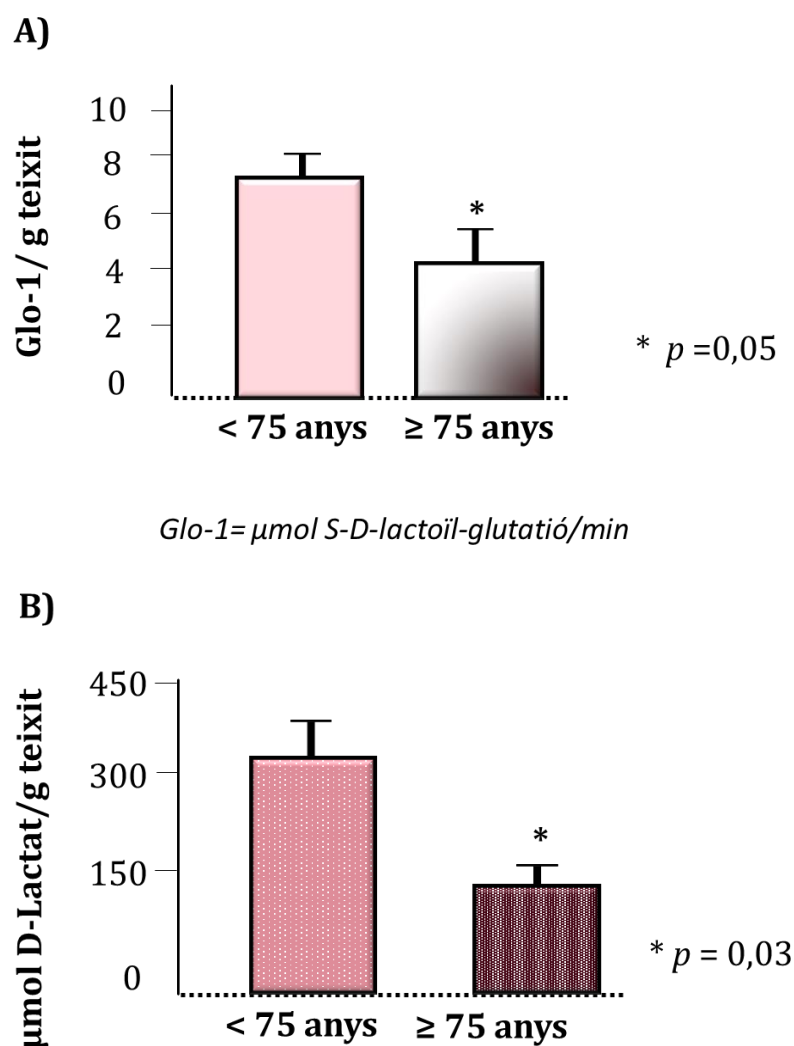
#### 5.2.2. En el miocardi humà l'envelliment s'associa a una deficiència de l'activitat de la via de la glicoxalasa

Per investigar si l'augment de glicació observat en el teixit miocàrdic de pacients ancians està relacionat amb un dèficit en la via de detoxificació de precursors d'AGE, tal i com hem observat en el miocardi murí, es van realitzar mesures d'activitat i d'expressió de Glo 1, contingut de D-lactat i nivells de glutatió total (GSH) en homogenats de teixit miocàrdic humà.

##### 5.2.2.1. Disminució de l'activitat Glo 1 i reducció de la generació de D-lactat en el teixit miocàrdic humà

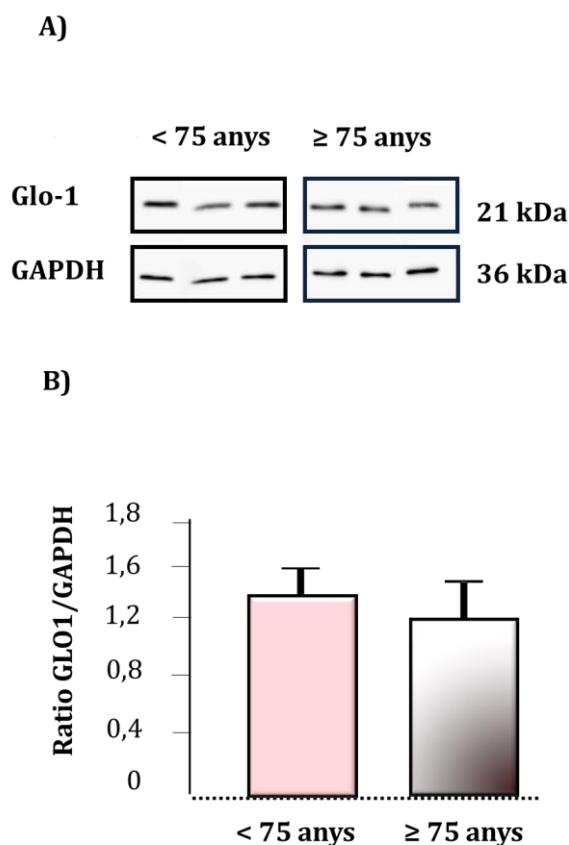
La taxa de producció del metabòlit S-D-lactoïl-glutatió ( $\mu\text{mol S-D-lactoïl-glutatió}/\text{minuts} \times \text{g teixit}$ ) en el miocardi de pacients de  $\geq 75$  anys va ser significativament menor ( $p = 0,05$ ) ( $4,6 \pm 1,3 \mu\text{mol S-D-lactoïl-glutatió}/\text{min} \times \text{g teixit}$ ) que en el miocardi dels pacients joves ( $7,8 \pm 1,0 \mu\text{mol S-D-lactoïl-glutatió}/\text{min} \times \text{g teixit}$ ) (**Figura 44-A**).

De forma similar, la concentració de D-lactat, determinada per espectrofotometria i calculada a partir d'una corba estàndard ( $\mu\text{mol D-lactat}/\text{g teixit}$ ), va ser significativament inferior en el teixit miocàrdic dels pacients ancians ( $137,90 \pm 35,72 \mu\text{mols D-lactat}/\text{g teixit}$ ) respecte el teixit miocàrdic de pacients joves ( $323,35 \pm 59,04 \mu\text{mols D-lactat}/\text{g}$ ) ( $p = 0,03$ ) (**Figura 44-B**).



**Figura 44: Activitat Glo 1 i contingut de D-lactat en el teixit miocàrdic de pacients.** **A)** L'activitat Glo 1 calculada a partir dels µmol S-D-lactoïl-glutatió/minuts × g teixit, es troba significativament reduïda en els extractes miocàrdics de pacients ancians (≥ 75 anys) respecte el miocardi dels pacients més joves. **B)** El contingut de D-lactat també va ser significativament inferior en els extractes miocàrdics de pacients ancians respecte els més joves. Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 26 pacients joves i n = 15 ancians.

Per comprovar si la disminució d'activitat Glo 1 observada en extractes miocàrdics de pacients de ≥ 75 anys és deguda a una disminució de l'expressió de la proteïna, es va analitzar l'expressió de Glo 1 per Western blot en els extractes miocàrdics de pacients joves i ancians utilitzant un anticòs anti-Glo 1 (**Figura 45-A**). L'anàlisi de la densitat de bandes corresponent a Glo 1 (21kDa) no va detectar canvis d'expressió de la proteïna associats a l'edat. Els valors de ratio (Glo 1/GAPDH) obtinguts a partir de la normalització de la densitat de cada banda per la densitat de la banda corresponent al control de càrrega (GAPDH) tampoc van ser diferents entre ambdós grups d'edat:  $1,30 \pm 0,5$  en pacients joves respecte  $1,2 \pm 0,4$  en pacients ancians,  $p = ns$  (**Figura 45-B**).



**Figura 45: Quantificació de l'expressió de Glo 1 en el miocardi humà.** A) Western blot de l'expressió total de Glo 1 (21 kDa) i de GAPDH (36 kDa) com a control de càrrega, en 3 extractes miocàrdics independents per cada grup d'edat. B) Quantificació del quocient entre els valors d'expressió de Glo 1 i GAPDH (Glo 1/GAPDH) en els dos grups d'edat. Els resultats indiquen que ni hi ha canvis en l'expressió de Glo 1 associats a l'edat. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 3$  pacients joves i  $n = 3$  pacients ancians.

En la **taula 6** s'observen les principals variables demogràfiques i clíniques dels pacients escollits per determinar la quantificació de la disminució de l'activitat Glo 1 i reducció de la generació de D-lactat en el teixit miocàrdic humà.

| Edat<br>n=número de pacients | < 75 anys<br>26 | ≥ 75 anys<br>15 | p valor |
|------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| Edat (anys) (SEM)            | 63 (8)          | 79 (3)          | <0,0001 |
| Homes n (%)                  | 19 (73,1)       | 7 (46,7)        | 0,108   |
| Insuficiència cardíaca n (%) | 17 (65,4)       | 11 (73,3)       | 0,743   |
| Diabetis n (%)               | 12 (46,1)       | 4 (26,7)        | 0,322   |
| Hipertensió n (%)            | 18 (69,2)       | 11 (73,3)       | 0,781   |
| Hiperlipidèmia n (%)         | 16 (61,5)       | 8 (53,3)        | 0,745   |
| Fumador actiu n (%)          | 4 (15,4)        | 2 (13,3)        | 1       |

**Taula 6:** Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc dels pacients escollits per la quantificació de la disminució de l'activitat Glo 1 i reducció de la generació de D-lactat en el teixit miocàrdic humà. Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 26 pacients joves i n = 15 pacients ancians.

Els resultats obtinguts sobre l'activitat de Glo 1 i la generació de D-lactat en els homogenats de teixit miocàrdic humà indiquen un dèficit de la via de detoxificació de precursors d'AGE depenent de la glioxalasa durant l'envelliment, malgrat l'absència de canvis en la seva expressió, de forma similar als resultats obtinguts en el miocardi murí.

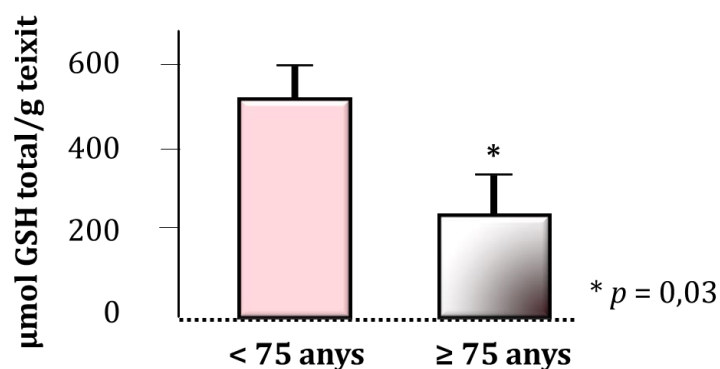
#### 5.2.2.2. Disminució del contingut de glutatió en el miocardi durant l'envelliment

Per investigar si el contingut de GSH total està alterat en el miocardi humà durant l'envelliment es va utilitzar el mateix protocol que l'utilitzat en el model murí.

El contingut de GSH total es va determinar espectrofotomètricament a partir de canvis d'absorbància a 450 nm deguts al TNB produït de forma proporcional al contingut de glutatió en la mostra. Es va calcular la concentració de GSH total utilitzant una corba estàndard.

El contingut de GSH total va ser significativament inferior ( $p = 0,03$ ) en el teixit miocàrdic dels pacients ancians ( $235,72 \pm 100,83 \mu\text{mols GSH total/g teixit}$ ) respecte al teixit miocàrdic dels pacients joves ( $525 \pm 86,91 \mu\text{mols GSH total/g teixit}$ ) (**Figura 46**).





**Figura 46: Contingut de GSH total en els extractes miocàrdics de pacients.** Els nivells de glutatió total (GSH total/g teixit) calculats a partir dels valors d'absorbància a 450nm del TNB, es troben reduïts en el miocardi humà. Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 26 pacients joves i n = 15 pacients ancians..

En la **taula 7** s'observen les principals variables demogràfiques i clíniques dels pacients escollits per determinar la quantificació de la disminució del contingut de glutatió en el miocardi durant l'envelliment.

| Edat<br>n=número de pacients | < 75 anys<br>26 | ≥ 75 anys<br>15 | p valor |
|------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| Edat (anys) (SEM)            | 63 (8)          | 79 (3)          | <0,0001 |
| Homes n (%)                  | 19 (73,1)       | 7 (46,7)        | 0,108   |
| Insuficiència cardíaca n (%) | 17 (65,4)       | 11 (73,3)       | 0,743   |
| Diabetis n (%)               | 12 (46,1)       | 4 (26,7)        | 0,322   |
| Hipertensió n (%)            | 18 (69,2)       | 11 (73,3)       | 0,781   |
| Hiperlipidèmia n (%)         | 16 (61,5)       | 8 (53,3)        | 0,745   |
| Fumador actiu n (%)          | 4 (15,4)        | 2 (13,3)        | 1       |

**Taula 7: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc dels pacients escollits per la quantificació de la disminució del contingut de glutatió en el miocardi durant l'envelliment.** Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 26 pacients joves i n = 15 pacients ancians.

Aquests resultats indiquen que el contingut de glutatió observat en el teixit miocàrdic dels pacients ancians es significativament menor que el contingut de glutatió observat en el teixit miocàrdic dels pacients joves.

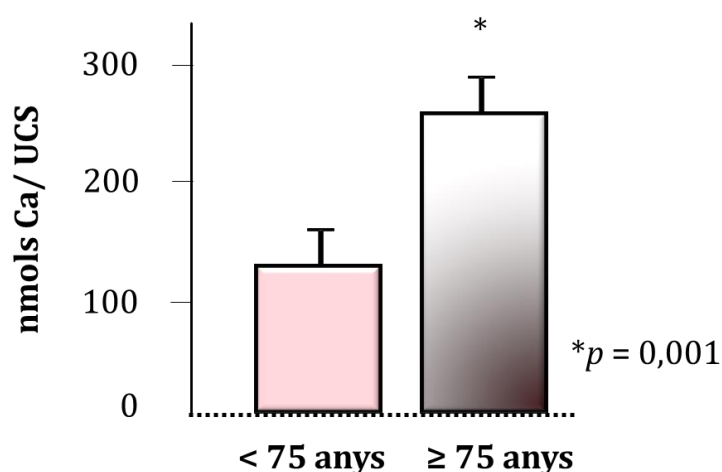
### 5.2.3. Efecte de l'envelliment en els mitocondris cardíacs humans

Per investigar l'efecte de l'envelliment en la funció mitocondrial es va determinar el contingut de calci a la matriu mitocondrial i es va quantificar el consum d'oxigen mitocondrial i el contingut total de mitocondris en el teixit miocàrdic de pacients joves i ancians, respectivament.

#### 5.2.3.1. Augment del contingut de calci en els mitocondris cardíacs humans durant l'envelliment

Per investigar si l'envelliment humà afecta al contingut de calci mitocondrial, tal i com hem vist en els mitocondris murins, es va quantificar el calci mitocondrial total després de solubilitzar les sals de calci precipitades a la matriu mitocondrial amb HCl.

El calci solubilitzat es va quantificar utilitzant CaG5N un fluorocrom específic de calci, i la concentració es va determinar a partir d'una corba estàndard de  $\text{CaCl}_2$ . Els resultats obtinguts indiquen que el contingut de calci total està augmentat en mitocondris de pacients ancians ( $275 \pm 25$  nmol Ca/UCS) respecte els mitocondris de pacients joves ( $145 \pm 13$  nmol Ca/UCS) ( $p = 0,001$ ) (Figura 47).



**Figura 47: Contingut de calci total en els mitocondris cardíacs humans.** En aquesta gràfica es mostra el contingut de calci total, calculat a partir de nmol de Ca/UCS, en els mitocondris dels pacients. Els resultats indiquen que l'envelliment s'associa a un augment del contingut de sals de calci a l'interior dels mitocondris. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 10$  pacients joves i  $n = 10$  ancians.

En la **taula 8** s'observen les principals variables demogràfiques i clíniques dels pacients escollits per determinar l'augment del contingut de calci en els mitocondris cardíacs humans durant l'envelliment.

| Edat<br>n=número de pacients | < 75 anys<br>10 | ≥ 75 anys<br>10 | p valor |
|------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| Edat (anys) (SEM)            | 62 (6)          | 79 (3)          | <0,0001 |
| Homes n (%)                  | 6 (60)          | 7 (70)          | 1       |
| Insuficiència cardíaca n (%) | 6 (60)          | 5 (50)          | 1       |
| Diabetis n (%)               | 4 (40)          | 2 (20)          | 0,628   |
| Hipertensió n (%)            | 7 (70)          | 8 (80)          | 1       |
| Hiperlipidèmia n (%)         | 5 (50)          | 3 (30)          | 0,650   |
| Fumador actiu n (%)          | 1 (10)          | 2 (20)          | 1       |

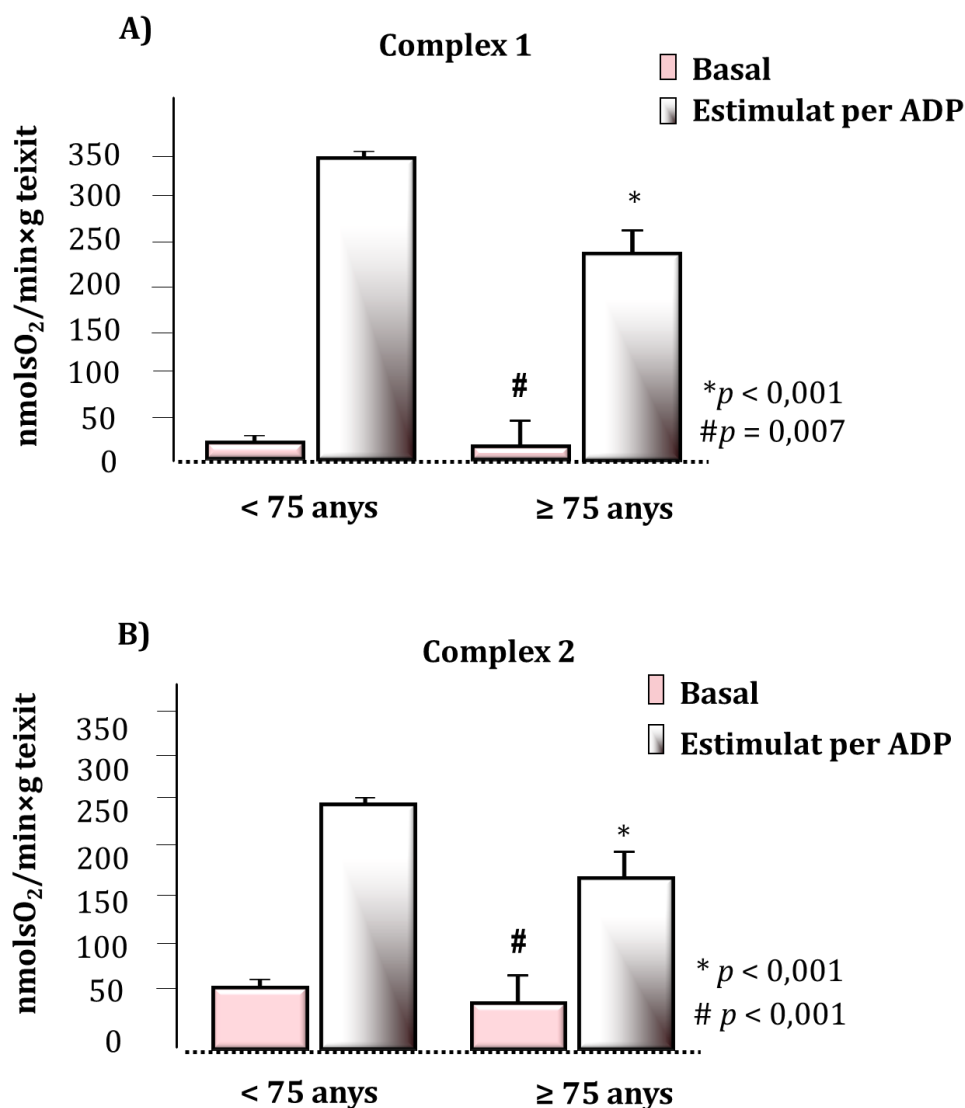
**Taula 8: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc cardiovascular dels pacients inclosos en l'estudi de l'augment del contingut de calci en els mitocondris cardíacs humans durant l'envelliment.** Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 10 pacients joves i n = 10 pacients ancians.

#### 5.2.3.2. Efecte de l'envelliment sobre el contingut mitocondrial i el consum d'oxigen en mitocondris cardíacs humans

Per investigar si l'augment del contingut de calci mitocondrial que s'observa durant l'envelliment té conseqüències sobre la quantitat de mitocondris i la seva funció respiratòria, es va avaluar el consum d'oxigen en els mitocondris, el rendiment mitocondrial (RM, mg proteïna/g teixit) i l'activitat CS (UCS/mg proteïna) del teixit miocàrdic de pacients joves i ancians.

La funció mitocondrial dels pacients joves (<75 anys) i ancians (≥ 75 anys) es va avaluar a partir del consum d'oxigen en situació basal, és a dir en presència de substrats del complex 1 (malat-glutamat) i del complex 2 (succinat + rotenona per inhibir el complex 1), així com en resposta a l'adició d'ADP, que correspon al consum d'oxigen mitocondrial màxim.

La capacitat aeròbica del miocardi, avaluada a partir de la respiració mitocondrial, va disminuir en els pacients ancians respecte als pacients joves. Els valors obtinguts de consum d'oxigen mitocondrial, en l'estat basal (E2) com en presència d'ADP (E3), durant la respiració mitocondrial mesurada amb l'oxímetre de tipus Clark, van ser menors en pacients de ≥ 75 anys que en pacients joves, sota l'estimulació de malat-glutamat (complex 1) ( $p = 0,007$ ) i ( $p < 0,001$ ), respectivament (**Figura 48-A**). Així com en presència de rotenona-succinat (complex 2) ( $p < 0,001$ ) ( $p < 0,001$ ), respectivament (**Figura 48-B**).



**Figura 48: Efecte de l'envelliment sobre la respiració mitocondrial en els mitocondris cardíacs humans.** Taxes de consum d'oxigen expressades com a nmolsO<sub>2</sub>/min x g teixit en l'estat basal i després d'estimular amb ADP utilitzant substrats del complex 1 (A) i complex 2 (B) en mitocondris cardíacs de pacients joves (< 75 anys) i ancians (≥ 75 anys). En mitocondris de pacients ancians s'obtingué una disminució del consum d'oxigen en estat basal i després d'estimular amb ADP tant en presència de substrats del complex 1 com del complex 2. Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 60 pacients joves i n = 35 pacients ancians.

Aquesta disminució de la capacitat respiratòria en el miocardi envellit humà esdevingué per una davallada en la massa mitocondrial, mesurada com a proteïna mitocondrial relativa al pes del teixit processat, així com a partir de l'activitat CS, un enzim exclusiu de la matriu mitocondrial (**Taula 9**).

El RM va ser significativament menor ( $p = 0,04$ ) en els pacients ancians respecte els pacients joves. L'activitat CS (indicador del número de mitocondris), també va ser

significativament menor ( $p < 0,001$ ) en el teixit miocàrdic de pacients ancians que en el teixit miocàrdic dels pacients joves (**Taula 9**).

|                           | Edat < 75 anys | Edat ≥ 75 anys | P valor p |
|---------------------------|----------------|----------------|-----------|
| <b>RM (mg/g teixit)</b>   | 3,7 ± 0,1      | 3,0 ± 0,2      | 0,04      |
| <b>CS (UCS/mg teixit)</b> | 1,6 ± 0,6      | 1,4 ± 0,4      | <0,001    |

UCS=  $\mu\text{mols TNB/min}$

**Taula 9: Determinació del RM i activitat CS.** RM, determinat com a mg de proteïna mitocondrial/ g teixit miocàrdic fresc i activitat CS expressat com a UCS/mg (UCS =  $\mu\text{mol TNB/min}$ ), en mitocondris de teixit auricular de pacients joves (< 75 anys) i ancians ( $\geq 75$  anys). El RM i l'activitat CS van ser significativament menors ( $p = 0,04$  i  $p < 0,001$ , respectivament) en els pacients ancians respecte els pacients joves. Dades expressades com a mitjana  $\pm$  ESM d'un total de  $n = 60$  pacients joves i  $n = 30$  pacients ancians.

Aquests resultats suggereixen que durant l'envelliment humà es produeix una reducció del número de mitocondris metabòlicament competents (és a dir, mitocondris que tenen la capacitat de respirar) tal i com indica la reducció de l'activitat CS, a diferència dels resultats observats en els ratolins vells ( $\geq 20$  mesos). Aquest fet fa que la capacitat aeròbica miocàrdica (consum d'oxigen mitocondrial per gram de miocardi) estigui disminuïda en els pacients ancians, en comparació als pacients joves, tant en el complex 1 com en el complex 2, en estat basal i després d'estimular amb ADP. En canvi si normalitzem les taxes de respiració pel número de mitocondris viable (es a dir, per l'activitat CS), ja no s'observen diferències en el consum d'oxigen entre els grups d'edat: fase 2:  $3,9 \pm 0,5$  vs  $5,1 \pm 1,2$  nmol  $\text{O}_2/\text{min} \times \text{CS}$  i fase 3:  $62,8 \pm 3,9$  vs  $56,4 \pm 2,4$  nmol  $\text{O}_2/\text{min} \times \text{CS}$ ,  $p = \text{ns}$ , en pacients joves i ancians, respectivament.

En la **taula10** s'observen les principals variables demogràfiques i clíniques dels pacients escollits per determinar l'efecte de l'envelliment sobre el contingut mitocondrial i el consum d'oxigen en mitocondris cardíacs humans.

| <b>Edat<br/>n=número de pacients</b> | <b>&lt; 75 anys<br/>60</b> | <b>≥ 75 anys<br/>35</b> | <b>p valor</b> |
|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------|
| <b>Edat (anys) (SEM)</b>             | 60 (8)                     | 78 (3)                  | <0,0001        |
| <b>Homes (%)</b>                     | 83                         | 57                      | <0,01          |
| <b>Insuficiència cardíaca (%)</b>    | 57                         | 68                      | 0,251          |
| <b>Diabetis (%)</b>                  | 38                         | 23                      | 0,121          |
| <b>Hipertensió (%)</b>               | 71                         | 76                      | 0,558          |
| <b>Hiperlipidèmia (%)</b>            | 55                         | 44                      | 0,296          |
| <b>Fumador actiu (%)</b>             | 55                         | 18                      | <0,001         |

**Taula 10: Característiques clíniques, demogràfiques i factors de risc cardiovascular dels pacients inclosos en l'estudi de l'efecte de l'envelliment sobre el contingut mitocondrial i el consum d'oxigen en mitocondris cardíacs humans.** Dades expressades com a mitjana ± ESM d'un total de n = 60 pacients joves i n = 35 pacients ancians.

### 5.3. Resum global de resultats

1. L'envelliment s'associa a un augment de l'acúmulo dels AGE en el miocardi de ratolí i en el miocardi humà, detectat per Western blot, immunofluorescència, proteòmica diferencial i ELISA competitiu.
2. L'anàlisi individualitzat de les proteïnes cardíques glicades detectades per proteòmica, així com la quantificació per immunofluorescència del *pool* de proteïnes glicades en cardiomiòcits aïllats de ratolí, indica que una part significativa de l'acúmulo d'AGE que es produeix durant l'envelliment es localitza a l'espai intracel·lular dels cardiomiòcits.
3. L'activitat de la glixalasa (via de detoxificació dels precursors químics d'AGE) quantificada per la determinació espectrofotomètrica de la cinètica de formació del S-D-lactoil-glutatió en homogenats miocàrdics, es va trobar disminuïda tant en el miocardi de ratolins vells com en el miocardi de pacients ancians.
4. El contingut de glutatió, un cofactor de la glixalasa, es va trobar disminuït en el miocardi de ratolins vells i en el miocardi de pacients ancians.
5. A partir de l'anàlisi proteòmica diferencial es va identificar el RyR com una diana prominent de glicació en el miocardi dels ratolins vells. Específicament, es van trobar nivells significativament més elevats en els pèptids que contenen hidroximetil-OP a nivell de lisina (K) en la posició 4452 i 4603 de la seqüència peptídica del RyR.
6. L'augment de dany glicatiu en el RyR associat a l'envelliment es va corroborar per immunofluorescència simultània de RyR i AGE en cardiomiòcits aïllats de ratolí i per ELISA en vesícules aïllades de RS de teixit auricular de pacients joves (< 75 anys) i pacients ancians ( $\geq 75$  anys).
7. La glicació del RyR detectada durant l'envelliment es va associar a una fuga espontània de calci (*calcium leak*) des del RyR del RS quantificada fluorimètricament en cardiomiòcits aïllats i en vesícules de RS de cor de ratolí.
8. Es va detectar un augment significatiu del contingut de calci en els mitocondris cardíacs aïllats de ratolins vells a la subpoblació de mitocondris interfibril·lars, però no als mitocondris subsarcolemals. L'augment del contingut de calci mitocondrial associat a l'envelliment també es va observar en els mitocondris cardíacs dels pacients ancians.
9. Els mitocondris cardíacs dels ratolins vells van mostrar una reducció del consum màxim d'oxigen (en presència d'ADP) respecte els mitocondris de ratolins joves. Aquesta disminució de la capacitat respiratòria només es va detectar en els mitocondris interfibril·lars.
10. En els mitocondris cardíacs humans, l'envelliment es va associar a una disminució del *pool* mitocondrial cardíac.







## *Discussió general*

## 6. *Discussió general*

Els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren per primera vegada que durant l'envelliment el teixit miocàrdic desenvolupa una deficiència de la via de detoxificació depenent de Glo, que és el sistema endogen que tenen totes les cèl·lules de l'organisme per eliminar els intermediaris químics involucrats en la generació d'AGE. Aquesta deficiència de la via de la Glo sembla ser un marcador comú de l'envelliment cardíac, ja que s'ha trobat en el cor dels ratolins vells ( $\geq 20$  mesos) i en el teixit miocàrdic de pacients ancians ( $\geq 75$  anys). Com a conseqüència de la deficiència de la via de la Glo, es produeix un augment de la glicació intracel·lular, en particular en una de les proteïnes, el RyR. La glicació del RyR fa que el tancament d'aquest canal sigui defectuós, de manera que es produeix un alliberament no controlat de calci des del RS que acaba exposant als mitocondris a un excés de calci. Com a conseqüència, els mitocondris acumulen calci en el seu interior i perden la capacitat respiratòria necessària per generar energia de forma eficient.

Aquests resultats identifiquen un mecanisme fisiopatològic prèviament no conegut involucrat en l'envelliment cardíac, segons el qual les alteracions intracel·lulars produïdes per la glicació durant l'envelliment podrien facilitar la transició d'una cèl·lula sana i metabòlicament competent cap a un cardiomiòcit energèticament insuficient i explicar, al menys en part, l'augment de la vulnerabilitat del cor vell a desenvolupar insuficiència cardíaca, una condició que augmenta de forma exponencial a mesura que envellim i que constitueix una de les principals causes de mort i discapacitat en tots els països del món. La identificació d'aquest mecanisme molecular d'envelliment cardíac podria permetre el desenvolupament de tractaments encaminats a prevenir-ho.

### 6.1. **Acúmulo intracel·lular d'AGE en els cardiomiòcits vells**

Els resultats descrits en aquesta tesi mostren de forma consistent un augment d'AGE totals en teixit miocàrdic de ratolins vells i en teixit auricular de pacients ancians en comparació amb mostres d'individus joves, identificats a partir de diverses tècniques de detecció d'AGE basades en anticossos (Western blot, ELISA, immunofluorescència), i en espectroscòpia de masses, tècnica que no depèn dels anticossos.

En l'anàlisi per Western blot de proteïnes modificades per AGE, es va observar un augment de CML en homogenats de teixit miocàrdic de ratolins vells ( $> 20$  mesos). Aquest augment en el contingut de proteïnes glicades també es va observar en homogenats de teixit miocàrdic de pacients de  $\geq 75$  anys, a partir de l'anàlisi efectuat mitjançant un ELISA de tipus competitiu per CML desenvolupat en el nostre laboratori. Degut a què es van utilitzar mostres d'homogenats de teixit miocàrdic, aquests resultats no permeten saber quina és la localització de les proteïnes glicades (extracel·lulars o intracel·lulars) ni la seva identitat.

Per tal de diferenciar la distribució dels AGE es va utilitzar un marcatge immunofluorescent de les proteïnes intracel·lulars glicades en un model de cardiomiòcits aïllats. Els resultats obtinguts demostraven un augment de les proteïnes immunomarcades. El contingut intracel·lular de proteïnes glicades per MG en els cardiomiòcits de ratolins vells va ser major que l'obtingut en els cardiomiòcits joves. Paral·lelament, en col·laboració amb el laboratori de Química de proteïnes del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares del Instituto Carlos III (CNIC), Madrid, dirigit pel Dr. Jesús Vázquez es va avaluar l'efecte de l'envelliment sobre la quantitat de proteïnes miocàrdiques modificades per AGE mitjançant l'anàlisi massiva per proteòmica diferencial. L'anàlisi proteòmica realitzat a partir d'homogeneïtzats de teixit miocàrdic de ratolí va identificar un total de 268 pèptids modificats per glicació, corresponents a

100 proteïnes diferents. L'anàlisi quantitativa d'aquests pèptids va confirmar l'augment de l'abundància relativa de pèptids glicats en els homogeneïtzats dels ratolins vells. La majoria de glicacions identificades van ser a nivell de Lys, Arg i Trp i afectaven majoritàriament als pèptids pertanyents a proteïnes mitocondrials i contràctils. En conjunt, aquests resultats demostren un augment d'AGE intracel·lulars en cardiomiòcits durant l'envelliment. Aquests resultats s'han confirmat per tècniques complementàries i independents, per minimitzar les limitacions inherents a l'ús d'anticossos. Els anticossos contra AGE són difícils d'obtenir i sovint presenten reaccions creuades. La utilització de tècniques complementàries, inclosa la proteòmica, ha permès disminuir la taxa de resultats inespecífics.

L'acumulació d'AGE s'ha associat amb patologies cardíques específiques i amb el pronòstic de la seva evolució, com la insuficiència cardíaca (143), les arrítmies (158) i la malaltia coronària en pacients diabètics (159) i s'han proposat com a biomarcadors de malalties cardiovasculars (160). Kilhovd et al., han descrit que els AGE sèrics augmenten en els pacients amb diabetis de tipus 2 en comparació amb el grup control i aquest augment és major quan hi ha malaltia coronària. Els AGE circulants també s'han implicat en la mortalitat cardiovascular independentment de la diabetis (160). En un estudi poblacional realitzat en dones de 65 anys o més, es va determinar que els alts nivells de CML en plasma estaven positivament correlacionats amb el risc de mortalitat (160). Dins el context de les arrítmies, Raposeiras-Roubín et al., va demostrar que els nivells d'AGE fluorescents i RAGE soluble (sRAGE) en el plasma, van ser majors en els pacients amb fibril·lació auricular, independentment de la diabetis, i es van correlacionar amb les dimensions de l'aurícula, el que indica que la interacció AGE-RAGE pot tenir un paper important en la remodelació estructural aritmogènica de l'aurícula.

Hi ha poques evidències prèvies que demostrin la presència d'AGE en teixit miocàrdic. És important assenyalar que s'ha demostrat que la glicació de les fibres de col·lagen té importants conseqüències biològiques. Les cèl·lules s'adhereixen menys a les fibres de col·lagen glicat, la unió de proteoglicans al col·lagen glicat disminueix (161) i el col·lagen glicat activa els RAGE en les cèl·lules, el que juga un paper en les malalties vasculars (162) i les complicacions diabètiques (163). Donaldson et al., van observar AGE en el teixit miocàrdic humà procedent de biòpsies epicàrdiques, independentment de la presència de diabetis i hipertensió, propiciant no només un deteriorament de la funció miocàrdica, sinó també la hipertròfia dels cardiomiòcits (164). Nozynski et al., van descriure un augment dels AGE, observats mitjançant tinció immunohistoquímica en el sarcoplasma dels cardiomiòcits en pacients amb diabetis i en pacients amb insuficiència cardíaca sotmesos a transplantament cardíac (165). Es considera que molts dels efectes patològics dels AGE es generen a través de la seva unió als receptors específics de membrana de tipus RAGE (166). Així per exemple, s'ha observat una reducció del dany miocàrdic per isquèmia-reperfusió en ratolins RAGE - / - (167)(168). Bidasee et al. van observar un augment de la glicació, mitjançant espectrometria de masses, del RyR i el SERCA, en les vesícules de RS d'un model de rata diabètica, després de 2 setmanes de tractament amb insulina, el que significa que hi ha AGE intracel·lulars en el context de la diabetis (169)(170).

En aquesta tesi es demostra que els AGE s'acumulen durant l'envelliment en els cardiomiòcits, un resultat que s'ha obtingut en dues espècies diferents.

## 6.2. Dèficit de la via de la glioxalasa en el miocardi senescent

La Glo 1 es considera la principal via de detoxificació del MG (117); per tant una reducció de la seva activitat podria afavorir l'augment de la generació d'AGE a partir de MG. Un dels objectius d'aquesta tesi va ser avaluar l'efecte de l'envelliment sobre l'eficiència de la via de detoxificació depenent de Glo en el teixit miocàrdic murí i humà. Els resultats obtinguts

demostren que durant l'envelliment es produeix una disminució de l'activitat de la Glo 1, sense que es detectin canvis en la seva expressió però, presentant una disminució en l'abundància del seu coenzim glutatió en el teixit miocàrdic de ratolins vells i pacients de  $\geq 75$  anys.

Un pas crític per a la formació d'AGE és la generació d'intermediaris dicarbonílics, com el MG, producte altament tòxic que evoluciona ràpidament cap a la formació d'AGE i que es genera en gran quantitat durant la glucòlisi i l'autooxidació de la glucosa (121). S'anomena estrès dicarbonílic a l'acumulació anormal d'aquests metabòlits intermediaris amb efectes perniciosos sobre les cèl·lules, cosa que contribueix a la disfunció dels teixits en l'envelliment i la malaltia (171). Estudis previs demostren la presència d'estrès dicarbonílic durant l'envelliment en diferents organismes i òrgans humans (172), com per exemple en la lent ocular dels humans (173) i en la insuficiència renal (174), entre d'altres. La reducció de l'activitat de Glo 1 s'ha associat amb la gravetat de l'aterosclerosi dins el context de la diabetis (175). En aquest estudi s'observa una reducció de l'activitat Glo 1 quan es produeix un trencament de les plaques carotídies humanes. El vincle de l'estrès dicarbonílic amb l'envelliment es va observar en un estudi de genòmica funcional de la Glo 1 en un model més senzill d'animal, el nematode *C. Elegans* (CeGly). Morcos et al., demostraven que l'activitat de la Glo 1 es trobava significativament reduïda durant l'envelliment tot i que els nivells d'ARNm de la Glo 1 no van variar (128). Aquests autors van observar que la sobreexpressió de Glo 1 en el nematode disminuïa les modificacions post-transduccionals provocades per AGE i la producció de ROS mitocondrials durant la vida de l'animal (128). Posteriorment, Fleming et al. també van relacionar l'envelliment amb la disminució de l'activitat Glo 1. Per determinar les conseqüències fisiològiques que resulten dels nivells elevats de MG i la Glo 1 en l'envelliment, es va estudiar la curació de ferides en ratolins joves i vells. Es va trobar que els ratolins vells tenien una taxa significativament més lenta de curació de ferides en comparació amb els ratolins joves (176). Els resultats obtinguts estarien d'acord amb el concepte proposat per Rabbani et al., el qual suggereix que el dèficit de la via de la Glo afectaria al contingut de precursors d'AGE intracel·lulars afavorint el dany proteic (108). Posteriorment a l'obtenció d'aquests resultats, el nostre grup va demostrar que l'exposició crònica de cardiomiòcits HL-1 a un inhibidor farmacològic de la Glo 1 va ser capaç de recapitular l'augment de l'estrès glicatiu intracel·lular observat en els cardiomiòcits vells (177).

Un dels possibles mecanismes per explicar la disminució de l'activitat de la Glo 1 sense que es trobi alterada la seva expressió és que es produeixin canvis post-translacionals de l'enzim que afectin la seva activitat. Birkenmeier et al. demostren per primera vegada que l'activitat de Glo 1 es pot regular directament mitjançant una modificació oxidativa, és a dir, la glutationilació (178). En els nostres experiments, la disminució d'activitat Glo 1 no és conseqüència d'una disminució de la seva expressió en el teixit miocàrdic, ja que els resultats obtinguts per Western blot dels homogenats de teixit miocàrdic de ratolins i pacients, demostren que els nivells de proteïna es troben preservats durant l'envelliment. En un estudi previ es va demostrar que el knockdown de Glo 1 va causar una reducció significativa dels nivells de Glo 1 en extractes de teixit de ronyó, mentre que els nivells de la proteïna en extractes de cor i fetge no es van veure afectats. No obstant, l'activitat Glo 1 es va reduir significativament en tots els extractes d'òrgans, el que concorda bé amb les dades prèviament publicades per la mateixa soca de ratolins Glo1KD (179) i amb els resultats de la nostra tesi.

Els AGE s'han relacionat amb l'augment de l'estrès oxidatiu durant l'envelliment (97). Es considera que la relació entre AGE i ROS és bidireccional. Un dels mecanismes d'aquesta relació és degut a què l'esgotament dels antioxidant GSH i del NADPH poden intervenir en la disminució de les activitats in situ de la Glo 1 i per tant, augmentar les reaccions de glicació (180). Un altre mecanisme per el que els ROS augmenten la generació d'AGE és que alguns

dels intermediaris dicarbonílics precursors d'AGE es poden generar a partir de reaccions d'autooxidació de glucosa i peroxidació lipídica (181)(182). Els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren una reducció del contingut de GSH en els homogenats de miocardi senescent, tant en ratolí com en humà, que podria afectar a l'activitat de la via de la Glo, en ser un cofactor d'aquesta via, un efecte que s'afegiria a la disminució de la activitat enzimàtica determinada in vitro. La suma de la baixa activitat de Glo i la reducció dels nivells de glutatió provocaria una major acumulació d'adductes derivats del MG. Per altra part, l'estrès glicatiu també augmenta la generació de ROS. El mecanisme pel qual ho fan encara es confós, però es creu que poden activar el RAGE i aquesta activació es vincula amb l'augment de l'estrès oxidatiu. En conjunt, les reaccions d'oxidació i glicació segueixen una retroalimentació positiva que es coneix com estrès glicooxidatiu, un mecanisme que té probablement una gran rellevància en la fisiopatologia de l'envelliment (113).

### 6.3. Glicació del RyR en el miocardi envellit

En aquesta tesi hem demostrat la glicació del RyR en cardiomiòcits i vesícules aïllades de RS de ratolins joves i vells i en el teixit miocàrdic de pacients. En ratolí, aquests resultats es van obtenir mitjançant les tècniques de immunomarcatge fluorescent en cardiomiòcits aïllats, el marcatge per ELISA en vesícules aïllades de RS i la proteòmica diferencial a partir de teixit miocàrdic. En humans, l'augment de dany glicatiu del RyR associat a l'envelliment es va corroborar per ELISA utilitzant vesícules aïllades de RS de teixit auricular.

Entre les proteïnes intracel·lulars que poden ser diana de dany glicatiu, el RyR ocupa una posició prominent. Al voltant del 80 % de RyR és de domini citosòlic amb un alt contingut de residus cisteïna, arginina i lisina, fet que el fa susceptible a glicar-se (183)(184). El RyR té un paper fonamental en el cicle d'acoblament-excitació-contracció del cardiomiòcit, un procés depenent d'energia en forma d'ATP, molècula generada pel mitocondri sota l'estímul del calci alliberat pel RS, creant un *feedback* bioenergètic entre ambdós orgànuls (44)(48). Estudis previs realitzats per Bidasee et al. demostren que el RyR i el SERCA es troben més glicats durant la diabetis i que aquesta glicació es pot reduir després de 8 setmanes de tractament amb insulina. A diferència de l'estudi esmentat, en els nostres experiments, la glicació del RyR és va comprovar utilitzant vesícules aïllades de RS i no només cèl·lules intactes, i per tant, s'ha exclòs la contribució d'altres orgànuls. Per altra part, l'estudi de Bidasee et al. s'ha fet amb un model de diabetis on el metabolisme dels ratolins està farmacològicament modificat, una circumstància que no està present en els animals del nostre estudi, que no han estat manipulats i desenvolupen un envelliment fisiològic. Aquests resultats avalen el paper dels AGE intracel·lulars en la disfunció del maneig de calci en cardiomiòcits, tenint present que tant el context patològic, l'envelliment, com la diana molecular són diferents i per tant, no són extrapolables (169)(170). Estudis previs van observar que les propietats conformacionals del RyR s'han mostrat consistentment alterades al cor envellit, tot i que la majoria d'estudis no ha descrit canvis en l'expressió de la proteïna. Cooper et al. van utilitzar un model de cardiomiòcits aïllats de conills per posar a prova la hipòtesis que els canvis en l'homeòstasi del  $Ca^{2+}$  són causa de les modificacions post-translacionals del RyR, l'oxidació del tiol del RyR, i dels ROS derivats dels mitocondris, generats durant l'envelliment (57). A diferència dels nostres resultats, en l'estudi de Cooper et al. les modificacions observades no van ser degudes a la glicació del RyR. En un estudi publicat el 2008 per O'Brien, Ferguson, and Howlett (185) i dins el context d'isquèmia-reperfusió, els autors observen que hi ha un augment de l'acumulació de  $Ca^{2+}$  citosòlic en els cardiomiòcits durant la isquèmia i la reperfusió relacionat amb l'edat, el que pot explicar l'augment de la sensibilitat al dany per isquèmia i reperfusió del cor envellit (185). En

cardiomiòcits, i dins el context de la diabetis, es va observar que la glicació del RyR altera l'homeòstasi del calci, reduint la capacitat d'escurçament de les fibres miocàrdiques durant la sístole i contribuint al desenvolupament de la insuficiència cardíaca (169)(170). En tots aquests estudis previs no s'havia estudiat la relació entre la glicació del RyR en cardiomiòcits senescents i el seu paper dins el context de l'envelliment. Els resultats d'aquesta tesi demostren per primera vegada que el RyR es una dina de glicació durant l'envelliment en els cardiomiòcits, i que aquesta modificació posttranslacional altera les propietats de maneig del calci del RS abans de que es desenvolupi insuficiència cardíaca. Posteriorment a aquests resultats, el nostre grup va realitzar estudis amb cardiomiòcits HL-1 exposant-los a estrès de dicarbonílic, mitjançant un inhibidor de la Glo 1 (177). L'exposició dels cardiomiòcits HL-1 a estrès glicatiu va provocar, específicament, un augment de la glicació del RyR, confirmant la relació causa-efecte entre el dèficit de l'activitat Glo 1 i l'augment de la glicació del RyR. És important assenyalar que, tot i l'augment de l'estrès oxidatiu present en l'envelliment, els resultats actuals no avalen un factor causal de l'oxidació de RyR en la disfunció del RyR observada. Aquesta conclusió es basa en una profunda caracterització molecular utilitzant la proteòmica redox GELSILOX, que no va revelar cap augment estadístic del grau d'oxidació del RyR2 en el miocardi dels animals vells respecte als joves. No obstant això, aquestes dades no descarten la possibilitat que part del dany glicatiu observat en el RyR es vegi facilitat per l'excessiva producció de ROS.

#### 6.4. Efecte de la glicació del RyR sobre la comunicació RS-mitocondris

Els resultats d'aquesta tesi demostren que la glicació del RyR en el miocardi envellit s'associa a un augment de *calcium leak* a través del RyR. El *calcium leak* es va quantificar avaluant l'alliberament de calci des del RyR del RS en cardiomiòcits aïllats i en vesícules de RS de cor de ratolí, un model que permet descartar la possible contribució dels mitocondris o d'altres elements cel·lulars a la cinètica de calci. El *calcium leak* pot afavorir un augment sostingut del calci citosòlic en l'entorn pròxim a la zona d'intercomunicació entre el RS i els mitocondris i promoure la captació i acumulació del calci en la matriu mitocondrial.

La comunicació funcional i anatòmica entre el RS i els mitocondris ha sorgit com un concepte de gran rellevància biològica en una varietat de teixits, i més específicament en aquelles cèl·lules amb gran demanda energètica i canvis cíclics del calci intracel·lular com en els cardiomiòcits. El paper de la comunicació entre el RS i els mitocondris s'ha documentat àmpliament en el context cardiovascular (38). S'ha proposat que el RyR / IP3 del RS és connecta als mitocondris a través del VDAC utilitzant la xaperona citosòlica Grp75 (186). En les cèl·lules cardíques, aquesta estreta interconnexió permet una captació eficient del calci procedent del RS per part dels mitocondris. La disrupció d'aquesta comunicació s'ha associat a diverses malalties, com la insuficiència cardíaca, la diabetis i les arrítmies i pot tenir un paper en el dany per isquèmia-reperfusió miocàrdica (38). Estudis previs de Gutiérrez et al. han observat alteracions en la comunicació entre el RS i els mitocondris durant el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca i la seva transició a la insuficiència cardíaca (187). S'ha demostrat que la noradrenalina, un conegut inductor d'hipertròfia cardíaca, augmenta la distància mitjana entre el RS i els mitocondris, en un model de cardiomiòcit de rata, alterant el metabolisme cardíac i el maneig de  $Ca^{2+}$  (187). Tot i que les fuites de calci tenen un paper fisiològic important en la regulació del contingut de  $Ca^{2+}$  del RS, un *calcium leak* no controlat pot perjudicar la funció cardíaca (33). Els assaig d'immunofluorescència i lligadura de proximitat realitzats prèviament en el nostre grup van identificar una comunicació defectuosa entre el VDAC mitocondrial i el

RyR en els cardiomiòcits de cors envellits, juntament amb una alteració en la transferència de  $\text{Ca}^{2+}$  des del RS als mitocondris, malgrat una activitat preservada de l'uniportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (148). Aquestes evidències indiquen que la disrupció de la comunicació entre el RS i els mitocondris també pot contribuir en la disfunció cel·lular durant l'envelliment cardíac. Juntament amb els resultats observats en el nostre laboratori, en aquesta tesi proporcionem la primera evidència de la glicació del RyR, una de les proteïnes que fan de pont entre aquests dos orgànuls, per tant la glicació del RyR podria ser la causa de les propietats anòmales del RyR i la disrupció dels ponts entre el RS i els mitocondris en els cardiomiòcits senescents. A més l'augment del *calcium leak* espontani secundari a la glicació del RyR pot tenir conseqüències directes sobre els mitocondris.

Aquests resultats també suggereixen que la glicació del RyR pot ser la causa que provoca una major freqüència dels *sparks* de calci en els cardiomiòcits de ratolins vells descrita prèviament (148), un fet que ja s'havia observat en l'envelliment (188) i que pot tenir conseqüències funcionals perjudicials. En conjunt, aquests resultats indiquen que les conseqüències d'aquesta glicació són perjudicials per l'homeòstasi del calci intracel·lular alterant específicament el maneig del calci en el RS.

## 6.5. Acúmulo de calci i dany mitocondrial en el cor senescent

Els resultats d'aquesta tesi indiquen que l'augment de *calcium leak* dependent del RyR s'associa a un acúmulo del contingut de calci en els mitocondris cardíacs dels dos models estudiats, murí i humà, durant l'envelliment. En ratolins, l'augment del contingut de calci associat a l'envelliment es va detectar exclusivament en la subpoblació de mitocondris IF, sense que s'observessin canvis en els mitocondris SS. L'efecte de l'envelliment sobre el contingut de calci mitocondrial també es va poder observar en els mitocondris aïllats de miocardi de pacients de  $\geq 75$  anys. La diferència amb el model murí va ser que en l'apèndix de l'aurícula dreta dels pacients, la quantitat limitant de teixit disponible i, el més important, el fet de que aquest teixit era més fibrós, no ens va permetre poder realitzar els tractaments seqüencials per obtenir les dos subpoblacions mitocondrials per separat.

La captació de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es duu a terme principalment per el MCU (MCU) (189). Aquest uniportador és un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  altament selectiu, però amb baixa afinitat (190). Per tant, s'han de produir concentracions elevades de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic properes als mitocondris, pròximes al RyR, per induir l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (191)(192). Tant l'augment de la freqüència dels *sparks* de calci procedents del RyR observat en l'envelliment (148)(188)(59) com l'augment del *calcium leak* dependent del RyR secundari al dany glicatiu afavoreixen l'acumulació de calci en la interfase entre el RS i els mitocondris, exposant així a l'uniportador de calci mitocondrial a unes condicions que afavoreixen un augment de la seva activitat i l'acúmulo de calci en els mitocondris. Tot i que el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial és fonamental per regular l'activitat d'enzims del cicle de Krebs i, per tant, la taxa de generació d'ATP, una captació excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial s'ha associat amb disfunció cel·lular en cardiomiòcits de rata (48)(193). L'augment de calci en l'interior de la matriu mitocondrial desemboca en una disfunció mitocondrial, dificultant l'acoblament electroquímic entre la cadena de transport d'electrons i la producció d'ATP; en el cas de que aquest augment sigui molt alt i sostingut en el temps repercuteix negativament en el potencial de membrana mitocondrial, facilitant la sobreproducció de ROS i en última instància, la permeabilitat de la membrana mitocondrial i la inviabilitat de l'orgànul promovent un col·lapse energètic de l'orgànul (194)(195)(196). Els nostres resultats demostren que l'increment de calci observat a la matriu mitocondrial, en els ratolins vells i en els pacients d'edat avançada, podria explicar la menor tolerància dels cors envellits al dany per isquèmia-



reperfusió, a on la sobrecarrega de calci citosòlic desenvolupa un paper fonamental a la mort cel·lular (197)(30). A causa de que els mitocondris IF estan en estret contacte amb el RS, aquests resultats donen suport el concepte de disfunció mitocondrial mediada pel RS en els cors envellits. L'augment de la susceptibilitat a l'obertura del mPTP associada a l'envelliment es manifesta específicament en els mitocondris IF, en ple acord amb les observacions anteriors (71). Cal destacar que en el nostre estudi la quantificació del calci mitocondrial es va realitzar després de la lisi mitocondrial i la solubilització de la sal de calci de la matriu, i no mitjançant tècniques convencionals basades en la monitorització de la captació dinàmica de calci; per tant, els valors obtinguts reflecteixen la precipitació del calci mitocondrial atribuïble a l'exposició crònica al calci, en lloc dels canvis a curt termini induïts per les condicions experimentals. Un estudi publicat el 2015 per Santulli et al. va identificar l'elevat contingut de calci mitocondrial com el principal determinant de la fisiopatologia de la insuficiència cardíaca. Utilitzant un model murí d'infart de miocardi posterior, aquests autors van demostrar que la fuga de calci des del RyR del RS, provoca una sobrecarrega de calci mitocondrial, que té conseqüències negatives sobre la funció i la morfologia mitocondrial i afavoreix el desenvolupament de la disfunció contràctil en els cardiomiòcits i insuficiència cardíaca. Aquestes observacions són coherents amb el concepte de que l'acumulació excessiva de calci mitocondrial té conseqüències funcionals sobre l'eficiència respiratòria i la integritat dels mitocondris.

Per conèixer si l'envelliment afecta al contingut total de mitocondris a la funció mitocondrial en el miocardi vam determinar el rendiment mitocondrial (RM, mg proteïna/g teixit), l'activitat CS (UCS/mg proteïna) i el consum d'oxigen per gram de teixit en mitocondris aïllats de ratolins joves i vells i en pacients de  $< 75$  anys o  $\geq 75$  anys. Els resultats obtinguts demostren que l'augment de calci mitocondrial observat en els ratolins vells i pacients d'edat avançada es va associar a una reducció de la capacitat màxima del consum d'oxigen mitocondrial associat a la síntesi d'ATP (sota l'estímul de l'ADP) en la subpoblació de mitocondris IF aïllats de miocardi de ratolins vells i en mitocondris aïllats de pacients ancians, el que indica que la deficiència energètica mitocondrial depenent de l'edat es desenvolupa només en condicions d'estrès (consum màxim d'O<sub>2</sub> induït per ADP, augment de l'activitat contràctil) i implica la resposta bioenergètica mitocondrial de retroalimentació (regeneració de NADPH, taxa de control respiratori). En ratolins, aquesta ineficiència bioenergètica no pot atribuir-se a la reducció de la massa mitocondrial, que està preservada durant l'envelliment. En canvi, la reducció de la capacitat aeròbica sí que és atribuïble a la disminució del número total de mitocondris funcionals en el teixit miocàrdic dels pacients ancians.



# *Conclusió*

## 7. *Conclusió*

L'envelliment provoca un augment de la concentració d'AGE intracel·lulars en els cardiomiòcits promogut en part per una deficiència de la via de detoxificació dels precursors químics depenent de Glo 1 i del seu cofactor glutatió (estrès glicooxidatiu). El RyR és una de les proteïnes intracel·lulars que s'ha identificat com a diana molecular d'aquest estrès glicooxidatiu. La glicació del RyR té conseqüències funcionals sobre el maneig de calci del reticle sarcoplàsmic, detectades com un augment de la fuga espontània de calci o *calcium leak*. L'exposició crònica dels mitocondris a un excés de calci alliberat pel RS (amb qui forma unions anatòmiques i funcionals estretes), promou la captació i l'acúmulo de calci en el seu interior i afavoreix la disfunció mitocondrial i la reducció de la capacitat aeròbica del miocardi senescent.



## *Línies de futur*

## 8. *Línies de futur*

En aquesta tesi s'ha demostrat que la glicació és una causa important del dany espontani de les proteïnes en el cor durant l'envelliment que pot tenir conseqüències funcionals deletèries (51). Aquests resultats observats en el miocardi envellit estan en la línia del que s'ha descrit en altres òrgans, tal com trobem en publicacions prèvies on s'ha evidenciat que l'acúmulo d'AGE està involucrat en malalties de l'envelliment, incloses les malalties neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer i el Parkinson, la sarcopènia, la insuficiència renal, les cataractes, la malaltia de Huntington, i altres (198)(199). En aquest treball s'identifica un mecanisme fisiopatològic prèviament desconegut implicat en l'envelliment cardíac que pot afavorir la transició d'un cardiomiòcit sa cap a un cardiomiòcit deficient i augmentar la vulnerabilitat del cor a desenvolupar insuficiència cardíaca. Aquesta tesi també ha identificat una disminució de l'activitat d'un dels sistemes endògens de detoxificació d'AGEs (Glo-1) en el cor durant l'envelliment, que podria ser responsable, en part, de l'augment de les glicacions intracel·lulars. Aquests resultats obren diverses línies de futur que caldrà explorar.

En primer lloc, no totes les proteïnes que trobem en el nostre organisme són susceptibles de glicació, així com tampoc totes les glicacions tenen necessàriament conseqüències funcionals deletèries. Per tant, una possible línia de recerca que s'obra amb aquesta tesi és la identificació de les proteïnes cardíques que puguin estar més exposades al dany glicatiu i en les que la glicació pugui tenir conseqüències funcionals rellevants.

Per altra part, s'obre la possibilitat de buscar vies alternatives que permetin compensar la deficiència de la via de detoxificació endògena o afavorir l'eliminació dels AGEs un cop formats. S'han dut a terme diversos estudis amb l'objectiu d'impedir la formació d'AGE actuant sobre els precursors (com per exemple, l'ús de *scavengers* de compostos intermediaris, o mitjançant intervencions metabòliques que redueixin la concentració de glucosa o fructosa), intervencions que ajudin a pal·liar els seus efectes nocius (antioxidants) o utilitzant fàrmacs que trenquen els enllaços dicarbonílics un cop formats (*AGE breakers*), però per diverses raons no ben identificades fins ara no s'ha trobat cap estratègia suficientment eficaç (200). L'aminoguanidina (201) és una hidrazina nucleòfila i les seves propietats anti-AGE es basen en la seva capacitat per capturar alguns intermediaris dicarbonílics. No té efectes en les etapes més avançades de la glicació. Malgrat els seus possibles efectes en l'atenuació de diverses complicacions relacionades amb la diabetis i l'edat en models animals, el seu ús en la pràctica clínica és limitat a causa dels efectes adversos en els assaigs clínics amb pacients diabètics (200). Els *AGE breakers* també han estat proposats com una teràpia en contra de la formació dels AGE. S'han identificat substàncies químiques i enzims capaços de reconèixer i trencar els enllaços de la reacció de Maillard, com el Alagebrium chloride (ALT-711), entre altres i s'han provat en assajos clínics, a on s'han reportat resultats prometedors contra les complicacions cardiovasculars en la diabetis i l'envelliment, tot i que s'ha qüestionat la seva capacitat real per trencar els enllaços creuats de les proteïnes existents en els teixits (105). Atès que les etapes d'oxidació tenen una participació crucial en la formació de molts AGE, les substàncies amb propietats antioxidants o quelants dels metalls també poden tenir activitats anti-glicans (202). Una altra possible estratègia contra l'acumulació excessiva d'AGE podria ser l'ús de inhibidors dels RAGE, mitjançant siRNA (203), models genètics o antagonistes farmacològics. S'han demostrat els possibles efectes protectors dels siRAGE en diversos models de diabetis (204). L'ús de siRAGE ha demostrat tenir un efecte beneficiós en la cicatrització de les ferides de ratolins diabètics (205).

Un aspecte rellevant que mereix una investigació més detallada es l'estudi de la interrelació entre les oxidacions i les glicacions, ja que el seu potencial efecte sinèrgic no es coneix bé.

Una de les limitacions per actuar sobre els AGE és que la seva cinètica d'acumulació i els mecanismes que provoquen que s'acumulin, no es coneix bé. Aquesta manca de coneixement es veu afavorida per diverses raons i, és que els precursors químics dels AGE són múltiples i extremadament ubics i reactius, a més pot produir-se una acumulació anormal d'AGE en l'espai extra o intracel·lular, poden actuar sobre una multiplicitat de possibles objectius proteics amb un impacte funcional variable i els efectes nocius immediats dels AGE poden ser el resultat d'un dany proteic directe o de vies inflamàtores activades per receptors (112). Actualment, la mesura dels AGE encara no ha tingut un paper precís en la pràctica clínica, però s'ha demostrat la seva rellevància com a marcador per l'estratificació del risc d'algunes malalties cardiovasculars. Una major caracterització dels mecanismes moleculars responsables de la toxicitat mediada pels AGE proporcionarà importants indicis que permetin avançar en ~~sobre~~ el desenvolupament de noves estratègies per a la prevenció i el tractament d'aquestes malalties en el context de l'envelliment cardíac.





# *Bibliografia*

## 9. Bibliografía

1. Cornelissen G, Otsuka K. Chronobiology of Aging: A Mini-Review. *Gerontology*. 2017;63(2):118–28.
2. Vijg J, Kennedy BK. The Essence of Aging. *Gerontology*. 2016;62(4):381–5.
3. Bonsall MB. Longevity and ageing: appraising the evolutionary consequences of growing old. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2006 Jan;361(1465):119–35.
4. Xia X, Chen W, McDermott J, Han J-DJ. Molecular and phenotypic biomarkers of aging. *F1000Research*. 2017;6:860.
5. Wells JCK, Nesse RM, Sear R, Johnstone RA, Stearns SC. Evolutionary public health: introducing the concept. *Lancet*. 2017 Jul;390(10093):500–9.
6. Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med*. 2003 Jan;70(1):3–22.
7. Martínez-Sellés M, García de la Villa B, Cruz-Jentoft AJ, Teresa Vidán M, Gil P, Cornide L, et al. Coronary Artery Disease Centenarians and their hearts: A prospective registry with comprehensive geriatric assessment, electrocardiogram, echocardiography, and follow-up. *Am Heart J*. 2015;169:798-805.e2.
8. Vacante M, D'Agata V, Motta M, Malaguarnera G, Biondi A, Basile F, et al. Centenarians and supercentenarians: a black swan. Emerging social, medical and surgical problems. *BMC Surg*. 2012;12 Suppl 1(Suppl 1):S36.
9. Almeida AJPO de, Ribeiro TP, Medeiros IA de. Aging: Molecular Pathways and Implications on the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–19.
10. Freedman VA, Martin LG, Schoeni RF. Recent trends in disability and functioning among older adults in the United States: a systematic review. *JAMA*. 2002 Dec;288(24):3137–46.
11. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar;139(10):e56–528.
12. Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, et al. Forecasting the Future of Cardiovascular Disease in the United States. *Circulation*. 2011 Mar;123(8):933–44.
13. Kuller LH, Lopez OL, Mackey RH, Rosano C, Edmundowicz D, Becker JT, et al. Subclinical Cardiovascular Disease and Death, Dementia, and Coronary Heart Disease in Patients 80+ Years. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Mar;67(9):1013–22.
14. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2011 Update. *Circulation*. 2011 Feb;123(4):e18–209.
15. Roth GA. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet (London, England)*. 2017 Sep;390(10100):1260–344.

16. Kovacic JC, Moreno P, Nabel EG, Hachinski V, Fuster V. Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine Cellular Senescence, Vascular Disease, and Aging Part 2 of a 2-Part Review: Clinical Vascular Disease in the Elderly. 2011;
17. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJL, et al. Temporal Trends in Ischemic Heart Disease Mortality in 21 World Regions, 1980 to 2010. *Circulation*. 2014 Apr;129(14):1483–92.
18. Strait JB, Lakatta EG. Aging-Associated Cardiovascular Changes and Their Relationship to Heart Failure. *Heart Fail Clin*. 2012 Jan;8(1):143–64.
19. Ginneken V van. Are there any Biomarkers of Aging? *Biomarkers of the Brain*. *Biomed J Sci Tech Res*. 2017;1(1):1–15.
20. Dai D-F, Chen T, Johnson SC, Szeto H, Rabinovitch PS. Cardiac Aging: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jun;16(12):1492–526.
21. Dhalla NS, Rangi S, Babick AP, Zieroth S, Elimban V. Cardiac remodeling and subcellular defects in heart failure due to myocardial infarction and aging. *Heart Fail Rev*. 2012 Sep;17(4–5):671–81.
22. Fannin J, Rice KM, Thulluri S, Dornon L, Arvapalli RK, Wehner P, et al. Age-associated alterations of cardiac structure and function in the female F344xBN rat heart. *Age (Omaha)*. 2014 Aug;36(4):9684.
23. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 May;25(5):932–43.
24. Prêle CM, Reichelt ME, Mutsaers SE, Davies M, Delbridge LM, Headrick JP, et al. Insulin-like growth factor-1 overexpression in cardiomyocytes diminishes ex vivo heart functional recovery after acute ischemia. *Cardiovasc Pathol*. 2012 Jan;21(1):17–27.
25. Feridooni HA, Dibb KM, Howlett SE. How cardiomyocyte excitation, calcium release and contraction become altered with age. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Jun;83:62–72.
26. Shih H, Lee B, Lee RJ, Boyle AJ. The Aging Heart and Post-Infarction Left Ventricular Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jan;57(1):9–17.
27. Dorn GW, Molkentin JD. Manipulating Cardiac Contractility in Heart Failure. *Circulation*. 2004 Jan;109(2):150–8.
28. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science (80- )*. 2009 Apr;324(5923):98–102.
29. Sanchis D, Mayorga M, Ballester M, Comella JX. Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes [Internet]. Vol. 10, *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group; 2003 [cited 2020 Aug 20]. p. 977–86. Available from: [www.nature.com/cdd](http://www.nature.com/cdd)
30. Fernandez-Sanz C, Ruiz-Meana M, Castellano J, Miro-Casas E, Nuñez E, Inserte J, et al. Altered FoF1 ATP synthase and susceptibility to mitochondrial permeability transition pore during ischaemia and reperfusion in aging cardiomyocytes. *Thromb Haemost*. 2015 May;113(03):441–51.

31. Peart JN, Pepe S, Reichelt ME, Beckett N, See Hoe L, Ozberk V, et al. Dysfunctional survival-signaling and stress-intolerance in aged murine and human myocardium. *Exp Gerontol.* 2014 Feb;50:72–81.
32. North BJ, Sinclair DA. The Intersection Between Aging and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2012 Apr;110(8):1097–108.
33. Terentyev D, Györke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, et al. Redox Modification of Ryanodine Receptors Contributes to Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Leak in Chronic Heart Failure. *Circ Res.* 2008 Dec;103(12):1466–72.
34. Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, et al. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2008 Oct;80(1):30–9.
35. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of Oxidative Stress in Myocardial Hypertrophy and Failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Apr;34(4):379–88.
36. Marchi S, Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum–mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2014 Apr;1837(4):461–9.
37. Phillips MJ, Voeltz GK. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Feb;17(2):69–82.
38. Ruiz-Meana M, Fernandez-Sanz C, Garcia-Dorado D. The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res.* 2010 Oct;88(1):30–9.
39. Endo M. Calcium-Induced Calcium Release in Skeletal Muscle. *Physiol Rev.* 2009 Oct;89(4):1153–76.
40. Zhou L, Aon MA, Liu T, O'Rourke B. Dynamic modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks by mitochondrial oscillations in isolated guinea pig cardiomyocytes under oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Nov;51(5):632–9.
41. Maxwell JT, Blatter LA. A novel mechanism of tandem activation of ryanodine receptors by cytosolic and SR luminal Ca<sup>2+</sup> during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *J Physiol.* 2017 Jun;595(12):3835–45.
42. Zima A V., Bovo E, Mazurek SR, Rochira JA, Li W, Terentyev D. Ca handling during excitation–contraction coupling in heart failure. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2014 Jun;466(6):1129–37.
43. Chen, Csordás G, Jowdy C, Schneider TG, Csordás N, Wang W, et al. Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca(2+) crosstalk. *Circ Res.* 2012 Sep;111(7):863–75.
44. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature.* 2002 Jan;415(6868):198–205.
45. Janczewski AM, Lakatta EG. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling in systolic and diastolic heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev.* 2010 Sep;15(5):431–45.

46. Zima A V, Mazurek SR. Functional Impact of Ryanodine Receptor Oxidation on Intracellular Calcium Regulation in the Heart. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2016;171:39–62.
47. Xu A, Narayanan N. Effects of aging on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-cycling proteins and their phosphorylation in rat myocardium. *Am J Physiol Circ Physiol*. 1998 Dec;275(6):H2087–94.
48. Maack C, O'Rourke B. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol*. 2007 Sep;102(5):369–92.
49. Szalai G, Csordás G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnóczky G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J Biol Chem*. 2000 May;275(20):15305–13.
50. Yi M, Weaver D, Hajnóczky G. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol*. 2004 Nov;167(4):661–72.
51. Brownlee, M.D M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*. 1995 Feb;46(1):223–34.
52. Rabbani N, Thornalley PJ. Europe PMC Funders Group Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress Protein glycation Protein glycation in physiological systems is prevented and repaired by components of the. *Biochem Soc Trans*. 2009;36(Pt 5):1045–50.
53. Simm A. Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *J Proteomics*. 2013 Oct;92:248–59.
54. Zhang JZ, Waddell HM, Jones PP. Regulation of RYR2 by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015 Jun;42(6):720–6.
55. Dulhunty AF, Beard NA, Hanna AD. Regulation and dysregulation of cardiac ryanodine receptor (RyR2) open probability during diastole in health and disease. Vol. 140, *Journal of General Physiology*. 2012. p. 87–92.
56. Bassani RA, Bers DM. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 1995 May;68(5):2015–22.
57. Cooper LL, Li W, Lu Y, Centracchio J, Terentyeva R, Koren G, et al. Redox modification of ryanodine receptors by mitochondria-derived reactive oxygen species contributes to aberrant Ca<sup>2+</sup> handling in ageing rabbit hearts. *J Physiol [Internet]*. 2013 Dec [cited 2020 Oct 2];591(23):5895–911. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24042501/>
58. Domeier TL, Roberts CJ, Gibson AK, Hanft LM, McDonald KS, Segal SS. Dantrolene suppresses spontaneous Ca<sup>2+</sup> release without altering excitation-contraction coupling in cardiomyocytes of aged mice. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2014 Sep;307(6):H818–29.
59. Howlett SE, Grandy SA, Ferrier GR. Calcium spark properties in ventricular myocytes are altered in aged mice. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2006 Apr;290(4):H1566–74.
60. Piacentino V, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, et al. Cellular Basis of Abnormal Calcium Transients of Failing Human Ventricular Myocytes. *Circ Res*. 2003 Apr;92(6):651–8.

61. Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res.* 2012 Jun;110(12):1646–60.
62. Steenman M, Lande G. Cardiac aging and heart disease in humans. Vol. 9, *Biophysical Reviews.* Springer Verlag; 2017. p. 131–7.
63. Lipskaia L, Keuylian Z, Blirando K, Mougnot N, Jacquet A, Rouxel C, et al. Expression of sarco (endo) plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) system in normal mouse cardiovascular tissues, heart failure and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Nov;1843(11):2705–18.
64. Luo M, Anderson ME. Mechanisms of Altered Ca<sup>2+</sup> Handling in Heart Failure. *Circ Res.* 2013 Aug;113(6):690–708.
65. Herraiz-Martínez A, Álvarez-García J, Llach A, Molina CE, Fernandes J, Ferrero-Gregori A, et al. Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes. *Cardiovasc Res.* 2015 Apr;106(1):76–86.
66. Guo X-H, Li Y-H, Zhao Y-S, Zhai Y-Z, Zhang L-C. Anti-aging effects of melatonin on the myocardial mitochondria of rats and associated mechanisms. *Mol Med Rep.* 2017 Jan;15(1):403–10.
67. Hollander JM, Thapa D, Shepherd DL. Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 Jul;307(1):H1-14.
68. Hoppel CL, Tandler B, Fujioka H, Riva A. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. Vol. 41, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2009. p. 1949–56.
69. Wideman TH, Zautra AJ, Edwards RR. NIH Public Access. 2014;154(11):2262–5.
70. Panel M, Ghaleh B, Morin D. Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore? Vol. 17, *Aging Cell.* Blackwell Publishing Ltd; 2018.
71. Hofer T, Servais S, Seo AY, Marzetti E, Hiona A, Upadhyay SJ, et al. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: Effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2009 May [cited 2020 Dec 14];130(5):297–307. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19428447/>
72. Rosca MG, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2013 Sep;18(5):607–22.
73. Lu X, Thai PN, Lu S, Pu J, Bers DM. Intrafibrillar and perinuclear mitochondrial heterogeneity in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2020 Mar 25];136:72–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31491377>
74. Adhietty PJ, Ljubicic V, Menzies KJ, Hood DA. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *AJP Cell Physiol.* 2005 May;289(4):C994–1001.
75. Bruce JIE, Giovannucci DR, Blinder G, Shuttleworth TJ, Yule DI. Modulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Signaling Dynamics and Metabolism by Perinuclear Mitochondria in Mouse Parotid Acinar Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Mar 26 [cited 2020 Jul

- 20];279(13):12909–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14699167/>
76. Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C, Holmuhamedov EL, Terzic A. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Jul 23 [cited 2020 Jul 20];99(15):10156–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12119406/>
  77. Kuzmicic J, Del Campo A, López-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, et al. Mitochondrial dynamics: A potential new therapeutic target for heart failure. Vol. 64, *Revista Espanola de Cardiologia*. Ediciones Doyma, S.L.; 2011. p. 916–23.
  78. Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL. Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ Res*. 2016 May;118(10):1593–611.
  79. Bratic A, Larsson N-G. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest*. 2013 Mar;123(3):951–7.
  80. Davidson SM. A needle in a haystack: focus on “Proteomic alterations of distinct mitochondrial subpopulations in the type 1 diabetic heart.” *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2011 Feb;300(2):R183–5.
  81. Foskett JK, Philipson B. The mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter complex. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Jan;78:3–8.
  82. Kovács-Bogdán E, Sancak Y, Kamer KJ, Plovovich M, Jambhekar A, Huber RJ, et al. Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun;111(24):8985–90.
  83. Kohlhaas, Michael and Maack C. Interplay of defective excitation-contraction coupling, energy starvation, and oxidative stress in heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 2011 Apr;21(3):69–73.
  84. Hajnóczky G, Csordás G, Madesh M, Pacher P. The machinery of local Ca<sup>2+</sup> signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol*. 2000;529(1):69–81.
  85. García-Pérez C, Hajnóczky G, Csordás G. Physical coupling supports the local Ca<sup>2+</sup> transfer between sarcoplasmic reticulum subdomains and the mitochondria in heart muscle. *J Biol Chem*. 2008;283(47):32771–80.
  86. Min CK, Yeom DR, Lee K-E, Kwon H-K, Kang M, Kim Y-S, et al. Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca<sup>2+</sup> transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart. *Biochem J*. 2012;447(3):371–9.
  87. Dorn GW, Maack C. SR and mitochondria: Calcium cross-talk between kissing cousins. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Feb;55:42–9.
  88. Nickel A, Löffler J, Maack C. Myocardial energetics in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2013 Jul;108(4):358.
  89. Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol*. 2006 Mar;571(Pt 2):253–73.
  90. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Miró-Casas E, Abellán A, Soler-Soler J. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during simulated ischemia does not affect permeability



- transition pore opening upon simulated reperfusion. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2020 Mar 25];71(4):715–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860295>
91. Copeland DE, Dalton AJ. An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J Biophys Biochem Cytol*. 1959 May;5(3):393–6.
  92. Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*. 1990 May;265(13):7248–56.
  93. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science*. 1998 Jun;280(5370):1763–6.
  94. Kohlhaas M, Nickel AG, Maack C. Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *J Physiol*. 2017;595(12):3753–63.
  95. Yoshikane H, Nihei T, Moriyama K. Three-dimensional observation of intracellular membranous structures in dog heart muscle cells by scanning electron microscopy. *J Submicrosc Cytol*. 1986 Oct;18(4):629–36.
  96. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Agulló E, Garcia-Dorado D. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2009 Oct;297(4):H1281–9.
  97. Brownlee M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med*. 1995 Aug;18(4):275–81.
  98. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced Glycation End Products. *Circulation*. 2006 Aug;114(6):597–605.
  99. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec;414(6865):813–20.
  100. Peppas M, Brem H, Ehrlich P, Zhang J-G, Cai W, Li Z, et al. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. *Diabetes*. 2003 Nov;52(11):2805–13.
  101. Smit AJ, Lutgers HL. The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Curr Med Chem*. 2004 Oct;11(20):2767–84.
  102. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens*. 2003 Jan;21(1):3–12.
  103. Fournet M, Bonté F, Desmoulière A. Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. *Aging Dis*. 2018 Oct;9(5):880–900.
  104. Hegab Z, Gibbons S, Neyses L, Mamas MA. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiol*. 2012 Apr;4(4):90.
  105. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res* [Internet]. 2003 Apr 18 [cited 2020 Oct 27];92(7):785–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12623881/>

106. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014;2:411–29.
107. Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KAM. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci.* 2011 Jul;121(2):43–55.
108. Rabbani N and PJT. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar;458(2):221–6.
109. Maillard L.C. Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique. *Comptes R Acad Sci.* 1912;154:66–8.
110. Thornalley PJ. Glycation free adduct accumulation in renal disease: the new AGE. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2020 Mar 25];20(11):1515–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133053>
111. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014 Feb;18(1):1–14.
112. Fukami K, Yamagishi S-I, Okuda S. Role of AGEs-RAGE system in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2014;20(14):2395–402.
113. Abordo EA, Minhas HS, Thornalley PJ. Accumulation of  $\alpha$ -oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1999 Aug 15 [cited 2020 Mar 24];58(4):641–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000629529900132X>
114. Kuhla B, Luth H-J, Haferburg D, Boech K, Arendt T, Münch G. Methylglyoxal, Glyoxal, and Their Detoxification in Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1043(1):211–6.
115. Byun K, Yoo YC, Son M, Lee J, Jeong GB, Park YM, et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 2017;177:44–55.
116. Kalapos MP. Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. *Drug Metabol Drug Interact.* 2008;23(1–2):69–91.
117. Rabbani N, Thornalley PJ. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* [Internet]. 2012 Apr [cited 2020 Mar 25];42(4):1133–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20963454>
118. Chaplen FW, Fahl WE, Cameron DC. Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(10):5533–8.
119. Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol.* 1996 Jun;27(4):565–73.
120. Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J.* 2003 Nov;375(Pt 3):581–92.
121. Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front Neurosci.* 2015 Feb;9:23.

122. Kielhorn J, United Nations Environment Programme., International Labour Organisation., Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals., World Health Organization., International Program on Chemical Safety. Glyoxal. World Health Organization; 2004. 43 p.
123. Loeppky RN, Ye Q, Goelzer P, Chen Y. DNA adducts from N-nitrosodiethanolamine and related beta-oxidized nitrosamines in vivo: (32)P-postlabeling methods for glyoxal- and O(6)-hydroxyethyldeoxyguanosine adducts. *Chem Res Toxicol.* 2002 Apr;15(4):470–82.
124. Dakin BH, Dudley HW. AN ENZYME CONCERNED WITH THE FORMATION OF HYDROXY ACIDS FROM KETONIC ALDEHYDES.
125. Racker E. The mechanism of action of glyoxalase. *J Biol Chem.* 1951 Jun;190(2):685–96.
126. Xue M, Rabbani N, Thornalley PJ. Glyoxalase in ageing. *Semin Cell Dev Biol.* 2011 May;22(3):293–301.
127. Distler MG, Palmer AA. Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. *Front Genet.* 2012;3:250.
128. Morcos M, Du X, Pfisterer F, Hutter H, Sayed AAR, Thornalley P, et al. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 2008 Apr;7(2):260–9.
129. Morgenstern J, Fleming T, Schumacher D, Eckstein V, Freichel M, Herzig S, et al. Loss of Glyoxalase 1 Induces Compensatory Mechanism to Achieve Dicarbonyl Detoxification in Mammalian Schwann Cells. *J Biol Chem.* 2017 Feb;292(8):3224–38.
130. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Nov;419(1):31–40.
131. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. Vol. 30, *Molecular Aspects of Medicine.* 2009. p. 191–296.
132. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. Vol. 5, *Biomolecules.* MDPI AG; 2015. p. 194–222.
133. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul 1;11(3):298–300.
134. Harman D. The Biologic Clock: The Mitochondria? *J Am Geriatr Soc [Internet].* 1972 [cited 2020 Jul 27];20(4):145–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5016631/>
135. Kujoth CC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science (80- ) [Internet].* 2005 Jul 15 [cited 2020 Jul 27];309(5733):481–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020738/>
136. Yui R, Ohno Y, Matsuura ET. Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet Syst [Internet].* 2003 Jun [cited 2020 Jul 27];78(3):245–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12893966/>

137. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.* 2004 Oct 1;125(10-11 SPEC. ISS.):811–26.
138. Caro Martín P, Caro Martín P. Restricción de metionina y de dieta en relación con el estrés oxidativo en mamíferos de laboratorio. 2009 May 4;
139. Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging. Vol. 110, *Circulation Research. Circ Res*; 2012. p. 1109–24.
140. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation [Internet]. Vol. 47, *Free Radical Research*. 2013 [cited 2020 Mar 24]. p. 3–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23767955>
141. Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. Vol. 4, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2015. p. 180–3.
142. Wu C-H, Huang S-M, Lin J-A, Yen G-C. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct.* 2011 May;2(5):224.
143. Hartog JW, Voors AA, Bakker SJL, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail.* 2007 Dec;9(12):1146–55.
144. Rauniyar N, Yates JR. Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. *J Proteome Res.* 2014 Dec;13(12):5293–309.
145. Martínez-Bartolomé S, Navarro P, Martín-Maroto F, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Villar M, et al. Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Jun;7(6):1135–45.
146. Martínez-Acedo P, Núñez E, Gómez FJS, Moreno M, Ramos E, Izquierdo-Álvarez A, et al. A novel strategy for global analysis of the dynamic thiol redox proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Sep;11(9):800–13.
147. Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J, et al. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest.* 1998 Mar;101(5):1142–7.
148. Fernandez-Sanz C, Ruiz-Meana M, Miro-Casas E, Nuñez E, Castellano J, Loureiro M, et al. Defective sarcoplasmic reticulum–mitochondria calcium exchange in aged mouse myocardium. *Cell Death Dis.* 2014 Dec;5(12):e1573–e1573.
149. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969 Mar;27(3):502–22.
150. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1830(5):3143–53.
151. Shapiro Fira SN. Rapid and accurate determination of d- and l-lactate, lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Applications in food quality control. *Food chemistry*. Applied Science Publishers; 2010.
152. Grunwald R, Meissner G. Luminal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem.* 1995

- May;270(19):11338–47.
153. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May;72:248–54.
  154. Srere PA, Brooks GC. The circular dichroism of glucagon solutions. *Arch Biochem Biophys.* 1969 Feb;129(2):708–10.
  155. Santulli G, Xie W, Reiken SR, Marks AR. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Sep;112(36):11389–94.
  156. Buongiorno AM, Sagratella E, Morelli S, Di Virgilio A, Sensi M. Advanced glycosylation end product quantification: differently produced polyclonal antisera do not share the recognition of epitopes of different nature. *Ann Ist Super Sanita.* 2002;38(4):393–9.
  157. Hassouna A, LOUBANI M, MATATA B, FOWLER A, STANDEN N, GALINANES M. Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb;69(2):450–8.
  158. Raposeiras-Roubín S, Rodiño-Janeiro BK, Grigorian-Shamagian L, Seoane-Blanco A, Moure-González M, Varela-Román A, et al. Evidence for a role of advanced glycation end products in atrial fibrillation. *Int J Cardiol* [Internet]. 2012 Jun 14 [cited 2020 Oct 1];157(3):397–402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21652096/>
  159. Kilhovd BK, Berg TJ, Birkeland KI, Thorsby P, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care* [Internet]. 1999 Sep [cited 2020 Oct 1];22(9):1543–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10480523/>
  160. Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Beck J, Dalal M, Varadhan R, et al. Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women. *Aging Clin Exp Res* [Internet]. 2009 [cited 2020 Oct 1];21(2):182–90. Available from: [/pmc/articles/PMC2684987/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18348167/)
  161. Reigle KL, Di Lullo G, Turner KR, Last JA, Chervoneva I, Birk DE, et al. Non-enzymatic glycation of type I collagen diminishes collagen-proteoglycan binding and weakens cell adhesion. *J Cell Biochem* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2020 Dec 22];104(5):1684–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18348167/>
  162. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: A review [Internet]. Vol. 44, *Diabetologia*. *Diabetologia*; 2001 [cited 2020 Dec 22]. p. 129–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11270668/>
  163. Kang R, Loux T, Tang D, Schapiro NE, Vernon P, Livesey KM, et al. The expression of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is permissive for early pancreatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2020 Dec 22];109(18):7031–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22509024/>
  164. Donaldson C, Taatjes DJ, Zile M, Palmer B, VanBuren P, Spinale F, et al. Combined immunoelectron microscopic and computer-assisted image analyses to detect advanced glycation end-products in human myocardium. *Histochem Cell Biol.* 2010 Jul;134(1):23–30.
  165. Nozynski J, Zakliczynski M, Konecka-Mrowka D, Zielinska T, Zakliczynska H, Nikiel

- B, et al. Advanced glycation end product accumulation in the cardiomyocytes of heart failure patients with and without diabetes. *Ann Transplant*. 2012;17(2):53–61.
166. Hegab Z, Mohamed TMA, Stafford N, Mamas M, Cartwright EJ, Oceandy D. Advanced glycation end products reduce the calcium transient in cardiomyocytes by increasing production of reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Open Bio* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2020 Dec 10];7(11):1672–85. Available from: [/pmc/articles/PMC5666397/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
167. Aleshin A, Ananthkrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, et al. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2020 Dec 22];294(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18245563/>
168. Bucciarelli LG, Kaneko M, Ananthkrishnan R, Harja E, Lee LK, Hwang YC, et al. Receptor for advanced-glycation end products: Key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation* [Internet]. 2006 Mar [cited 2020 Dec 22];113(9):1226–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16505177/>
169. Bidasee KR, Nallani K, Yu Y, Cocklin RR, Zhang Y, Wang M, et al. Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. *Diabetes* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2020 Nov 12];52(7):1825–36. Available from: <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/52/7/1825>
170. Bidasee KR, Zhang Y, Shao CH, Wang M, Patel KP, Dincer UD, et al. Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Diabetes*. 2004 Feb;53(2):463–73.
171. Rabbani, Naila and PJT. Glyoxalase centennial conference: Introduction, history of research on the glyoxalase system and future prospects. In: *Biochemical Society Transactions* [Internet]. Portland Press Ltd; 2014 [cited 2020 Nov 14]. p. 413–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24646253/>
172. Rabbani N and PJT. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc* [Internet]. 2014 [cited 2020 Dec 7];9(8):1969–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25058644/>
173. Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J, Franke S, Strobel J, Stein G, et al. Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolone Advanced Glycation End-Products of Human Lens Proteins. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2003 Dec [cited 2020 Dec 7];44(12):5287–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14638728/>
174. Rabbani N, Thornalley PJ. Dicarbonyls (Glyoxal, Methylglyoxal, and 3-Deoxyglucosone). In: *Uremic Toxins* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012 [cited 2020 Dec 7]. p. 177–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118424032.ch12>
175. Hanssen NMJ, Wouters K, Huijberts MS, Gijbels MJ, Sluimer JC, Scheijen JLJM, et al. Higher levels of advanced glycation endproducts in human carotid atherosclerotic plaques are associated with a rupture-prone phenotype. *Eur Heart J*. 2014 May;35(17):1137–46.
176. Fleming TH, Theilen TM, Masania J, Wunderle M, Karimi J, Vittas S, et al. Aging-dependent reduction in glyoxalase 1 delays wound healing. *Gerontology* [Internet]. 2013

- Aug [cited 2020 Nov 16];59(5):427–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23797271/>
177. Ruiz-Meana M, Minguet M, Bou-Teen D, Miro-Casas E, Castans C, Castellano J, et al. Ryanodine Receptor Glycation Favors Mitochondrial Damage in the Senescent Heart. *Circulation* [Internet]. 2019 Feb 12 [cited 2020 Dec 28];139(7):949–64. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035869>
  178. Birkenmeier G, Stegemann C, Hoffmann R, Gü Nther R, Huse K, Birkemeyer C. Posttranslational Modification of Human Glyoxalase 1 Indicates Redox-Dependent Regulation. 2010 [cited 2020 Dec 24]; Available from: [www.plosone.org](http://www.plosone.org)
  179. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* [Internet]. 2008 Sep 29 [cited 2020 Oct 23];205(10):2409–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18809715/>
  180. Wautier J-L, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res*. 2004 Aug;95(3):233–8.
  181. Santos AC, Uyemura SA, Lopes JLC, Bazon JN, Mingatto FE, Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 1998 Jun [cited 2020 Dec 24];24(9):1455–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9641263/>
  182. Wang XJ, Wang ZB, Xu JX. Effect of salvianic acid A on lipid peroxidation and membrane permeability in mitochondria. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2005 Mar 21 [cited 2020 Dec 24];97(3):441–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15740878/>
  183. Van Petegem F. Ryanodine receptors: Structure and function [Internet]. Vol. 287, *Journal of Biological Chemistry*. *J Biol Chem*; 2012 [cited 2020 Nov 23]. p. 31624–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22822064/>
  184. Efremov RG, Leitner A, Aebersold R, Raunser S. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2020 Oct 2];517(7532):39–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature13916>
  185. O’Brien JD, Ferguson JH, Howlett SE. Effects of ischemia and reperfusion on isolated ventricular myocytes from young adult and aged Fischer 344 rat hearts. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2008 May;294(5):H2174–83.
  186. Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J Cell Biol* [Internet]. 2006 Dec 18 [cited 2020 Dec 14];175(6):901–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17178908/>
  187. Gutiérrez T, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Contreras-Ferrat A, Vasquez-Trincado C, et al. Alteration in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2014 Dec 7 [cited 2020 Sep 30];12(1):68. Available from: <http://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-014-0068-4>
  188. Zhu X, Altschafli BA, Hajjar RJ, Valdivia HH, Schmidt U. Altered Ca<sup>2+</sup> sparks and gating properties of ryanodine receptors in aging cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2005

- Jun;37(6):583–91.
189. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 18 [cited 2020 Sep 30];476(7360):341–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21685886/>
  190. Santo-Domingo J, Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria [Internet]. Vol. 1797, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. *Biochim Biophys Acta*; 2010 [cited 2020 Sep 30]. p. 907–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20079335/>
  191. Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol*. 2000 Nov;529 Pt 1:37–47.
  192. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 2004 Jan 22;427(6972):360–4.
  193. Odagiri K, Katoh H, Kawashima H, Tanaka T, Ohtani H, Saotome M, et al. Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2009 Jun 1;46(6):989–97.
  194. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle [Internet]. Vol. 287, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. *Am J Physiol Cell Physiol*; 2004 [cited 2020 Dec 15]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15355853/>
  195. Brown DA, O'Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias [Internet]. Vol. 88, *Cardiovascular Research*. Oxford Academic; 2010 [cited 2020 Sep 30]. p. 241–9. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasres/article/88/2/241/345999>
  196. Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, de Marchi E, Marchi S, et al. Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine [Internet]. Vol. 12, *Mitochondrion*. Elsevier; 2012 [cited 2020 Sep 30]. p. 77–85. Available from: [/pmc/articles/PMC3281195/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22410257/)
  197. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inseste J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2012 May;94(2):168–80.
  198. Li J, Liu D, Sun L, Lu Y, Zhang Z. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective [Internet]. Vol. 317, *Journal of the Neurological Sciences*. *J Neurol Sci*; 2012 [cited 2020 Oct 27]. p. 1–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22410257/>
  199. Juranek J, Ray R, Banach M, Rai V. Receptor for advanced glycation end-products in neurodegenerative diseases [Internet]. Vol. 26, *Reviews in the Neurosciences*. Walter de Gruyter GmbH; 2015 [cited 2020 Oct 27]. p. 691–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26226128/>
  200. Reddy VP, Beyaz A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases [Internet]. Vol. 11, *Drug Discovery Today*. *Drug Discov Today*; 2006 [cited 2020 Dec 15]. p. 646–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16793534/>



- 
201. Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic Studies of Advanced Glycosylation End Product Inhibition by Aminoguanidine. *Diabetes* [Internet]. 1992 Jan 1 [cited 2020 Dec 15];41(1):26–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1727735/>
  202. Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW. Chelating Activity of Advanced Glycation End-product Inhibitors. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Dec 28 [cited 2020 Dec 15];276(52):48967–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11677237/>
  203. Hudson BI, Bucciarelli LG, Wendt T, Sakaguchi T, Lalla E, Qu W, et al. Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: A new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders [Internet]. Vol. 419, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc.; 2003 [cited 2020 Dec 15]. p. 80–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14568011/>
  204. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: Therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging [Internet]. Vol. 79, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2010 [cited 2020 Dec 15]. p. 1379–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20096667/>
  205. Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, et al. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* [Internet]. 2001 [cited 2020 Dec 15];159(2):513–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11485910/>