

Estudio de la mecánica de cardiomiocitos en cardiomiopatías.

Ilse Nallely Nava Candelaria^{1, 2, a}, Ángel Fernández-Trasancos², Jorge Alegre-Cebollada^b

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Mecánica Molecular del Sistema Cardiovascular, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, 28029 Madrid, España.

a. nallely.nava09@gmail.com b. jorge.alegre@cnic.es

Palabras clave: Cardiomiopatía; Sarcómero; Hipertrofia; cMyBP-C; Titina; AGEs

Resumen

Las cardiomiopatías genéticas o adquiridas constituyen una importante causa de muerte en personas de todas las edades. En su etiología, juegan un papel relevante mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas y modificaciones postraduccionales de las mismas. En el presente estudio se evaluaron propiedades mecánicas de cardiomiocitos individuales permeabilizados, en el contexto de dos formas de cardiomiopatía. Se logró una parte de la optimización de los ensayos de sensibilidad al calcio para posteriormente ser trasladados a un modelo murino de miocardiopatía hipertrófica con mutación puntual en la proteína C de unión a miosina (cMyBP-C). Esta mutación puntual en cMyBP-C (R502W) es la mutación más frecuente en miocardiopatía hipertrófica. Dentro de las cardiomiopatías adquiridas, se conoce que la presencia de productos avanzados de glicación (AGEs) podrían ser un factor que contribuya al desarrollo de cardiomiopatía diabética. De esta forma, se evaluó la rigidez de cardiomiocitos murinos expuestos a procesos de glicación, encontrando que el agente metilglioxal parece no tener efecto sobre el desarrollo de fuerza pasiva generada en los cardiomiocitos en nuestras condiciones experimentales.

Cita: Nava Candelaria, Ilse Nallely; Fernández-Trasancos, Ángel; Alegre-Cebollada, Jorge (2020) Estudio de la mecánica de cardiomiocitos en cardiomiopatías. *dianas* 9 (2): e202009fa12. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202009fa12](http://www3.uah.es/dianas?e202009fa12) <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa12>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Nava-Candelaria IN, Fernández-Trasancos, Alegre-Cebollada J. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Las cardiomiopatías son una de las primeras causas de insuficiencia cardíaca y muerte súbita, y afectan a gran parte de la población incluyendo jóvenes. Estas enfermedades del miocardio se han clasificado en distintas categorías: primarias (genéticas, mixtas o adquiridas) o secundarias que dan lugar a diferentes fenotipos: cardiomiopatía hipertrófica (HCM), dilatada (DCM) y restrictiva (RCM) [1-3].

La cardiomiopatía hipertrófica es probablemente la cardiomiopatía genética más común afectando a 1 de cada 500 individuos y caracterizada por engrosamiento de la pared del ventrículo izquierdo, alteraciones en la contracción cardíaca, fibrosis miocárdica y disfunción diastólica [4-6]. La etiología se ha atribuido principalmente a mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas, más del 50% se asocia a proteínas del filamento grueso: cadena pesada de la β -miosina (*MYH7*) y proteína C de unión a miosina (*MYBPC3*) [7, 4, 5, 8], mientras que otras mutaciones se han relacionado con proteínas del filamento delgado [9]. Dentro de las cardiomiopatías adquiridas se encuentra la cardiomiopatía diabética que surge como combinación de alteraciones metabólicas asociadas a diabetes mellitus. En este tipo de cardiomiopatía, se produce estrés oxidativo y activación de vías de señalización implicadas en inflamación, remodelación cardíaca y disfunción diastólica/sistólica [10]. La prevalencia de disfunción cardíaca en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y 2 se ha reportado cerca del 14.5% y 35% respectivamente [11].

El sarcómero es la unidad funcional del miocardio y se define como la región de miofilamento entre dos discos-Z, cuya distancia comprende entre 1.6 a 2.2 micrómetros (μm) [12]. Cada sarcómero está compuesto por filamentos altamente ordenados de actina, miosina y otras proteínas estructurales y reguladoras. Dentro de las proteínas estructurales se encuentra la proteína gigante titina que abarca la mitad del sarcómero y se extiende desde el disco-Z a la línea-M, asegurando la integridad del sarcómero y la rigidez/elasticidad del miocardio [13]. La proteína C de unión a miosina (cMyBP-C) es también una proteína sarcomérica del filamento grueso y se localiza en la zona-C de la banda-A, a ambos lados de la línea-M [12] (Figura 1).

En el miocardio normal, cMyBP-C tiene un papel regulador en el desarrollo de la contractilidad al actuar como una “cadena” que inhibe la interacción entre actina y miosina, modulando el movimiento de las cabezas de miosina [14, 15]. El 40% de las mutaciones relacionadas con el desarrollo de HCM se han descrito en esta proteína, donde los puentes cruzados al estar menos restringidos, promueven la liberación

y el desplazamiento radial de las cabezas de miosina más cerca de la actina. De este modo, se ha propuesto que las interacciones actina-miosina son mayores promoviendo la hipercontractilidad del músculo cardíaco [14, 16].

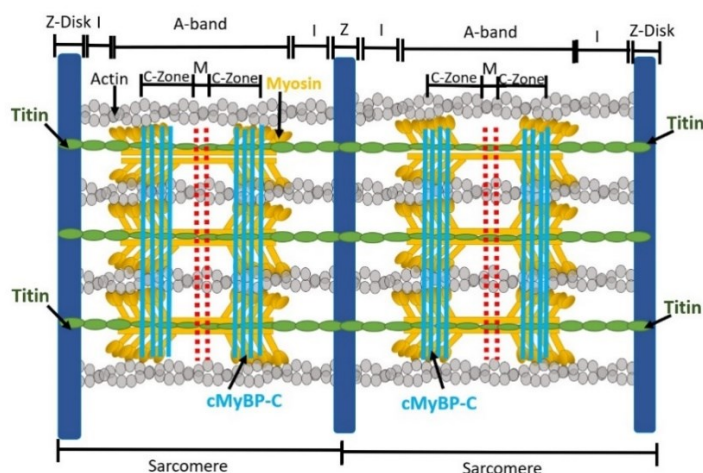


Figura 1.- Representación esquemática del sarcómero cardíaco y localización de proteínas estructurales cMyBP-C y titina. El sarcómero está limitado por los discos Z. Los polímeros de miosina forman la banda-A, miomesina forma la línea-M y cMyBP-C se localiza en la zona-C. La proteína titina se extiende desde la línea M hasta el disco-Z, se fija a miosina y en la región de la banda-A es inextensible [12]. La banda I forma un resorte donde la titina se extiende-acorta y produce fuerza pasiva durante la diástole cuando los sarcómeros se estiran.

La heterogeneidad genética y los distintos factores predisponentes de la miocardiopatía hipertrófica y cardiomiopatía diabética han dificultado definir mecanismos específicos en el desarrollo de la enfermedad. Modelos animales con mutaciones en cMyBP-C han mostrado un incremento en la sensibilidad al calcio como estímulo primario en el desarrollo de hipertrofia [9]. Debido a que el calcio es un importante modulador de la contracción y generación de fuerza en el miocardio [17], el presente estudio se centró en evaluar la sensibilidad al Ca^{+2} en cardiomiocitos como parámetro que permite analizar el proceso dinámico de contractilidad mediante la relación entre concentración de iones de calcio libres y la fuerza generada por cardiomiocitos. El objetivo último es el estudio de un modelo murino de miocardiopatía hipertrófica creado en el laboratorio del CNIC con una mutación puntual en cMyBP-C en la posición R502W, la más frecuente en humanos [18].

Las propiedades elásticas del miocardio están dadas en gran parte por la proteína titina que al distenderse-acortarse determina la longitud del sarcómero y la fuerza pasiva generada por los cardiomiocitos [19]. La fuerza pasiva en el músculo cardíaco es una propiedad mecánica que se desarrolla cuando el músculo es estirado más allá de su longitud basal siendo un determinante importante durante la relajación y el llenado ventricular [20]. Recientes estudios han demostrado que truncamientos en el gen de titina están relacionados con el desarrollo de cardiomiopatía dilatada (DCM) [21]. Recientemente se ha encontrado que pacientes diabéticos con fallo cardíaco han mostrado un fenotipo asociado a DCM y alteraciones en titina [10].

Se ha descrito que altos niveles de glucosa promueven la formación de productos finales de glicación (AGEs) en diversas proteínas [11]. En personas diabéticas el precursor principal es el metilglioxal (MG) un subproducto reactivo de la glucólisis que modifica los residuos de arginina y lisina, produciendo un daño estructural e irreversible en proteínas [22, 23]. Estudios han mostrado que niveles altos de metilglioxal contribuyen a la modificación de las proteínas actina y miosina en pacientes diabéticos [22]. Niveles altos de AGEs en pacientes diabéticos se ha señalado como factor causante de rigidez diastólica y fibrosis [10], sin embargo los mecanismos aún no están completamente descritos. Por otro lado, modificaciones postraduccionales en titina, particularmente cambios en la fosforilación se han asociado con el desarrollo de fallo cardíaco e incremento de la rigidez pasiva de cardiomiocitos [24]. Sin embargo, se desconoce si otras modificaciones como fenómenos de glicación en titina están relacionados con cambios en la rigidez del miocardio y desarrollo de la cardiomiopatía diabética. Por ello, proponemos la caracterización de las propiedades mecánicas pasivas de cardiomiocitos incubados con MG.

Materiales y métodos.

Modelo murino

El tejido cardíaco fue obtenido de corazones congelados procedentes de ratones C57BL/6 de 12 semanas de edad, que fueron congelados en nitrógeno líquido inmediatamente tras el sacrificio. Los tejidos fueron

preservados a -80°C hasta su uso. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con el comité bioético del CNIC y del Área de Protección Animal de la Comunidad de Madrid (PROEX 042/18).

Aislamiento de cardiomiocitos permeabilizados

El aislamiento y permeabilización de cardiomiocitos se realizó mediante disrupción mecánica y química realizando todos los procedimientos en frío para evitar la degradación del tejido según lo descrito previamente [24-26] con pequeñas modificaciones. Para ello se cortó un pequeño trozo de tejido ventricular y se procesó en tampón de aislamiento (Na_2ATP 7.8 mM (Pancreac AppliChem), imidazol 20 mM, EGTA 4 mM, propionato de magnesio 12 mM, propionato de potasio 97.6 mM e inhibidor de proteasas de acuerdo a las instrucciones del proveedor (VWR Life Science). Todos los reactivos proceden de Millipore Sigma salvo que se especifique otra casa comercial.

El tejido fue disgregado mecánicamente utilizando dos protocolos de homogenización y digestión con Tritón X-100 (Millipore Sigma). En el protocolo A se utilizó un ultraturrax (IKA T-10) a máxima velocidad (nivel 5: 25000 rpm) durante 6 segundos, homogenizando dos veces con 1 minuto de reposo en frío entre cada una. El producto homogenizado fue centrifugado a 2600 rpm, 4°C por 3 minutos y el sobrenadante fue eliminado cuidadosamente para descartar restos celulares. El pellet se incubó con Triton X-100 (0.5%) en tampón de relajación durante 7 minutos en frío seguido de otra centrifugación.

En el protocolo B se utilizó un ultraturrax (IKA T-18) a velocidad baja (nivel 4: 15000 rpm) durante 6 segundos, se centrifugó en las mismas condiciones y se testó una concentración más alta de Triton X-100 (1%) durante 7 minutos en frío. Las células obtenidas en ambos protocolos fueron lavadas 3 veces con tampón de relajación para descartar restos celulares, membranas y detergente. Las células fueron resuspendidas en tampón de relajación fresco y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Los cardiomiocitos obtenidos se utilizaron como máximo 48 horas tras su aislamiento.

Preparación de tampones de calcio

Para determinar el estado contráctil y sensibilidad al calcio de los cardiomiocitos, se diseñó el estudio de la relación fuerza-pCa. El pCa de una solución se conoce como el $-\log_{10}$ de la concentración de calcio libre en el medio ($\text{pCa} = -\log [\text{Ca}^{+2}]_{\text{libre}}$). Se estableció un rango de pCa a evaluar entre 5.25 y 6.28, según lo descrito bibliografía [16]. Los cálculos se realizaron en el programa informático (Maxchelator Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v2.2b constants from NIST database #46 v8, localizado en maxchelator.stanford.edu) basado en lo descrito por Fabiato, 1979 [27].

Se preparó un tampón de relajación (pCa 8.9) que contenía: EGTA 7mM, imidazol 20mM, KCl 106.5mM, CaCl_2 0.02mM, MgCl_2 5.42mM y Na_2ATP 4.76mM. También se preparó un tampón de activación (pCa 4.5) que contenía: EGTA 7mM, imidazol 20mM, KCl 93.95mM, CaCl_2 7.01 mM, MgCl_2 5.27mM y Na_2ATP 4.81mM. El pH de las soluciones stock de Ca^{+2} se ajustó a 7.0 con KOH 0.17N y la fuerza iónica total de las soluciones fue de 166 mM (Mamidi et al., 2018a). Finalmente, las diferentes soluciones con el pCa a evaluar (5.25-6.28), fueron preparadas mezclando proporciones adecuadas de volúmenes de los tampones stock de activación (pCa 4.5) y relajación (pCa 8.9) (Tabla 1). Las mezclas se prepararon a temperatura ambiente y se realizaron alícuotas que fueron almacenadas a -20°C para su posterior uso.

pCa	pCa4.5	pCa8.9
8.90	0	1,000
6.28	0,550	0,450
6.10	0,650	0,350
6.00	0,720	0,280
5.85	0,770	0,230
5.74	0,810	0,190
5.65	0,840	0,160
5.46	0,890	0,110
5.25	0,930	0,070
4.50	1,000	0

Tabla 1.- Proporciones utilizadas para preparar los diferentes tampones con pCa intermedios mezclando volúmenes exactos de tampón de activación (pCa 4.5) y tampón de relajación (pCa 8.9).

Para la preparación de los tampones stock de activación (pCa 4.5) y relajación (pCa 8.9) se consideraron ciertas condiciones especiales: (1) Utilizar agua mili-Q para minimizar la contaminación con Ca^{+2} y otros metales. (2) Todas las soluciones se prepararon y almacenaron en recipientes de plástico, evitando los recipientes de vidrio con el fin de evitar que el EGTA uniera Ca^{+2} del vidrio. (3) El pH se midió

cuidadosamente, teniendo en cuenta que al agregar CaCl_2 se liberan protones debido a la unión de Ca^{+2} al EGTA, pudiendo alterar el pH final y la fuerza iónica del tampón. Todas las soluciones se alicuotaron y congelaron a -20°C para evitar la degradación del ATP [28].

Fijación de cardiomiocitos y análisis en equipo *cardiomyocyte stretcher*

La caracterización mecánica de los cardiomiocitos se realizó con el sistema *cardiomyocyte stretcher 1600A Permeabilized Myocyte System* (Aurora Scientific Inc., Ontario, Canadá). Los procedimientos de fijación y mediciones de fuerza se realizaron como se ha descrito previamente [16, 20, 24-26]. El *cardiomyocyte stretcher* se montó sobre un microscopio invertido (Nikon TE300, con objetivos ELWD 10X Ph1 y 40X Ph2, condensador Nikon ELWD) en una mesa de aislamiento de vibraciones (Newport). El equipo consta de un *Force Transducer* (Model 406A, 0.5mN) y un *Piezo Motor* (315C-I 50mN Force, 3mm Excursion, 0.40msec). Los cardiomiocitos permeabilizados fueron fijados por los extremos a las agujas que están unidas al *Force Transducer* y al *Piezo Motor* (Figura 2) y se manipularon mediante controles motorizados conectados a las agujas que permitían hacer movimientos XYZ. El sistema también incluía una platina (803B, Myocyte Test Apparatus) con 8 pocillos para colocar los diferentes tampones de calcio a testar (Figura 3).

Para la fijación de las células a las agujas, se colocó en un portaobjetos una dilución 1:100 de células permeabilizadas en tampón de relajación, se observó la calidad de las células y se seleccionó aquella con sarcómeros definidos. Para el recubrimiento de las agujas del *Force Transducer* y *Piezo Motor* se emplearon dos pegamentos diferentes según el tipo de experimento. Cada pegamento requiere un protocolo particular para recubrir las agujas y conseguir la máxima eficacia de fijación. El pegamento shellac (60 mg/mL en etanol al 70%, Millipore Sigma) se aplicó a 65°C colocando una gota en el portaobjetos, se recubrió las puntas de las agujas formando un halo en ellas y se desplazaron para eliminar el exceso de pegamento. Por otro lado, para aplicar el pegamento de silicona Aquasil (JBL) se trazó una línea del pegamento utilizando un hisopo de algodón, se acercó levemente las puntas de las agujas y se retiraron, se dejó secar 10-15 minutos antes de proceder a fijar las células. En ambos casos se localizó el cardiomiocito de interés y las agujas fueron descendiendo poco a poco para fijarlo. El tiempo de acción de los pegamentos varió de 1 minuto con el shellac a 30 minutos con la silicona Aquasil.

Una vez fijada la célula, se realizó una configuración del equipo para proceder con los test mecánicos. Esta configuración incluyó la medición de la longitud del sarcómero (SL, en micrómetros μm), dimensiones celulares (largo y ancho en milímetros, mm) y fuerza basal (en milinewtons, mN). Para ello las imágenes de la célula fueron digitalizadas y proyectadas en el programa (ASI600A Digital Controller) utilizando una cámara (ASI901D High-speed video). El algoritmo para medir SL se basó en que primero se tuvo que alinear el cardiomiocito de manera horizontal proyectándolo al programa del ordenador, después se definió una región rectangular de interés (ROI) donde los patrones de espectros en el programa automáticamente predicen la longitud del sarcómero. Esto se debe a que el programa realiza una transformación rápida de Fourier para cada línea del video en el ROI y a su vez traduce la frecuencia de pixeles de la imagen a la longitud del sarcómero [20, 29]. La longitud del sarcómero de los cardiomiocitos en todos los experimentos se ajustó a $1.8 (\mu\text{m})$ realizando pequeños estiramientos o acortamientos de la célula manualmente con los controles motorizados (Figura 2).

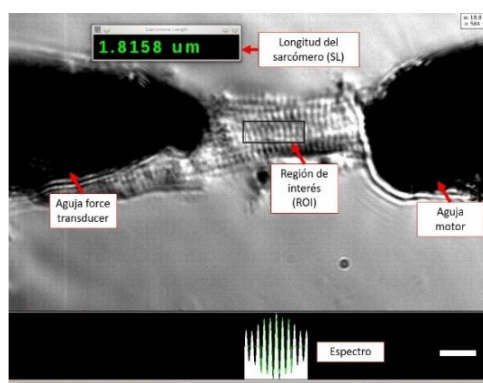


Figura 2.- Representación del cardiomiocito fijado a las agujas y los datos proporcionados de SL por el programa ASI901D High-speed video (40X). La barra de escala representa $20 \mu\text{m}$.

Análisis de sensibilidad al calcio (pCa)

Una vez fijado el cardiomiocito a las agujas del *cardiomyocyte stretcher* se estableció un protocolo que permitiera grabar todas las fuerzas de contracción generadas por el cardiomiocito una vez expuesto a las diferentes concentraciones de calcio (pCa 5.25-6.28). Para ello se comenzó haciendo un estiramiento inicial para asegurar que el cardiomiocito fuera viable y estuviera bien fijado a las agujas. A continuación se ejecutó el protocolo previamente descrito [26, 30] donde el cardiomiocito fue cambiándose a las

soluciones de pCa de menor a mayor concentración (pCa 6.28-5.25), moviendo únicamente la platina del microscopio. Cada cardiomiocito se mantuvo aproximadamente 5 segundos en cada solución de calcio (Figura 3) y se registraron las mediciones de fuerza y cambios en la longitud del sarcómero utilizando el programa del equipo (ASI600A).

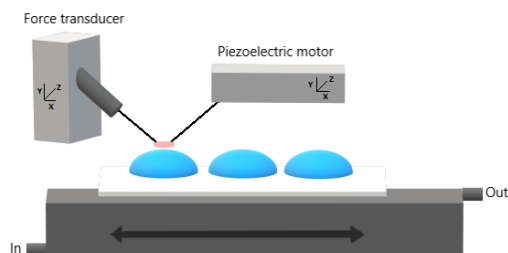


Figura 3.- Representación esquemática de la configuración del sistema y de los tampones de diferente pCa. Una vez fijada la célula al motor y transductor, el cardiomiocito pudo trasladarse a las diferentes soluciones de calcio que mantenían temperatura controlada, lo que permitió ir registrando la fuerza de contracción (mN) y cambios en SL (μm) a través del tiempo.

Análisis del efecto de la glicación en la rigidez de cardiomiocitos

Se estudiaron las alteraciones en la fuerza pasiva de cardiomiocitos de ratones wild-type expuestos al agente glicante metilglioxal (MG). Para ello, se realizó el mismo procedimiento de aislamiento y fijación de cardiomiocitos permeabilizados al equipo y se incubó cada célula con MG $100 \mu\text{M}$ durante 30 y 60 minutos añadiendo el compuesto directamente sobre la gota que contenía la célula fijada a las agujas del equipo. El MG fue purificado y cedido amablemente por el Dr. Miguel Adrover Estelrich de la Universitat de les Illes Balears (UIB).

Se estableció un protocolo que permitiera aplicar 6 estiramientos de $0.10 \mu\text{m}$ en la longitud del sarcómero en cada test. Los cardiomiocitos se dejaron en relajación durante 10 minutos entre cada test. Se realizaron 3 test en cada célula para evaluar el efecto en las fuerzas pasivas desarrolladas por el cardiomiocito: (1) antes de añadir MG (estado basal), (2) tras 30 minutos de incubación y (3) tras otros 30 minutos, completando 60 minutos de incubación total con MG (Figura 5A). Para poder promediar resultados de distintas células, la fuerza pasiva en cada longitud de sarcómero se normalizó a la fuerza máxima obtenida en la longitud de sarcómero mayor ($2.4 \mu\text{m}$), obteniendo los porcentajes de fuerza pasiva producida por el cardiomiocito antes y después del tratamiento con MG. Se realizó el análisis estadístico en el programa GraphPad Prism versión 6.0

Resultados

Aislamiento de cardiomiocitos

En general, el aislamiento de cardiomiocitos por disrupción mecánica tuvo un rendimiento bajo de células óptimas para estudios mecánicos. La cantidad de tejido a tratar influyó directamente en la suspensión celular obtenida, de cada extracción de aproximadamente 5 microgramos (μg) de tejido se obtenían 5 o 6 cardiomiocitos, pero no todos mantenían su estructura intacta, muchos de los cardiomiocitos eran muy gruesos o se aislaban unos sobre otros perdiendo la visibilidad de los sarcómeros. Para los estudios mecánicos se requerían cardiomiocitos aislados completamente y con patrones de estriación visibles.

Siguiendo el protocolo A (alta velocidad de homogenización y baja concentración de Triton-X100) se obtuvieron cardiomiocitos con buenos patrones de estriación, sarcómeros visibles y se observaron pocos restos celulares. Mientras que con el protocolo B (baja velocidad de homogenización y alta concentración de Triton-X100) no se lograron aislar cardiomiocitos óptimos; los pocos cardiomiocitos estudiados presentaban sarcómeros poco definidos y se observó abundancia de restos celulares y membranas (Tabla 2). Así pues, el protocolo A se usó para aislar todas las células estudiadas en esta memoria.

Condiciones	Imagen
Velocidad de homogenización alta (25000 rpm) Tritón X-100 (0.5%).	

Velocidad de homogenización baja
(15000 rpm)
Tritón X-100 (1%).

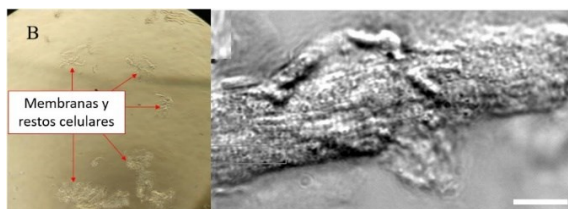


Tabla 2.- Resumen de características de cardiomiocitos obtenidos en diferentes condiciones de aislamiento: A) Velocidad de homogenización alta y concentración de Tritón X-100 baja. B) Cardiomiocitos pobremente aislados a velocidad de homogenización baja y concentración de Tritón X-100 alta. Observación en microscopio fase 1 (10X) y magnificación en ASI901D High-speed video fase 2 (40X). Las barras de escala representan 20 μm .

Análisis de sensibilidad al calcio (pCa)

Se calcularon las concentraciones de todos solutos y se prepararon los tampones con las diferentes concentraciones de calcio. Los tampones se prepararon con un rango de pCa entre 4.5 y 8.9, manteniendo en todos un pH de 7.0 y fuerza iónica de 166 mM. Los ajustes y cálculos realizados en el programa Maxchelator (maxchelator.stanford.edu) permitieron calcular las concentraciones exactas de calcio libre que deseábamos tener en el medio de solución, ya que por tratarse de concentraciones en el orden nanomolar, pequeñas modificaciones en la concentración afectarían directamente el registro de fuerza de contracción de la célula.

La fijación de cardiomiocitos a las agujas del equipo fue exitosa con shellac en el 70% de los intentos permitiendo realizar los test mecánicos. Una vez fijada cada célula, se realizó la configuración del equipo midiendo la longitud de sarcómero inicial (SL en μm), dimensiones celulares (mm) y fuerza basal (mN), para iniciar los test mecánicos. La fijación de las células con el pegamento shellac no afectó su estructura basal, observando que todas mantuvieron el patrón de estriación de sarcómeros intactos, con SL basal de 1.8 μm (Figura 4, A1, B1, C1). Sin embargo, cuando esas mismas células fijadas se movieron de la gota de tampón de relajación que las contenía para pasarlas a otra gota con tampón de relajación (pCa 8.9), las células mostraron total pérdida de la maquinaria estructural y contráctil, imposibilitando realizar el test mecánico (Figura 4 A2, B2, C2 mismas células después del cambio de gota). Debido a esta limitación, no se pudieron registrar las fuerzas de contracción en los diferentes tampones de calcio.

Dado que las células se estropeaban al cambio de gota de tampón de calcio, se realizó la búsqueda de un pegamento alternativo con base silicona. Se testó el pegamento Aquasil sobre varias células, adaptando el protocolo de recubrimiento de las agujas para este pegamento dado su alta densidad. La eficacia de fijación de las células con el Aquasil fue del 6%, estropeando su estructura celular en el proceso (Figura 4 D1) y con una duración de secado prolongado (30 minutos). Además de su baja eficiencia de fijación, el pegamento no mostró ninguna mejora en el proceso de cambio de tampón de calcio, perdiendo nuevamente la estructura de las células al realizar el cambio ahora al tampón de activación pCa 4.5 (Figura 4 D2). Debido a esta limitación, no se pudieron registrar las fuerzas de contracción en los diferentes tampones de calcio.

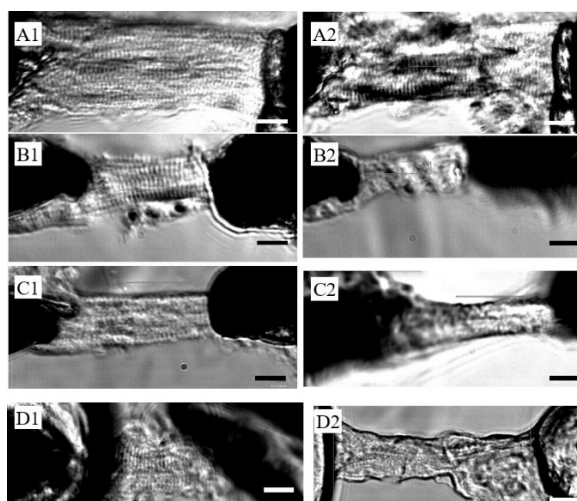


Figura 4.- Imágenes de cardiomiocitos en estado basal en tampón de aislamiento y al moverlos a tampón pCa 8.9. A1, B1, C1) Diferentes cardiomiocitos en estado basal fijados con pegamento shellac. A2, B2, C2) mismos cardiomiocitos al cambiarlos a tampón de relajación pCa 8.9. D1) Cardiomiocito en estado basal fijado con pegamento de silicona Aquasil, D2) mismo cardiomiocito al cambiarlo a tampón de activación (pCa 4.5). Magnificación en ASI901D High-speed video fase 2 (40X). Las barras de escala representan 20 μm .

Análisis del efecto de la glicación en la rigidez de cardiomiocitos

Para conocer el posible efecto de glicación en titina, se realizó un protocolo que permitiera medir la fuerza pasiva generada por cardiomiocitos permeabilizados antes y después de tratarlos con metilglioxal (MG) a diferentes SL (Figura 5 A). Los registros de fuerza pasiva se midieron con el tiempo, observando cómo la fuerza iba aumentando en cada estiramiento conforme se aumentaba la longitud del sarcómero. En uno de los experimentos representativos se observó que la fuerza pasiva parecía aumentar ligeramente al incubarse el cardiomiocito con MG durante 30 minutos y un decaimiento abrupto de la fuerza después de 60 minutos totales de incubación (Figura 5B). Tras realizar 8 experimentos, se observó que hubo una disminución ligera en el desarrollo de fuerza únicamente a longitud de sarcómero de $2.1\mu\text{m}$, de 74.59% antes de agregar MG a 67.87% después de 30 minutos de incubación con MG y 65.16% a los 60 minutos ($n=8$). Sin embargo, los niveles de fuerza pasiva permanecieron sin cambios en las otras longitudes de sarcómero. En términos relativos, la fuerza pasiva disminuyó ligeramente en 6.72% (a los 30 minutos) y 9.43% (a los 60 minutos) de la fuerza pasiva inicial (74.59%) a una SL de $2.1\mu\text{m}$. Sin embargo, al realizar comparaciones entre grupos se observó que no existía diferencia significativa ($P=0.62$, Kruskal-Wallis test) en la fuerza pasiva registrada antes y después del tratamiento con metilglioxal a los 30 y 60 minutos de incubación (Figura 5C).

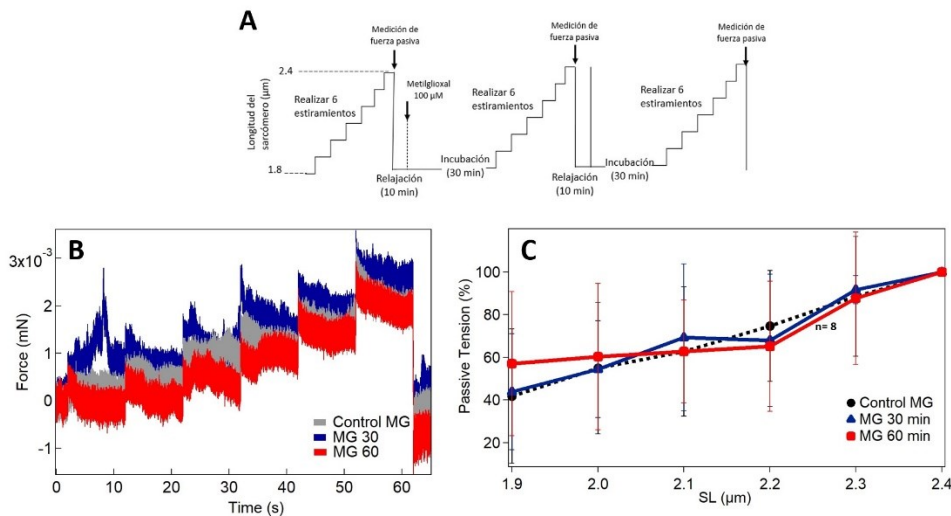


Figura 5.- Efecto del MG en la fuerza pasiva de cardiomiocitos murinos permeabilizados. (A) Protocolo aplicado a cada célula fijada, el protocolo consta de un test basal, seguido de una incubación con MG de 30 minutos y una incubación adicional de 30 minutos. Eje X (tiempo) y eje Y (SL alcanzada en cada test). (B) Registros de la fuerza desarrollada en los test realizados en un experimento representativo sobre una célula fijada. (C) Representación de la tensión pasiva relativa a diferentes SL de los cardiomiocitos a diferentes tiempos de incubación con MG. Las barras de error representan la desviación estándar de cada experimento. El último punto corresponde a la fuerza máxima con la que se normalizaron las fuerzas por lo que no tiene barra de error.

Discusión

Los test mecánicos en cardiomiocitos individuales permiten caracterizar las propiedades activas (de contracción), y propiedades pasivas relacionadas con la rigidez y elasticidad que tienen los cardiomiocitos al aplicar sobre ellos una fuerza. Para ello se requiere equipos con alta sensibilidad que permiten la manipulación mecánica y registro de fuerzas ejercida por las células, así como de la optimización de técnicas que permitan el aislamiento y extracción de cardiomiocitos para su estudio a nivel individual.

Sin embargo, el aislamiento y fijación de cardiomiocitos funcionales con buena resolución óptica de los sarcómeros mientras se realiza el registro de fuerza a nivel milinewtons (mN) es una técnica desafiante y que se ha ido mejorando a través del tiempo [30]. No siempre se logra una fijación adecuada, la célula no queda posicionada correctamente o incluso se puede desprender de las agujas si existen remanentes de detergente en la célula. Es posible que el shellac, un pegamento en base etanol pudiera intervenir provocando algún cambio en la polaridad del medio y por tanto en la célula. Por otro lado, la velocidad de los movimientos al proceder al cambio de gota de tampón, al ser manuales y no automáticos, pudieron afectar cuando la célula rompe la tensión superficial de la gota en que se encuentran. En el caso del pegamento en base de silicona no teníamos experiencia ni puesto a punto cómo recubrir las agujas adecuadamente sin que estropearan los cardiomiocitos durante el proceso o no se adhirieran lo suficiente. Además, al tratarse de una silicona muy densa, pegaba la célula en una superficie mayor a solo extremos perdiendo visibilidad de los sarcómeros.

Basados en que diversos estudios en modelos murinos de cardiomiopatía hipertrófica con mutaciones en cMyBP-C han mostrado una mayor sensibilidad al calcio y aumento en la generación de fuerza [7, 16, 31-

36] se esperaría que el modelo futuro a caracterizar también presente un aumento en la sensibilidad al calcio. El modelo murino, portador de la mutación R502W en cMyBP-C desarrolla disfunción diastólica y engrosamiento de las trabéculas (datos no publicados del laboratorio). Debido a ello, es posible que los cardiomiocitos de este modelo presenten una mayor sensibilidad al calcio, lo cual podría contribuir a una hipercontractilidad de las células como ocurre en otros modelos animales (Wijnker & van der Velden, 2020). Estos efectos también se han observado en preparaciones miocárdicas humanas que presentan alguna mutación en cMyBP-C en heterocigosis, mostrando una disfunción sarcomérica caracterizada por capacidades de fuerza disminuida en concentraciones altas de calcio y mayor generación de fuerza a niveles bajos de calcio [37, 38].

Hasta la fecha, son pocos los datos reportados en modelos animales acerca del posible fenómeno de glicación en titina, es por ello que se decidió analizar si el metilglioxal, un agente altamente glicante, producía un efecto en el desarrollo de fuerza pasiva en cardiomiocitos normales wild-type. Aun cuando la fuerza pasiva disminuyó ligeramente en 6.72% (a los 30 minutos) y 9.43% (a los 60 minutos) de la fuerza pasiva inicial (74.59%) a un SL de 2.1 μm (Figura 5C), fue un efecto muy por debajo al de otras modificaciones inducidas en titina, de hasta el 40% [24].

La ausencia de cambios evidentes en el registro de fuerza antes y después del tratamiento con metilglioxal puede deberse a que los dominios ricos en lisina y arginina (Papadaki et al., 2018) donde actúa el MG probablemente no están completamente expuestos en titina por lo que no se logra observar el efecto de glicación. Este efecto ha sido observado en otros estudios, como por ejemplo en la glutatiónilación de titina [39].

Por otro lado, en un estudio similar donde se evaluó el fenómeno de glicación en titina tampoco se encontró cambios en la fuerza pasiva al exponer cardiomiocitos con MG por 20 minutos, únicamente encontrando modificaciones por MG en los filamentos de actina y miosina afectando las propiedades mecánicas de los miofilamentos [22]. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales evaluando diferentes condiciones que permitan conocer a profundidad el probable efecto de la glicación en titina y su posible participación en el desarrollo de cardiomiopatía diabética.

Conclusiones

Los ensayos en cardiomiocitos individuales son una forma funcional de evaluar las propiedades mecánicas del miocardio, de manera que los resultados a nivel celular se pueden trasladar a nivel muscular.

Hemos optimizado la parte inicial del protocolo de sensibilidad al calcio en cardiomiocitos, ensayos que se terminarán de poner a punto para posteriores estudios en el modelo murino con mutación en cMyBP-C (R502W).

El metilglioxal parece no tener ningún efecto sobre la glicación en titina, por lo que se necesitan ensayos adicionales, en los que se explore la hipótesis de que la actividad mecánica de titina potencia los efectos de MG.

Perspectivas Futuras

Emplear y optimizar el recubrimiento de las agujas *Force Transducer* y *Piezo Motor* con los pegamentos apropiados para realizar los experimentos de sensibilidad al calcio. Para ello, habrá que probar otros pegamentos caracterizados en la literatura, y estudiar la compatibilidad con los sistemas de tampón de calcio empleados. Una vez puesto a punto el método, se caracterizará la mecánica del modelo murino con mutación en cMyBP-C (R502W).

Realizar experimentos adicionales que permitan estirar y exponer los dominios estructurales de titina, para evaluar el posible efecto de glicación en titina y su contribución en el desarrollo de fuerza pasiva. Es necesario también evaluar diferentes concentraciones de MG y pureza del reactivo para posteriores estudios.

Agradecimientos

La autora agradece al Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, a la Universidad de Alcalá y a la Fundación Carolina por la beca otorgada para la realización del Máster.

Referencias

1. Brieler, J. A. Y., Breeden, M. A., Tucker, J., & Louis, S. (2017). Cardiomyopathy: An Overview. *American Family Physician*, 96(10):640-646.
2. Masarone, D., Kaski, J. P., Pacileo, G., Elliott, P. M., Bossone, E., Day, S. M., & Limongelli, G. (2018). Epidemiology and Clinical Aspects of Genetic Cardiomyopathies. *Heart Failure Clinics*, 14(2):119-128.

3. Nonaka, M., & Morimoto, S. (2014). Experimental models of inherited cardiomyopathy and its therapeutics. *World Journal of Cardiology*, 6(12):1245-1251.
4. Fatkin, D., McConnell, B. K., Mudd, J. O., Semsarian, C., Moskowitz, I. G. P., Schoen, F. J., Giewat, M., Seidman, C. E., & Seidman, J. G. (2000). An abnormal Ca²⁺ response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 106(11):1351–1359.
5. Green, E. M., Wakimoto, H., Anderson, R. L., Evanchik, M. J., Gorham, J. M., Harrison, B. C., Henze, M., Kawas, R., Oslob, J. D., Rodriguez, H. M., Song, Y., Wan, W., Leinwand, L. A., Spudich, J. A., McDowell, R. S., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2016). Heart disease: A small-molecule inhibitor of sarcomere contractility suppresses hypertrophic cardiomyopathy in mice. *Science*, 351(6273):617–621.
6. Semsarian, C., Ingles, J., Maron, M. S., & Maron, B. J. (2015). New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(12):1249–1254.
7. Barefield, D., Kumar, M., Gorham, J., Seidman, J. G., Seidman, C. E., de Tombe, P. P., & Sadayappan, S. (2015). Haploinsufficiency of MYBPC3 exacerbates the development of hypertrophic cardiomyopathy in heterozygous mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 79, 234–243.
8. Harris, S. P., Bartley, C. R., Hacker, T. A., McDonald, K. S., Douglas, P. S., Greaser, M. L., Powers, P. A., & Moss, R. L. (2002). Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circulation Research*, 90(5):594–601.
9. Wijnker, P. J. M., & van der Velden, J. (2020). Mutation-specific pathology and treatment of hypertrophic cardiomyopathy in patients, mouse models and human engineered heart tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(8):165774.
10. Starčević, J. N., Janić, M., & Šabovič, M. (2019). Molecular mechanisms responsible for diastolic dysfunction in diabetes mellitus patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5):1197.
11. Tan, Y., Zhang, Z., Zheng, C., Wintergerst, K. A., Keller, B. B., & Cai, L. (2020). Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. *Nature Reviews Cardiology*, 17(9):585-607.
12. Sadayappan, S., & de Tombe, P. P. (2012). Cardiac myosin binding protein-C: redefining its structure and function. *Biophysical Reviews*, 4(2):93–106.
13. Herrero-Galán, E., Martínez-Martín, I., & Alegre-Cebollada, J. (2019). Redox regulation of protein nanomechanics in health and disease: Lessons from titin. *Redox Biology*, 21, 101074.
14. Korte, F. S., McDonald, K. S., Harris, S. P., & Moss, R. L. (2003). Loaded Shortening, Power Output, and Rate of Force Redevelopment Are Increased with Knockout of Cardiac Myosin Binding Protein-C. *Circulation Research*, 93(8):752–758.
15. Kumar, M., Govindan, S., Zhang, M., Khairallah, R. J., Martin, J. L., Sadayappan, S., & De Tombe, P. P. (2015). Cardiac myosin-binding protein C and troponin-I phosphorylation independently modulate myofilament length-dependent activation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49):29241–29249.
16. Mamidi, R., Li, J., Doh, C. Y., Verma, S., & Stelzer, J. E. (2018). Impact of the myosin modulator mavacamten on force generation and cross-bridge behavior in a murine model of hypercontractility. *Journal of the American Heart Association*, 7(17):1–15.
17. Sun, Y. B., & Irving, M. (2010). The molecular basis of the steep force-calcium relation in heart muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 859–865.
18. Rodríguez-García, M. I., Monserrat, L., Ortiz, M., Fernández, X., Cazón, L., Núñez, L., Barriales-Villa, R., Maneiro, E., Veira, E., Castro-Beiras, A., & Hermida-Prieto, M. (2010). Screening mutations in myosin binding protein C3 gene in a cohort of patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *BMC Medical Genetics*, 11(67):1–10.
19. Castro-Ferreira, R., Fontes-carvalho, R., Falcão-pires, I., & Leite-moreira, A. F. (2009). Papel de la Titina en la Modulación de la Función Cardíaca y sus Implicaciones Fisiopatológicas. *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, 96, 332–339.
20. Granzier, H. L., & Irving, T. C. (1995). Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophysical Journal*, 68, 1027–1044.

21. Herman, D.S., Lam, L., Taylor, M.R.G., Wang, L.B., Teekakirikul, P., Christodoulou, D., Conner, L., DePalma, S.R., McDonough, B., Sparks, E., et al. (2012). Truncations of Titin Causing Dilated Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 366:619-628.
22. Papadaki, M., Holewinski, R. J., Previs, S. B., Martin, T. G., Stachowski, M. J., Li, A., Blair, C. A., Moravec, C. S., Van, J. E., Campbell, K. S., Warshaw, D. M., & Kirk, J. A. (2018). Diabetes with heart failure increases methylglyoxal modifications in the sarcomere, which inhibit function. *JCI Insight*, 3(20):121264.
23. Schalkwijk, C. G., & Stehouwer, C. D. A. (2020). Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases. *Physiological Reviews*, 100:407–461.
24. Krüger, M., & Linke, W. A. (2006). Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 27(5):435–444.
25. Cazorla, O., Szilagy, S., Vignier, N., Salazar, G., Krämer, E., Vassort, G., Carrier, L., & Lacampagne, A. (2006). Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovascular Research*, 69(2):370–380.
26. Van Der Velden, J., Klein, L. J., Van Der Bijl, M., Huybregts, M. A. J. M., Stooker, W., Witkop, J., Eijlsman, L., Visser, C. A., Visser F. C., & Stienen, G. J. (1998). Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovascular Research*, 38(2):414–423.
27. Fabiato, A., & Fabiato, F. (1979). Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *Journal of Physiology*, 75(5):463-505.
28. Bers, D. M., Patton, C. W., & Nuccitelli, R. (2010). A practical guide to the preparation of Ca²⁺ buffers. *Methods in Cell Biology*. USA: Academic Press. 328.
29. Lim, C. C., Helmes, M. H. B., Sawyer, D. B., Jain, M., & Liao, R. (2001). High-throughput assessment of calcium sensitivity in skinned cardiac myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 281, 969–974.
30. Gonçalves-Rodrigues, P., Almeida-Coelho, J., Gonçalves, A., Amorim, F., Leite-Moreira, A. F., Stienen, G. J. M., & Falcão-Pires, I. (2020). In Vitro Assessment of Cardiac Function Using Skinned Cardiomyocytes. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 1–22.
31. Mamidi, R., Gresham, K. S., & Stelzer, J. E. (2014). Length-dependent changes in contractile dynamics are blunted due to cardiac myosin binding protein-C ablation. *Frontiers in Physiology*, 5:461.
32. Palmer, B. M., McConnell, B. K., Li, G. H., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Irving, T. C., Alpert, N., & Maughan, D. W. (2004). Reduced cross-bridge dependent stiffness of skinned myocardium from mice lacking cardiac myosin binding protein-C. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1):73–80.
33. Pohlmann, L., Kröger, I., Vignier, N., Schlossarek, S., Krämer, E., Coirault, C., Sultan, K. R., El-Armouche, A., Winegrad, S., Eschenhagen, T., & Carrier, L. (2007). Cardiac myosin-binding protein C is required for complete relaxation in intact myocytes. *Circulation Research*, 101:928–938.
34. Stelzer, J. E., Fitzsimons, D. P., & Moss, R. L. (2006). Ablation of myosin-binding protein-C accelerates force development in mouse myocardium. *Biophysical Journal*, 90(11):4119–4127.
35. van Dijk, S. J., Witt, C. C., & Harris, S. P. (2015). Normal cardiac contraction in mice lacking the proline-alanine rich region and C1 domain of cardiac myosin binding protein C. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 88, 124–132.
36. Witt, C. C., Gerull, B., Davies, M. J., Centner, T., Linke, W. A., & Thierfelder, L. (2001). Hypercontractile Properties of Cardiac Muscle Fibers in a Knock-in Mouse Model of Cardiac Myosin-binding Protein-C. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7):5353–5359.
37. Van Dijk, S. J., Paalberends, E. R., Najafi, A., Michels, M., Sadayappan, S., Carrier, L., Boontje, N. M., Kuster, D. W. D., Slegtenhorst M., Dooijes, D., Dos Remedios, C., Ten Cate, F. J., Stienen, G. J. M., & Van Der Velden, J. (2012). Contractile dysfunction irrespective of the mutant protein in human hypertrophic cardiomyopathy with normal systolic function. *Circulation: Heart Failure*, 5(1):36–46.

38. Van Dijk, S. J., Boontje, N. M., Heymans, M. W., Ten Cate, F. J., Michels, M., Dos Remedios, C., Dooijes, D., Slegtenhorst M., Van Der Velden, J., & Stienen, G. J. M. (2014). Preserved cross-bridge kinetics in human hypertrophic cardiomyopathy patients with MYBPC3 mutations. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(8):1619–1633.
39. Alegre-Cebollada, J., Kosuri, P., Giganti, D., Eckels, E., Rivas-Pardo, J., Hamdani, N. Warren, C., Solaro, R., Linke, W., & Fernandez, J. (2014). S-Glutathionylation of Cryptic Cysteines Enhances Titin Elasticity by Blocking Protein Folding. *Cell*, 156(6):1235–1246.