



UNIVERSIDAD DE TALCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Evaluación de apoptosis mediante
método de TUNEL en cardiomiocitos
de ratones diabéticos tratados con BH4**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ALUMNO: MARÍA JOSÉ ROJAS ESCOBAR
PROFESOR GUÍA: ULISES NOVOA FLORES**

Talca-Chile

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

INDICE

1.-Resumen	5
2.-Introducción	6
3.-Revisión bibliográfica	8
3.1.-Epidemiología	8
3.2.-Diabetes mellitus	9
3.2.1.- Fisiopatología de la diabetes mellitus.	9
3.2.2.- Importancia de la diabetes en la cardiopatía diabética.	11
3.3.- Cardiopatía Diabética.	12
3.3.1.-La implicancia que tiene la hiperglicemia en el corazón	12
3.3.2.- Consecuencia del estrés oxidativo en la cardiopatía diabética.	13
3.3.3.- Otras causas alteración cardiaca.	15
3.3.3.1.- Activación de la vía de aldosa reductasa (poliol).	15
3.3.3.2.- Productos finales de glicación avanzada (AGEs).	15
3.3.3.3.- Aumento del flujo a través de la vía de hexosamina	16
3.3.3.4.- Activación de la proteína quinasa C (PKC).	16
3.3.3.5.- Alteración del sistema Renina-angiotensina -aldosterona (RAAS).	16
3.4.-El rol de Óxido Nítrico en el sistema cardiovascular	17
3.5.-Tetradihidropterina (BH4)	18
3.6.-Apoptosis de Cardiomiocitos	18
3.6.1.- Mecanismos de apoptosis	19
3.6.2.- La vía intrínseca mitocondrial	20
3.6.3.- La vía extrínseca	20
3.6.4.- La Vía común	20
4.-Hipótesis y objetivos	22
5.- Metodología	23
5.1.-Método experimental	23
5.2.-Diseño experimental	23
5.3.- Determinación de la glicemia	24

5.4.-Detección de apoptosis	24
5.5.-Evaluación del TUNEL	25
5.6.- Análisis estadístico	26
6.- Resultados	27
6.1.- Glicemia según grupo experimental	27
6.2.- Peso de los ratones según grupo experimental	28
6.3.- Imágenes de tinción con método TUNEL	29
6.4.- Apoptosis de cardiomiocitos	31
6.5.- Relación entre la glicemia y la apoptosis de cardiomiocitos	32
7.-Discusión	33
8.- Conclusión	36
9.- Bibliografía	37

1.-RESUMEN

La cardiomiopatía diabética es una enfermedad cardíaca en pacientes diabéticos, identificada como una disfunción ventricular en ausencia de enfermedad coronaria e hipertensión. Se han propuesto varias formas fisiopatológicas que podrían describir la causa del deterioro del músculo cardíaco en pacientes con diabetes, incluyendo la hiperglicemia, alteración metabólica, formación de especies reactivas de oxígeno, inflamación y apoptosis.

En estado de hiperglicemia la apoptosis adquiere relevancia siendo considerada como la principal causa del deterioro cardíaco. La apoptosis ocurre a través de dos vías de señalización: las vías intrínseca y extrínseca y estas convergen en una vía común. La clave para entender la apoptosis a través de estas vías de señalización es la activación y función de las caspasas, estas provocan un daño en la contractilidad cardíaca la que promueve una falla en la función de los cardiomiocitos generando lesiones irreparables que conllevan a la muerte celular. Por lo tanto, en este estudio experimental se cuantificó la apoptosis en cardiomiocitos de ratones de la cepa BALB/c que presentan diabetes tipo 1, con y sin tratamiento con BH4, utilizando el método de marcaje colorimétrico de dUTP-biotin mediado por TdT, Click-iT™ TUNEL Colorimetric IHC Detection Kit, Invitrogen. Los cortes histológicos fueron observados utilizando microscopio óptico y analizados con ANOVA de un factor. Los resultados se compararon utilizando Student-Newman-Keuls .

Finalmente se observó que el tratamiento con BH4 no redujo la apoptosis de los cardiomiocitos de ratones con DMT1, ya que tampoco se pudo establecer un resultado estadísticamente significativo en el aumento de apoptosis bajo condiciones de hiperglicemia, pero se puede ver que existe una tendencia al aumento de los niveles de apoptosis en los grupos de ratones diabéticos.

2.- INTRODUCCIÓN

La principal causa de muerte en pacientes diabéticos es la enfermedad cardiovascular; esta es conocida como miocardiopatía diabética, la cual se caracteriza por alteraciones en la morfología de los cardiomiocitos y en función cardíaca, siendo independiente de la hipertensión o de la presencia de enfermedad coronaria. Los pacientes con diabetes son propensos a desarrollar enfermedades cardíacas, considerándose así la diabetes como un factor de riesgo. La diabetes mellitus afecta al corazón a través de varios mecanismos, entre ellos, deterioro microvascular, alteración metabólica, anomalías de los componentes subcelulares, disfunción autonómica cardíaca y una respuesta inmune inadaptada.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica y progresiva, con una alta prevalencia en el mundo. La diabetes mellitus tipo 1 también conocida como insulina dependiente, es una enfermedad generalmente autoinmune donde se dañan las células beta pancreáticas productoras de la insulina. En la diabetes tipo 2, existe una alteración en la utilización de la insulina, debido a que esta se mantiene generalmente en los tejidos. La insulina es una hormona esencial y es sintetizada por las células beta pancreáticas como enzima transportadora de glucosa desde el torrente sanguíneo a los órganos, donde la glucosa se utiliza como fuente de energía al interior de las células.

La falta de la insulina o la incapacidad de utilizarla hace que los niveles de glucosa aumenten en sangre, generando un estado de hiperglicemia y de no ser tratada provoca daño a largo plazo en diferentes órganos y tejidos, dentro de ellas están las retinopatías, nefropatías, neuropatías y enfermedad cardiovascular.

En este estudio se evaluará experimentalmente la apoptosis en cortes histológicos de corazón, obtenidos de ratones que presentan diabetes mellitus tipo 1 inducida con

estreptozotocina con y sin tratamiento (BH₄), esta actúa como un cofactor de la NOS en la producción de óxido nítrico.

A estos cortes histológicos se les evaluará la apoptosis a través del método de TUNEL, el que consiste en la incorporación de dUTP modificados por la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en los extremos 3'-OH del ADN fragmentado.

3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.- Epidemiología

La diabetes mellitus ha alcanzado proporciones epidémicas ya que la prevalencia actual de esta enfermedad a nivel mundial es de un 5,7%, y se estima que para el 2025 en Latinoamérica y el Caribe será de un 8,1%, algo así como unos 300 millones de diabéticos a nivel mundial entre 20 y 79 años (2). A pesar de los avances en tratamiento y prevención esta ha aumentado de manera más drástica de lo esperado.

La diabetes tipo 1 es más frecuente en niños o adolescentes, y esta se ha incrementado en un 2-5% en todo el mundo y su prevalencia es de aproximadamente uno de cada 300 en EE. UU, o entre 5% a 10% (2). Autores como Tao Z et. al. (33) proponen que la diabetes tipo 2 es responsable del 90% de diabetes en el mundo, es más frecuente en adultos mayores, pero cada vez se está diagnosticando mayor cantidad de casos en jóvenes, hoy la edad promedio de diagnóstico para diabetes ha disminuido a 42,5 años (32).

Los pacientes con diabetes mellitus tienen 2 a 4 veces mayor riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca (36) siendo considerado entonces un factor de riesgo para el desarrollo de cardiopatía. Además, se ha sugerido en estudios, que la causa primaria de mortalidad en pacientes con diabetes es la enfermedad cardiovascular, que corresponde entre un 50% y 80% de las muertes (2). Varios autores relacionan la alteración en el metabolismo de la glucosa con daño cardíaco. (21) Un estudio más reciente que fue realizado por De Simone et. al. (8) propone que hay un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca en pacientes con DM2, independiente de factores como; hipertensión e infarto al miocardio. Y el resultado es similar para ambos tipos de diabetes (36).

La causa de daño al corazón en pacientes con hiperglicemia se plantea que tiene un carácter multifactorial esto genera una alteración en la morfología y función cardiaca. Dentro de estas causas se encuentra un aumento de la cantidad de ácidos grasos libres provocando la acumulación de lípidos en los cardiomiocitos, alteración de las citoquinas y el tono adrenérgico, entre otras.

3.2.- Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una alteración metabólica en que los niveles de glucosa aumentan en sangre durante un período prolongado de tiempo de tal forma que esta pasa a ser una enfermedad crónica. Su origen se debe a la alteración de genes y factores medioambientales que provocan un estado de hiperglicemia debido a la falta de secreción de insulina, falla en su acción o ambas. Existen 3 clasificaciones para diabetes; diabetes tipo 1 (DMT1), diabetes tipo 2 (DMT2) y diabetes gestacional.

La DM1 se debe principalmente a que existe una producción de insulina deficiente por el páncreas (14). La DM2, la cual es producto de un uso ineficaz de la insulina por las células del organismo, esta suele tener un origen directo con el consumo de alimentos con alto contenido calórico, la obesidad, la poca actividad física y en algunos casos se incluye la resistencia a la insulina.

3.2.1.- Fisiopatología de la diabetes mellitus

La diabetes tipo 1 (DMT1) es causada generalmente por una reacción autoinmune, donde el sistema inmunológico ataca las células beta pancreáticas productoras de la insulina y como resultado existe una deficiente producción de la hormona. En la DMT1 se expresan autoanticuerpos anti-islotos (se encuentran con mayor frecuencia son ICA, anti GAD 65 y anti IA) los cuales destruyen las células beta pancreáticas y como resultado de esto se produce un déficit de insulina. Esta en un principio es leve, pero con evolución rápida a la carencia absoluta de la hormona.

La etiología no está del todo clara, pero la Federación Internacional de Diabetes (IFD) habla sobre una combinación genética y desencadenantes medioambientales que favorecen la expresión de la enfermedad. Estas pueden ser de origen endógeno o exógeno como: infecciones virales, toxinas y factores dietéticos (14). Se sabe que existe un polimorfismo genético como factor de riesgo, entre estos se encuentran genes asociados con la enfermedad celiaca (1). Además, autores como Risch N. et al. (29) nos sugieren que los principales genes implicados son los que participan en el complejo mayor de histocompatibilidad HLA principalmente de clase II, DR3, DR4, DQ beta y DQ alfa.

El tratamiento de la DMT1 consiste en inyecciones diarias de hormona, debido a que sin la insulina las personas no serían capaz de sobrevivir, además se debe incluir buenos hábitos alimenticios y de esta manera retrasar muchas de las complicaciones asociadas a la diabetes.

La diabetes tipo 2 (DMT2) es la más frecuente a nivel mundial. Su etiología se debe a los hábitos alimenticios como: la mal nutrición combinado con la falta de actividad física, que genera obesidad y sobrepeso, también la edad avanzada y antecedentes familiares, tabaquismo y antecedentes de diabetes gestacional (34). En la DMT2, el estado de hiperglicemia se debe a la incapacidad de los tejidos de responder a la insulina acumulándose la glucosa en los tejidos provocando un aumento de esta en el organismo que llega a ser toxica y dañina para los órganos. Los niveles de insulina de una persona con DMT2 pueden ser normales, pero son insuficientes para contrarrestar la hiperglicemia y la insulinoresistencia. Además, en la DMT2 el individuo no necesita aporte de insulina, pero podría llegar a necesitarla a lo largo de la evolución de la enfermedad. Cuando la persona está en rango de prediabetes tiene riesgo macrovascular y cuando aparece la hiperglicemia ya existe riesgo de enfermedades por daño microvascular, como la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía.

3.2.2.- Importancia de la diabetes en la cardiopatía diabética

La diabetes provoca una alteración en todo el organismo y se han realizado múltiples investigaciones para conocer sus efectos. Un estudio donde se realizaron análisis ecocardiográfico detallados de una población de indios americanos con una alta tasa de DMT2, se concluyó que: la diabetes se asoció con un aumento del grosor de la pared del ventrículo izquierdo, la función sistólica esta reducida y particularmente diastólica, independiente de que un paciente presente hipertensión (37).

La cardiomiopatía en pacientes DMT1 fue presentada por primera vez por Rubler et. al (30) en base a cuatro pacientes diabéticos que padecían insuficiencia cardíaca congestiva en ausencia de enfermedad coronaria valvular o cardiopatía congénita, hipertensión o alcoholismo.

Se han realizado numerosos estudios desde 1972 los que consideran que la cardiomiopatía diabética es un problema generalizado en la DMT1 y se manifiesta por primera vez con una disfunción diastólica, donde la presión de llenado se encuentra aumentada para mantener el gasto cardiaco normal (37).

Existe evidencia de que se ve alterado la función cardíaca, específicamente el llenado ventricular el cual fue significativamente más deteriorado en DMT2, que en los pacientes con DMT1 (12). Estos y otros autores han demostrado a través de diferentes estudios que la insuficiencia cardíaca pasaría a ser una consecuencia de la diabetes en los pacientes que la presentan y así la diabetes es considerada un factor de riesgo de daño cardíaco.

3.3.- Cardiopatía Diabética

Como se había planteado anteriormente la diabetes es un factor de riesgo para producir enfermedades cardiovasculares y el término miocardiopatía diabética significa disfunción ventricular en ausencia de enfermedad arterial coronaria e hipertensión. La IFD informo que según estudios realizados en personas entre 28 a 44 años con DMT1, un 16% tenía antecedentes de una enfermedad cardiovascular y que esta es una causa importante de muerte, ya que cinco personas de cada mil mueren por una enfermedad cardiovascular (13). La DMT1 se asocia con al menos un aumento de 10 veces la enfermedad cardiovascular en comparación con una población no diabética de la misma edad (28).

3.3.1.- La implicancia que tiene la hiperglicemia en el corazón

El medio diabético es tóxico para el corazón. Bugger y Abel et al (5), proponen además que el corazón diabético se caracteriza por la hipertrofia cardíaca, la que se relaciona con el control glicémico independiente de la presión arterial.

La miocardiopatía diabética está marcada por hipertrofia ventricular izquierda, reactivación de genes fetales y acumulación de lípidos en los cardiomiocitos, que en conjunto promueven la disfunción contráctil (36). Además, enfermedades como hipertrofia miocárdica y la disfunción diastólica se han considerado las características de la miocardiopatía diabética. Finck et al. (14) sugiere en su estudio que en el corazón diabético esta disminuida la actividad de Glut-4, que como resultado existe una utilización de glucosa reducida y además una señalización de insulina deteriorada. Esto genera posteriormente un aumento de la energía por utilización de ácidos grasos, mayor demanda de oxígeno por el miocardio, reduciendo así la eficiencia cardíaca.

Debido a la importancia de la insulina en la regulación del metabolismo del miocardio, la deficiencia de esta indica que no hay utilización de glucosa por tejido cardíaco, esto generalmente provoca que el corazón dependa casi exclusivamente de los ácidos grasos para generar energía (4). El aumento en la utilización de ácidos grasos por un corazón diabético podría generar trastornos funcionales debido a que habría una acumulación de productos intermediarios lipídicos, la generación mitocondrial o peroxisomal de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un consumo excesivo de oxígeno (20). Además, varios estudios han demostrado la asociación de la sobreexpresión o la activación de PKC β 2 en el desarrollo y la progresión de cardiopatía diabética (41), la cual es una proteína quinasa que participa en la traducción de señales. Estos trastornos metabólicos predisponen a que el corazón del paciente diabético se dañe. Nuevos estudios sugieren que la producción y liberación excesiva de especies reactivas de oxígeno genera estrés oxidativo la que conduce a la expresión anormal de genes, transducción de señales defectuosas y apoptosis de cardiomiocitos (12). Otros autores como He, Z et al (19) han propuesto varias teorías basadas en los resultados de estudios experimentales y clínicos, que incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo, la activación de la ruta del poliol, formación de AGE, inducción de flujo a través de la ruta de la hexosamina, activación de la PKC, y expresión y acción alteradas de los factores de crecimiento.

En resumen, la hipertrofia ventricular izquierda, las anomalías metabólicas, los cambios en la matriz extracelular, la enfermedad de los vasos pequeños, la neuropatía autónoma cardíaca, la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la apoptosis son los factores más importantes para el inicio y la progresión de la cardiomiopatía diabética (12).

3.3.2 Consecuencia del estrés oxidativo en la cardiopatía diabética

El estrés oxidativo (ROS) juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones de la diabetes debido a la excesiva actividad oxidativa. Las complicaciones en el tejido cardíaco de un corazón diabético se atribuyen principalmente a la producción de estrés oxidativo debido a la síntesis elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS). El estrés

oxidativo es el desequilibrio entre la producción de ROS y la degradación por antioxidantes endógenos. Se han implicado en la aparición y progresión de enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca congestiva y la disfunción cardíaca asociada a la diabetes (miocardiopatía diabética) (37).

Falcao-Pires et al. (12) proponen que ROS tiene numerosos efectos nocivos en el sistema cardiovascular, a través del daño celular por oxidación, alteración de homeostasis vascular por interferencia con NO entre otros. Y que además ROS tiene origen mitocondrial y extra mitocondrial en pacientes con cardiomiopatía diabética.

Se cree que ROS participa en todas las etapas del desarrollo de la cardiopatía diabética, y su fuentes de principal ROS es a través de la cadena respiratoria mitocondrial (40), la pequeña cantidad de ROS que se origina durante la respiración mitocondrial generalmente se descompone por los antioxidantes, Pero cuando la síntesis de estas se elevan como ocurre en la miocardiopatía diabética, estos antioxidantes endógenos no son capaces de dar abasto y quedan en el tejido, como resultado existe una acumulación de moléculas reductoras, las que impulsan a la formación de aniones superóxido (13).

Otra fuente de ROS es el complejo enzimático de membrana NAHPH oxidasa. Se considera una fuente importante de ROS en células cardiovasculares, como los cardiomiocitos, células endoteliales y fibroblastos. Además, la síntesis elevada de especies reactivas de oxígeno mitocondrial se traducen en señales oxidativas que llevan finalmente a la apoptosis.

Y por último la síntesis de óxido nítrico endotelial no acoplado (e NOS). Este es el principal productor de óxido nítrico en el sistema vascular, su función es transferir electrones de NAHPH al dominio hemo oxigenasa, pero cuando eNOS se encuentra desacoplado es una gran fuente de producción de ROS en diversas enfermedades como diabetes. La eNOS no acoplada es un fenómeno caracterizado por la desviación de la transferencia de electrones

dentro de la molécula de la eNOS de la oxidación de l-arginina, lo que resulta en una reducción del oxígeno molecular para formar superóxido en lugar de NO (13) esto implica que contribuye no solo al aumento de la formación de ROS, sino también a la disminución de la biodisponibilidad de NO.

3.3.3.- Otras causas alteración cardiaca

3.3.3.1 Activación de la vía de aldosa reductasa (poliol).

Él, Z. y King, GL (35-39) publicaron además otras causas de daño vascular. Dentro de estas se encuentra: la activación de la ruta del poliol, donde se ha sugerido que la actividad incrementada de esta ruta causa patologías vasculares por daño osmótico, inducción de estrés oxidativo y actividad reducida de Na^+ , K^+ - ATPasa. Las relaciones $\text{NADP}^+ / \text{NADP}$ y $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ al estar modificadas cambian el equilibrio redox intracelular e inician una serie de eventos bioquímicos que no favorecen la homeostasis vascular, como la producción reducida de NO.

3.3.3.2 Productos finales de glicación avanzada (AGEs).

La generación de productos finales de glicación avanzada es considerada como etiología de daño vascular, en condiciones de hiperglucemia, la modificación covalente irreversible y el entrecruzamiento de la proteína por la glucosa generan múltiples productos finales como el glioxal, el metilglioxal y la 3 deoxiglucosona, conocidos como AGEs. Estas son causa de fuga vascular y la reducción de la vasodilatación mediada por el óxido nítrico, también pueden interactuar directamente con las proteínas de la superficie celular, activando así las vías de señalización intracelular y de esta manera alterar las células vasculares (35).

3.3.3.3 Aumento del flujo a través de la vía de hexosamina.

La sobrecarga de la vía de la glucólisis en los estados diabéticos puede aumentar el flujo a través de la vía de la hexosaminas. Se produce un metabolito que es la N- acetil-glucosamina para una posterior glicosilación de proteínas diana en los residuos de serina y treonina, esta alteración es importante ya que se produce una variación en la transcripción de proteínas la cual se ve reflejada en una alteración en la actividad de factores transcripcionales y como consecuencia una remodelación vascular alterada , por falla en la proliferación de células endoteliales y de los cardiomiocitos (39).

3.3.3.4 Activación de la proteína quinasa C (PKC).

La protein quinasa C aumenta frente a un estado de hiperglicemia crónica debido a que ésta aumenta el flujo de las vías metabólicas alternas, lo que genera mayor cantidad de diacilglicerol, el cual estimula la síntesis de PKC e isoformas como la beta, ya que estas son expresadas en la vasculatura. La cual actúa como un importante modulador pro-apoptótico en las células endoteliales. (35)

3.3.3.5 Alteración del sistema Renina-angiotensina -aldosterona (RAAS)

RAAS desempeña un papel fundamental a través de su capacidad para mantener la presión arterial y el balance entre electrolitos y agua. Además, se postula que la angiotensina II puede actuar directamente a través de su receptor de superficie celular tipo 1 (AT1) y regular la remodelación tisular, la fibrosis, la hipertrofia celular y la apoptosis a través de la inducción de la expresión génica (22). Cuando los niveles de glucosa aumentan en sangre se afecta el sistema RAAS. El aumento de este produce daño vascular y renal en los pacientes con DM, inducen vasoconstricción y secreción cardiovascular y renal de citoquinas inflamatorias, aumenta el estrés oxidativo y aumenta la reabsorción tubular de sodio.

3.4.- El rol de Óxido Nítrico en el sistema cardiovascular

Óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización que se produce en la vasculatura, se sintetizan tanto en el músculo liso vascular como en las células endoteliales y contribuyen a la regulación del tono vascular, relajando las células del músculo liso (17). Para su síntesis se requiere la presencia de cofactores como: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (H4B) y NADPH. Además, Enderma et. al.(10) sugiere que la acción de NO se basa a nivel intracelular, donde activa el guanilato ciclasa soluble, produce un cambio conformacional en el sitio catalítico y permite la conversión de guanosina 5 trifosfato a guanosina 3,5 monofosfato cíclica (GMPc), esta acción incrementa la concentración de GMPc celular hasta en 100 veces y reduce la cantidad de calcio intracelular permitiendo la relajación muscular mediada por la proteína kinasa dependiente de GMPc.

Estudios recientes han demostrado que la síntesis reducida de NO, sería un factor importante en la acción alterada de la insulina en la vasculatura de los sujetos obesos y diabéticos. La generación disminuida de NO resulta de una deficiencia de tetrahidrobiopterina (BH4) un cofactor esencial para la NO sintasa (10).

En los pacientes diabéticos con niveles altos de glucosa en la sangre, la señalización de insulina alterada, las especies reactivas de oxígeno (ROS), la inflamación y la activación de la proteína quinasa C, podrían provocar una disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (10). Además, estos autores plantean que la disminución del NO y el aumento del estrés oxidativo desempeñan un papel central en varias vías fisiopatológicas que lleva a la falta de este mensajero y como consecuencia se genere daño vascular, por la disminución de la vasodilatación.

3.5.- Tetrahydrobiopterina (BH4)

La tetrahydrobiopterina (BH4) es un cofactor esencial para la actividad de algunas enzimas y está presente en probablemente todas las células o tejidos del organismo. Actúa como un cofactor en la producción de óxido nítrico (NO) promoviendo el acoplamiento de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) (27). En el estado homodimérico o acoplado, los electrones se transfieren desde el dominio de la eNOS reductasa al dominio de la oxigenasa, y se produce NO, pero cuando esta se encuentra desacoplada los electrones que forman el ON se desvían al superóxido produciendo oxígeno molecular (9). La síntesis de BH4 es a partir de guanosina trifosfato (GTP) a través de tres reacciones químicas mediadas por las enzimas GTP ciclohidrolasa I, la 6-piruviltetrahydropterina sintasa y sepiapterina reductasa.

La función de BH4 es la de convertir aminoácidos como la fenilalanina, tirosina y triptófano a precursores de la dopamina y serotonina, los neurotransmisores primarios del organismo, además de actuar como cofactor en la producción de NO. Autores como Wu, G. et. al (38) sugieren que en condiciones donde se encuentre alterada la glucosa, se produciría un déficit de BH4 y esto se traduce en una alteración vascular por déficit de NO. La generación disminuida de NO resulta de una deficiencia de (6 R) -5,6,7,8-tetrahydrobiopterina BH4; el cual es esencial para la NO sintasa (NOS), así como una mayor generación de glucosamina (un inhibidor del ciclo de la pentosa para la producción de NADPH, otro cofactor para la NOS) a partir de la glucosa y la L -glutamina. En consecuencia, la disfunción endotelial se puede prevenir mejorando la síntesis de BH4 o mediante la suplementación (18).

3.6.-Apoptosis de Cardiomiocitos

La apoptosis es un proceso biológico que está altamente regulado, promoviendo el equilibrio entre las señales celulares pro-muerte y pro-supervivencia, cuyo resultado es clave para el destino celular.

Bugger y Abel (5) proponen en su estudio que, el estado metabólico de hiperglicemia produce un aumento de los ácidos grasos circulantes además de triacilgliceroles y que, en conjunto con el estado de hiperinsulinemia, el aumento de las citocinas inflamatorias, llevan consigo un daño en la contractilidad cardíaca la que promueve una falla en la función de los cardiomiocitos generando lesiones irreparables que conllevan a la muerte celular.

La muerte celular es un determinante importante de la remodelación cardíaca por qué; causa la pérdida de unidades contráctiles, hipertrofia compensatoria de las células del miocardio y la fibrosis reparadora, la muerte celular cardíaca precede a la descompensación ventricular y se correlaciona con el deterioro de la función dependiente del tiempo (6).

Un estudio donde se evaluó apoptosis y necrosis en estrés oxidativo se obtuvo como resultado que la diabetes aumentó la necrosis por 4 veces en los miocitos, 9 veces en las células endoteliales y 6 veces en los fibroblastos (16) además estos autores plantean que la diabetes se caracterizó por un aumento de apoptosis de 85, 61 y 26 veces en los miocitos, las células endoteliales, y fibroblastos, respectivamente. Esto nos da a entender mas claramente que un estado de hiperglucotoxicidad es una causante del daño a las células cardiacas con un posible resultado de muerte.

3.6.1.- Mecanismos de apoptosis

La apoptosis se inicia y ejecuta a través de dos vías principales de señalización: las vías intrínseca y extrínseca. La clave para entender la apoptosis está en conocer la activación y función de las caspasas, un grupo de cisteinil-aspartato-dirigido a proteasas.

3.6.2.- La vía intrínseca mitocondrial

La vía de apoptosis intrínseca, también denominada vía de apoptosis mitocondrial se desencadena por estrés intracelular como: el estrés oxidativo, la sobrecarga de calcio y el daño al ADN, lo que lleva a que la membrana externa mitocondrial aumente su permeabilidad mitocondrial y libere moléculas pro apoptóticas, como el citocromo C al citosol. El citocromo citosólico y el factor de activación de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), forman el apoptosoma y dan como resultado la activación de la caspasa 9. Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Esta regulación consiste en señales pro apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) y proteínas anti apoptóticas (Bax, Bak), que funcionan principalmente para proteger o interrumpir la integridad de la membrana mitocondrial y controlar la liberación de moléculas pro apoptóticas (39).

3.6.3.- La vía extrínseca

La vida extrínseca se inicia mediante señales de estrés extracelular, dentro de estas se encuentra; el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y una proteína llamada FAS, y sus ligandos Fas (FasL) y el ligando inductor de la apoptosis, se encuentra relacionado con el TNF (TRAIL) a través de unión a sus receptores apoptóticos individuales(TNF- α receptor 1 (TNFR1), Fas y TRAIL receptor 1/2 (TRAILR1 / 2), respectivamente). Los receptores de proteínas de dominio de muerte asociado a fas (FADD) inician el ensamblaje de la pro-caspasa 8 en el complejo de señalización inductor de muerte y generan la forma activa que es la caspasa 8 (39), esta caspasa 8 inicia la apoptosis clivando otras caspasas rio abajo (35).

3.6.4.-La Vía común

Ambas vías de apoptosis (caspasas 8 y caspasa 9) convergen e inducen la activación de caspasas efectoras 3, 6 y 7. En el corazón, los sustratos de caspasa incluyen moléculas

cruciales para la homeostasis celular, tales como α -actina, α -actinina, α / h-miosina cadena pesada, miosina cadena ligera , tropomiosina, y troponinas cardíacas, además inducen el clivaje de las proteín-kinasas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de reparación del DNA y subunidades inhibitorias de la familia de las endonucleasas. Tienen también un efecto sobre el citoesqueleto, el ciclo celular y las vías de señalización, los que en conjunto contribuyen a la apoptosis celular (35 -39).

4.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

La administración de tetrahidrobiopterina reduce la apoptosis de los cardiomiocitos de ratones con diabetes tipo 1.

Objetivo general:

Evaluar el efecto de la administración de tetrahidrobiopterina sobre la apoptosis de los cardiomiocitos de ratones con diabetes tipo 1.

Objetivos específicos:

Aplicar el método de TUNEL para detectar apoptosis en cardiomiocitos de ratones sanos y con diabetes tipo 1 con y sin tratamiento con tetrahidrobiopterina.

Cuantificar el grado de apoptosis en cardiomiocitos de ratones normales en comparación a un grupo diabético y un grupo de ratones diabéticos con y sin tratamiento.

5.- METODOLOGÍA

5.1.-Método experimental

Para este estudio se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, todos son machos con peso inicial de 35 y 38 gramos los cuales se encontraba en el bioterio de la Universidad de Talca.

El uso de estos ratones fue aprobado con el Comité institucional de ética, cuidado y uso de animales de laboratorio (CIECUAL) de la Universidad de Talca en el 2015.

5.2.-Diseño experimental

A los ratones se les indujo la diabetes tipo 1, a través de un protocolo que consiste en administrar inyecciones de estreptozotocina por vía intraperitoneal. La primera y segunda dosis de estreptozotocina fue de 100mg/kg y la tercera dosis fue de 200mg/kg, obteniendo de esta manera un estado diabético por al menos 8 semanas. Una vez comprobado el estado diabético estos fueron divididos en dos grupos, un numero de 6 ratones fue tratado con tetrahydrobiopterina (BH4), la que fue administrada como agua de beber en dosis de 15 mg/kg correspondiendo al grupo referido como diabéticos tratados con BH4 (D+BH4), y otros 6 ratones solo recibieron agua normal (grupo diabético). Un tercer grupo seguido en paralelo comprendía ratones sin tratamiento con estreptozotocina ni BH4 a los que les administro una solución de citrato en igual condiciones (grupo control n=8). Luego de pasada 8 semanas los ratones se durmieron con isoflurano en cámara cerrada y se les inyecto ketamina-xilacina para su eutanasia.

5.3 Determinación de la glicemia

A los ratones en la octava semana se les determino el estado glicémico a través de un hemoglucotest, este se realizó en condiciones de ayuno y la muestra se obtuvo por punción en la cola de los ratones.

5.4.-Detección de apoptosis

Se utilizaron entre 6 a 8 cortes por cada grupo (control sano, diabéticos y diabéticos + BH4) y además controles positivos de la metodología.

Todos los cortes histológicos estaban previamente fijados e incluidos en parafina. Por lo que se realizó la desparafinación de cada uno antes de realizar el método de TUNEL. Para ello se creó un protocolo que consiste en introducir los cortes histológicos dos veces en Xilol, 10 y 5 min respectivamente, luego se sumergen en etanol en concentraciones de 100%, 95%, 80%, 60% por 5 min respectivamente, y al final enjuagan con agua destilada.

Para medir apoptosis se utilizó un kit comercial Click-iT™ TUNEL Colorimetric IHC Detection Kit, Invitrogen. La técnica de marcaje de extremo (DUNP) de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) se basa en la incorporación de dUTP modificados por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en los extremos 3'-OH del ADN fragmentado. Los ensayos colorimétricos de TUNEL utilizan dUTP conjugados con biotina, seguido de la adición de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa y un sustrato de peroxidasa, dando como resultado una señal apoptótica de color marrón oscuro.

Brevemente, se describirá el protocolo del método TUNEL utilizado. Se prepararon y permeabilizaron los cortes, utilizando como fijador el paraformaldehído al 4% y la proteína K, posteriormente se enjuaga con una solución de PBS. Se incuban los cortes en la mezcla de reacción de TdT para la incorporación de dUTP, este proceso se hace bajo condiciones de cámara húmeda y baño termostático a 37°C durante 60 min evitando que la muestra se seque. Se lavan con PBS y se sumerge en solución diluida de ultra pure SSC por 15 min, se enjuaga nuevamente y se agrega H₂O₂ al 3% por 5 min y se realiza un nuevo lavado. Terminado esto se utiliza una solución de lavado colorimétrico que se encuentra en el kit, y se prepara Click-iT™ TUNEL Colorimetric Reaction cocktail, el cual se mantiene estable por 15 min. En este punto se agrega la biotina azida la que se deja incubar utilizando baño termostático a 37° por 15 min protegida de la luz. Pasado este tiempo se lava con una solución de lavado incluida en el kit y luego enjuagar con agua desionizada. En este punto se agrega el conjugado estreptavidina-Peroxidasa y se deja incubar por 30 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda, luego se enjuaga para eliminar el conjugado y remover residuos. Aplicar el cromógeno DAB, dejar incubar 10 min para mejor intensidad de la señal. Finalmente se lava con agua desionizada para quitar el cromógeno.

El protocolo de montaje utilizó como contraste la tinción de hematoxilina, se deja unos segundos y luego vuelve a parafinar los cortes histológicos, iniciando con etanol de baja a mayor concentración, 60% luego 80% y etanol al 100% por 5 min, 2 veces, y para finalizar se sumerge en xilol 2 veces por 5 min.

5.5.-Evaluación del TUNEL

Las muestras fueron observadas en microscopio óptico Leica DM500 en objetivos de 40X y 100X el que trae adosada una cámara digital de 5 megapíxeles la que fue utilizada para tomar imágenes de distintos cuadrantes de la muestra. Las imágenes de las muestras fueron observadas directamente contando los núcleos teñidos con diaminobencidina (TUNEL positivo), en un número mínimo de 40 por campo y aproximadamente 500 por muestra y de estos se obtuvo un porcentaje de núcleos positivos.

5.6.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS versión 16. Los datos se presentan como porcentaje de medias \pm desviación estándar. Se utilizaron prueba t para comparar medias utilizando una ANOVA de un factor, con la prueba de comparación múltiple de Student-Newmant-Keuls (SNK), según corresponda. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Además, se utilizó el GraphPad Prism versión 6 con intervalo de confianza de 95% para realizar las figuras.

6.- RESULTADOS

6.1.- GLICEMIA SEGÚN GRUPO EXPERIMENTAL

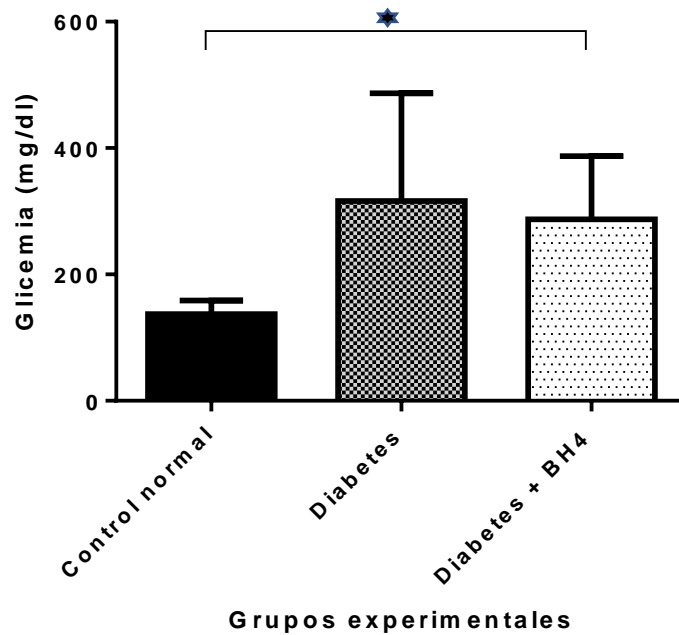


Figura 1: Glicemia (mg/dl) de los ratones separada en los diferentes grupos experimentales. El grafico representa la glicemia de los ratones tomada en la octava semana bajo las diferentes condiciones a las que fueron sometidas, se graficó el promedio de glicemia \pm la DS. La significancia de los valores se obtuvo a través de ANOVA y el test de Student-Newmant-Keuls. El resultado de la glicemia de los ratones diabéticos esta aumentada respecto del control normal y fue estadísticamente significativa. Se expresa un * que representa un valor significativo $p < 0,05$.

El primer grafico representa a la glicemia obtenida en la octava semana de los diferentes grupos de ratones, esta se expresa como promedio \pm la DS. el aumento de la glicemia fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para los diabéticos respecto del grupo control. La glicemia de los controles fue de 140 (mg/dl) \pm 21 en comparación a los diabéticos que fue 320(mg/dl) \pm 170 y en los diabéticos + BH4 290 (mg/dl) \pm 100.

6.2.- PESO DE LOS RATONES SEGÚN GRUPO EXPERIMENTAL

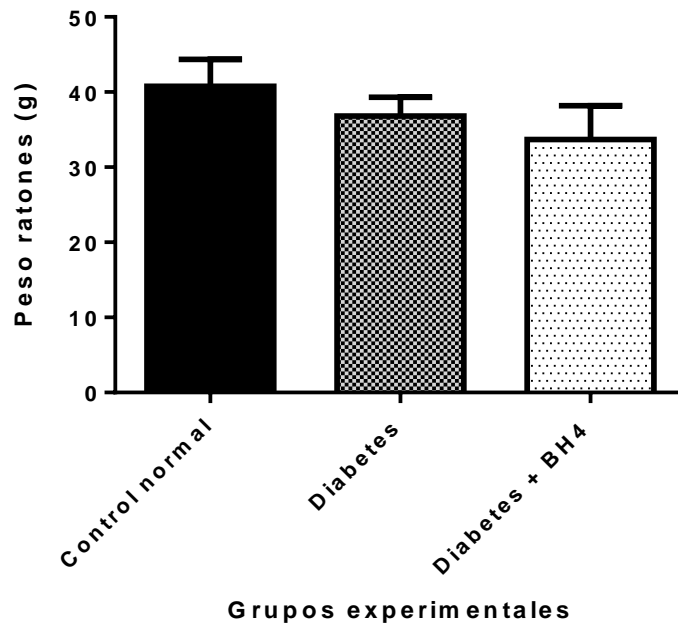


Figura 2: Se observa el peso de los ratones según los diferentes grupos experimentales. El grafico representa los pesos en gramos de los ratones, los cuales fueron obtenidos en la octava semana de edad, separados según los diferentes grupos experimentales. Se grafico el promedio \pm la DS. No hubo diferencia significativa en los resultados.

En el grafico 2, se analizó los pesos (gramos) de los ratones en la octava semana, se expresaron como promedio por grupo \pm D.S, y se obtuvo como resultado una disminución de este respecto al grupo control, pero no se observaron resultados estadísticamente significativos. El resultado del grupo control fue de 40 gramos \pm 3,6 en D.S., diabéticos y diabéticos con BH4 están entre 35 y 40 \pm 2,8 y 4,5 respectivamente.

6.3.- IMÁGENES DEL METODO TUNEL

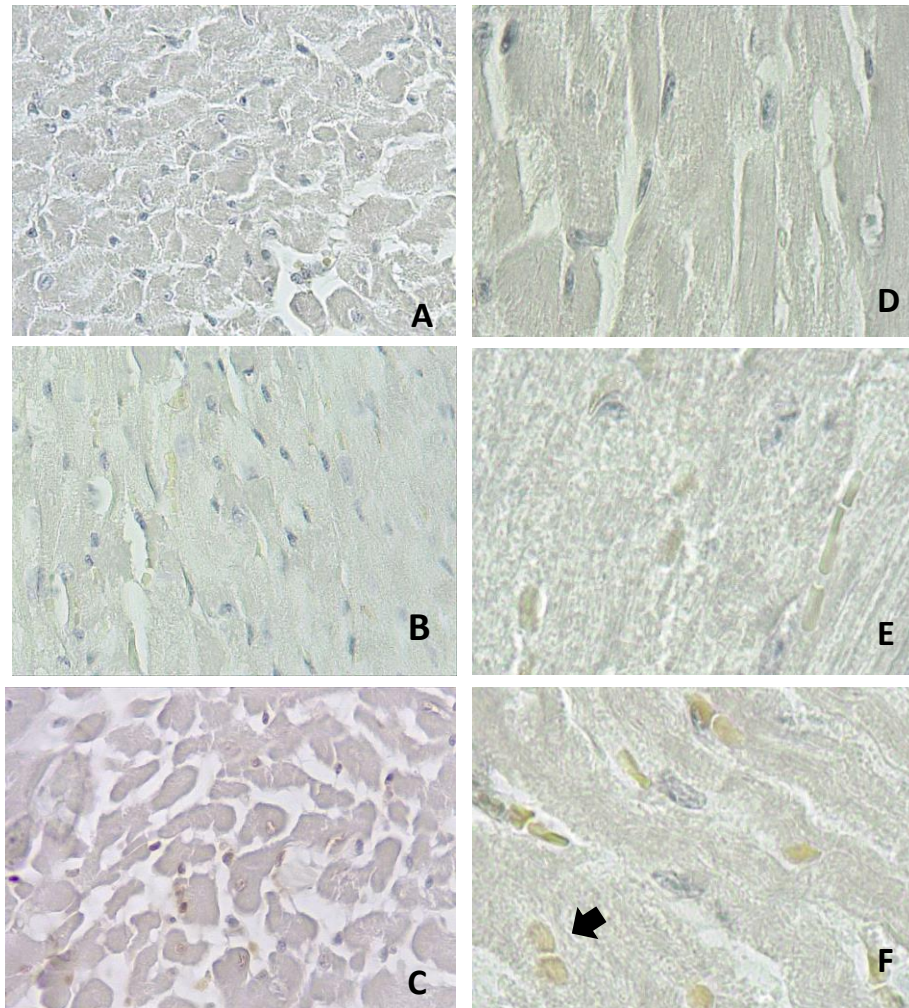


Figura 3: Se aprecian imágenes de diferentes cortes histológicos tratados con método de TUNEL y observadas al microscopio óptico. Los cardiomiocitos que son TUNEL positivo se encuentran teñidas de color marrón. Las imágenes se observan en objetivos 40X y 100X. Las siguientes imágenes son observadas en 40X A) control normal B) diabéticos C) diabéticos+ BH4, y las siguientes en 100X D) control normal, E) diabéticos F) diabéticos +BH4. Las imágenes corresponden a muestras representativas de análisis de al menos 5 imágenes de diferentes campos por cada corte.

En la figura 3, los cortes histológicos utilizados fueron tratados con el método de TUNEL y de este experimento se pudieron obtener 5 imágenes representativas por cada corte, las que fueron observadas a través del microscopio óptico y de ellas se obtuvieron las imágenes que se describen a continuación. Las muestras A) y D) corresponde al grupo control o ratones que no presenta diabetes tipo 1, en ella no se aprecian núcleos que evidencien apoptosis, no así en las muestras siguientes B) y E) corresponden al grupo de Diabéticos sin tratamiento y las C) y F) grupo de diabéticos tratados con BH4, en ellas se pueden apreciar los núcleos que se ven de color marrón, esto es indicativo de que en estas muestras existe apoptosis de los cardiomiocitos.

La flecha que se encuentra en la imagen F) nos indica los núcleos de cardiomiocitos teñidos con DAB por el método de TUNEL (100X), al encontrarse de color marrón esto nos indica que estos se presentan apoptosis.

6.4.- APOPTOSIS DE CARDIOMIOCITOS

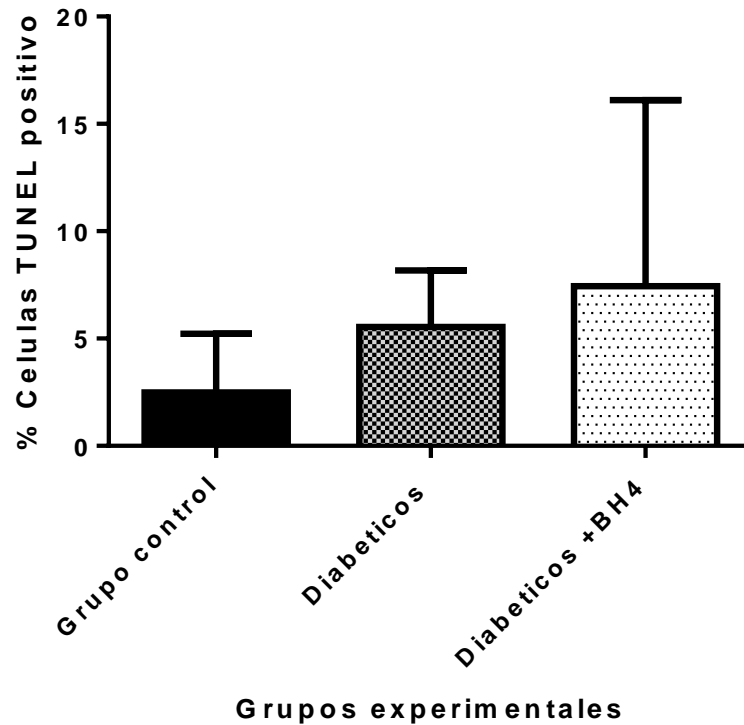


Figura 4: Se observa cardiomiocitos TUNEL positivo separados según los distintos grupos experimentales. El grafico representa el porcentaje de cardiomiocitos que se observaron TUNEL positivo (color marrón), se graficó el porcentaje \pm DS. No se observó diferencia significativa entre el grupo control y los diabéticos con y sin tratamiento.

Como se observa en el grafico número 4, el porcentaje de cardiomiocitos fue obtenido a partir de una muestra representativa, correspondiente a 5 imágenes y de estos se sacó un promedio de cardiomiocitos apoptóticos por muestra. Estos resultados se graficaron como el promedio en porcentaje de células apoptóticas \pm la D.S. Los resultados analizados no fueron estadísticamente significativos, pero si se puede apreciar una tendencia al aumento en la apoptosis de los cardiomiocitos en relación a lo expresado en los resultados del grupo control.

6.5 RELACION ENTRE LA GLICEMIA Y LA APOPTOSIS DE CARDIOMIOCITOS

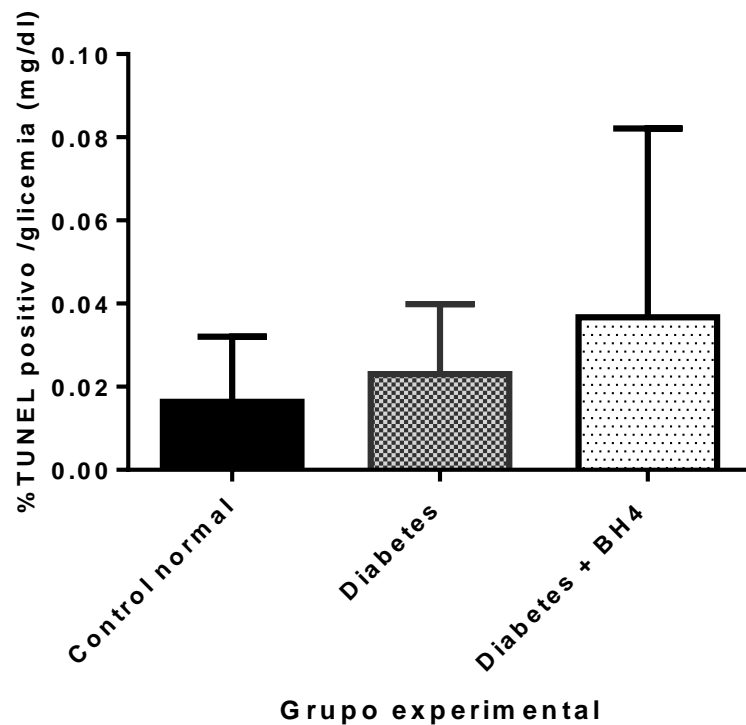


Figura 5: Se observa el porcentaje de cardiomiocitos que presentaron apoptosis y su relación con la glicemia en los diferentes grupos experimentales. El gráfico muestra el porcentaje de cardiomiocitos que presentaron apoptosis y como se relaciona con el estado glicémico de los ratones en la octava semana, se expresó como porcentaje \pm D.S. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

En la figura 5 se puede apreciar, el porcentaje de cardiomiocitos que presentaron apoptosis en relación a la glicemia que presentaba cada muestra, estos resultados son expresados por grupo experimental y se obtuvo que porcentaje de apoptosis de cardiomiocitos en relación a la glicemia, los resultados en el grupo control fue de $0.0019 \pm 0,015$ en los diabéticos el porcentaje fue de $0,02 \pm 0,016$ y en los diabéticos tratados con BH4 el resultado fue de $0,03 \pm 0,04$. Ninguno de estos resultados fue estadísticamente significativo, pero existe una tendencia al alza en la apoptosis de cardiomiocitos en aquellos que presentan diabetes.

7.- DISCUSIÓN

Actualmente no hay disponible un tratamiento que haya demostrado una remisión completa de la DMT1. Mientras tanto, la esperanza de vida de los pacientes con DMT1, se mantiene, además esta enfermedad da origen al desarrollo de otras patologías. Por lo tanto, se necesitan estrategias de manejo adicionales. En este estudio experimental se trabajó con muestras de ratones a los que se les indujo padecer DMT1 y luego de 8 semanas se les determinó la glicemia en ayunas, utilizando un hemoglucotest. Se obtuvieron los resultados que se pueden observar en la Figura 6.1; donde se muestran los valores de glicemia de los ratones separados por grupo experimental. Para poder analizar su estado diabético y se obtuvo que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los resultados del grupo control respecto de los que presentan diabetes, además los ratones que son tratados con BH4 presentan una glicemia levemente disminuida respecto del grupo no tratado, pero sin menor relevancia. También, se muestra en la figura 6.2 el peso de los ratones los cuales no mostraron diferencia.

La cardiomiopatía diabética se caracteriza por hipertrofia y apoptosis de los cardiomiocitos. Se ha considerado que numerosos mecanismos están implicados en la patogénesis de la cardiomiopatía diabética, como el estrés oxidativo (36) el estado de hiperglucemia que puede generar ROS a través de la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE) y además la disminución de los niveles de NO (12), lo que conduce a la muerte prematura de los cardiomiocitos. Existen numerosas pruebas que demuestran que la apoptosis desempeña un papel importante en el desarrollo de la miocardiopatía diabética (13). La apoptosis de los cardiomiocitos es uno de los principales contribuyentes al desarrollo de infartos de miocardio (16).

En el presente estudio, la determinación de apoptosis se realizó utilizando el método de TUNEL para los diferentes grupos experimentales (diabéticos, diabéticos + BH4 y el grupo control). El método TUNEL es capaz de detectar distintos fragmentos de ADN de tamaño oligonucleosómico (180-200 pb de longitud) es un sello bioquímico de la apoptosis en el

ADN. Se sabe que el daño en el ADN aparece no solo durante la apoptosis, sino que también está vinculado a la necrosis y es causada por compuestos tóxicos u otros insultos (16). Como resultado de aplicar el método de tinción de TUNEL a las muestras en la Figura 3; se observan los núcleos de cardiomiocitos que presentan apoptosis de un color marrón, debido a que estos se encuentran teñidos con DAB, por el contrario, los que no presentan apoptosis se tiñen con la coloración de contraste (hematoxilina). Las muestras de la Figura 3; fueron observadas en diferentes objetivos (40X y 100X), la imagen A) y D) corresponde a muestras del grupo control, en ellas solo se pueden apreciar los núcleos de los cardiomiocitos teñidos en azul, esto no quiere decir que no exista apoptosis, ya que esta se encuentra de manera natural en toda la célula del organismo, solo que los niveles encontrados son mucho menores en comparación a aquellos que presentan algún daño. En las imágenes B) y E) se encuentran las muestras de ratones diabéticos y en la C) y F) se encuentran imágenes de las muestras de ratones diabéticos tratados con BH4, en las que se puede apreciar un aumento de los núcleos de cardiomiocitos teñidos con DAB (marrón), en comparación al grupo control.

Sin embargo, la apoptosis del miocardio es un proceso complejo que está mediado por una serie de enzimas y numerosas moléculas. Los resultados expuestos en la Figura 4; sugieren que en las muestras de ratones que presentaban diabetes existe una tendencia al aumento de apoptosis en cardiomiocitos, pero los resultados no fueron estadísticamente significativo ($p < 0,05$), además no hubo diferencia significativa entre los niveles de apoptosis en aquellos que estaban bajo tratamiento, en comparación a los que no tuvieron tratamiento, sugiriéndonos que un tratamiento con BH4 quizás no protege al corazón de la apoptosis inducida por los niveles elevados y tóxicos de glucosa, pero para llegar a esto se necesita de nuevos estudios, en los cuales el número de muestras pueda tener mayor representación.

En la Figura 4; se relacionó en el gráfico el porcentaje de núcleos apoptóticos con los resultados de la glicemia separados en los grupos experimentales, y se pudo apreciar que existe una tendencia al aumento de apoptosis de cardiomiocitos en los grupos diabéticos, pero los resultados estadísticos arrojaron un valor no significativo.

Finalmente se obtuvo que el tratamiento con BH4 no redujo la apoptosis de los cardiomiocitos de ratones con DMT1, ya que tampoco se pudo establecer un resultado estadísticamente significativo en el aumento de apoptosis bajo condiciones de hiperglicemia, pero se puede ver que existe una tendencia al aumento de los niveles de apoptosis de cardiomiocitos en ambos grupos de ratones diabéticos. Además, esta tendencia al aumento en la apoptosis de los cardiomiocitos podría ser una de las causas por la que se genera la cardiomiopatía diabética.

Los resultados no fueron los esperados, pero existen varios factores que pueden haber influido. El primero sería el error humano debido a que el método de TUNEL depende mucho de que el protocolo se siga de manera correcta. Esta técnica de detección de apoptosis no está exenta de error, una de sus desventajas es que presenta un alto costo económico y además es laboriosa, utilizando aproximadamente 6-7 horas de trabajo. Además, se pueden presentar falsos negativos si las muestras no son bien fijadas. Y una de sus ventajas es que puede detectar células apoptóticas en estadios más precoces.

La observación al microscopio óptico es muy dependiente del operador, también pudo haber un error en las imágenes seleccionadas, las cuales deben ser representativas de la muestra analizada.

Además, hay que considerar que en los ratones (BALB/c) no es posible controlar exactamente la respuesta del organismo frente a una situación de hiperglicemia, considerando que el número de muestras fue reducido, quizás con un mayor número de muestras se pueda obtener un resultado más significativo.

8.- CONCLUSIÓN

A modo de conclusión podemos decir que los resultados no fueron estadísticamente significativos pero que existe la tendencia al aumento de la apoptosis en las muestras de ratones que presentaban diabetes tipo 1, con y sin tratamiento. El aumento de la apoptosis de los cardiomiocitos podría ser una causa del daño que lleva finalmente a que se produzca una cardiopatía diabética.

Además, los ratones tratados con BH4 no presentaron resultados estadísticamente significativos ya que no se observó disminución en los niveles de glicemia, ni de apoptosis de cardiomiocitos.

Y finalmente podemos decir que, es necesario realizar nuevos estudios con un mayor número de muestras para poder obtener un mejor resultado.

9.-BIBLIOGRAFIA

1. Akirov A, Pinhas-Hamiel O. Co-occurrence of type 1 diabetes mellitus and celiac disease. *World J Diabetes*. 2015;6(5):707-14.
2. Altamirano LM. Epidemiología y diabetes. *Rev Fac Med UNAM Vol.44 No.1 Enero-Febrero*, 2001.
3. Alp NJ, Mussa S, Khoo J, Cai S, Guzik T, Jefferson A, et al. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J Clin Invest*. 2003;112(5):725-35.
4. Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(5):E1104-13.
5. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2014;57(4):660-71.
6. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, Beltrami AP, Hintze TH, Nadal-Ginard B, et al. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 2001;89(3):279-86.
7. Dandona P, Chaudhuri A, Aljada A. Endothelial dysfunction and hypertension in diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004;88(4):911-31, x-xi.

8. de Simone G, Devereux RB, Chinali M, Lee ET, Galloway JM, Barac A, et al. Diabetes and incident heart failure in hypertensive and normotensive participants of the Strong Heart Study. *J Hypertens*. 2010;28(2):353-60.
9. Dikalova A, Aschner JL, Kaplowitz MR, Summar M, Fike CD. Tetrahydrobiopterin oral therapy recouples eNOS and ameliorates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;311(4):L743-L53.
10. Endemann DH, Schiffrin EL. Nitric oxide, oxidative excess, and vascular complications of diabetes mellitus. *Curr Hypertens Rep*. 2004;6(2):85-9.
11. Epstein XSSZNSMPN. La protección de las mitocondrias cardíacas por la sobreexpresión de MnSOD reduce la miocardiopatía diabética. 2006.
12. Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. *Heart Fail Rev*. 2012;17(3):325-44.
13. Faria AM, Papadimitriou A, Silva KC, Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB. Uncoupling endothelial nitric oxide synthase is ameliorated by green tea in experimental diabetes by re-establishing tetrahydrobiopterin levels. *Diabetes*. 2012;61(7):1838-47.
14. Fedaration Id. DIABETES ATLAS DE LA FID Octava edición ed 2017.
15. Finck BN, Han X, Courtois M, Aimond F, Nerbonne JM, Kovacs A, et al. A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic

cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):1226-31.

16. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res*. 2000;87(12):1123-32.
17. Gheibi S, Jeddi S, Kashfi K, Ghasemi A. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H. *Biochem Pharmacol*. 2018;149:42-59.
18. Hasegawa H, Sawabe K, Nakanishi N, Wakasugi OK. Delivery of exogenous tetrahydrobiopterin (BH4) to cells of target organs: role of salvage pathway and uptake of its precursor in effective elevation of tissue BH4. *Mol Genet Metab*. 2005;86 Suppl 1:S2-10.
19. He Z, King GL. Microvascular complications of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33(1):215-38, xi-xii.
20. How OJ, Aasum E, Severson DL, Chan WY, Essop MF, Larsen TS. Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice. *Diabetes*. 2006;55(2):466-73.
21. Howard BV, Lee ET, Cowan LD, Fabsitz RR, Howard WJ, Oopik AJ, et al. Coronary heart disease prevalence and its relation to risk factors in American Indians. The Strong Heart Study. *Am J Epidemiol*. 1995;142(3):254-68.
22. Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, Ritchie RH. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther*. 2014;142(3):375-415.

23. Lebon C, Rodriguez GV, Zaoui IE, Jaadane I, Behar-Cohen F, Torriglia A. On the use of an appropriate TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay to identify apoptotic cells. *Anal Biochem.* 2015;480:37-41.
24. Loren. Estrés oxidativo y señalización del estrés: amenaza de cardiomiopatía diabética.
25. Mahan LC, Koachman AM, Insel PA. Genetic analysis of beta-adrenergic receptor internalization and down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(1):129-33.
26. Melmed S, Polonsky K, Larsen P, Kronenberg H. Williams libro de texto de endocrinología. 13ª edición ed2015.
27. Mott DM, Pratley RE, Bogardus C. Postabsorptive respiratory quotient and insulin-stimulated glucose storage rate in nondiabetic pima indians are related To glycogen synthase fractional activity in cultured myoblasts. *J Clin Invest.* 1998;101(10):2251-6
28. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;353(25):2643-53.
29. Risch N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet.* 1987;40(1):1-14.
30. Rubler S, Duglash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Brandwood AW, Grisham A. New type of cardiomiophaty associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 1972; 30: 595-602.

31. Salud OMdl. 2018 [Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/diabet>].
32. Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, Denaxas S, Pujades-Rodriguez M, Gale CP, et al. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(2):105-13.
33. Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochem Biophys*. 2015;73(1):181-5.
34. Ting RZ, Lau ES, Ozaki R, Lau WW, Kong AP, Luk AO, et al. High risk for cardiovascular disease in Chinese type 2 diabetic patients with major depression-a 7-year prospective analysis of the Hong Kong Diabetes Registry. *J Affect Disord*. 2013;149(1-3):129-35.
35. van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2005;67(1):21-9.
36. Wang ZV, Hill JA. Diabetic cardiomyopathy: catabolism driving metabolism. *Circulation*. 2015;131(9):771-3.
37. Wold LE, Ceylan-Isik AF, Ren J. Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26(8):908-17.
38. Wu G, Meininger CJ. Nitric oxide and vascular insulin resistance. *Biofactors*. 2009;35(1):21-7.798 - 805. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/55/3/798>.

39. Xia P, Liu Y, Cheng Z. Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9583268.
40. XS, 2 SZ, NSM, Epstein PN. Protection of Cardiac Mitochondria by Overexpression of MnSOD Reduces Diabetic Cardiomyopathy 2006 Mar; 55 (3).
41. Zheng W, Li D, Gao X, Zhang W, Robinson BO. Carvedilol alleviates diabetic cardiomyopathy in diabetic rats. *Exp Ther Med.* 2019;17(1):479-87.

